

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDÚSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

VANESSA DA SILVA NOGUEIRA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
PARA BIOREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM CHUMBO (Pb) E
ZINCO (Zn)

Volta Redonda
2015

VANESSA DA SILVA NOGUEIRA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
PARA BIOREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM CHUMBO (Pb) E
ZINCO (Zn)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a Fabiana Soares dos Santos

Volta Redonda
2015

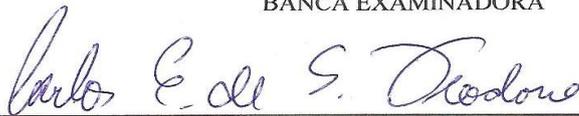
VANESSA DA SILVA NOGUEIRA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
PARA BIOREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM CHUMBO (Pb) E
ZINCO (Zn)

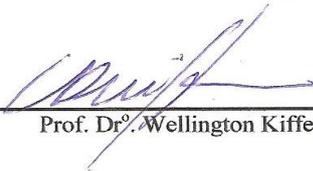
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Aprovada em 15 de Julho de 2015.

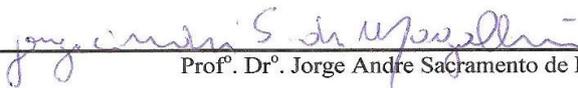
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.º Carlos Eduardo de Souza Teodoro – UFF
Orientador



Prof. Dr.º Wellington Kiffer de Freitas – UFF



Prof. Dr.º Jorge Andre Sacramento de Magalhães – UNIG

Volta Redonda
2015

N778 Nogueira, Vanessa da Silva.

Isolamento e caracterização de microrganismos com potencial para bioremediação de solos contaminados com chumbo (Pb) e zinco (Zn). / Vanessa da Silva Nogueira. – Volta Redonda, 2015.

126 f.

Dissertação (Mestrado Tecnologia Ambiental) –
Universidade Federal Fluminense.

Orientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro.

Coorientador: Fabiana Soares dos Santos.

1. Bioremediação. 2. Metais Pesados. 3. Solos. I. Teodoro,
Carlos Eduardo de Souza. II. Santos, Fabiana Soares dos.
III. Título.

CDD 628.5

Dedico este trabalho a minha amada filha Kyria,

o meu amor incondicional.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por seu amor incondicional, por iluminar meus caminhos e por ter concedido a sabedoria para gozar dos momentos alegres e superar os momentos de dificuldade abençoando a minha vida.

Aos meus amados pais, Victor e Vilma, por todo apoio, ensinamentos, conselhos compreensão e fé a mim dedicados.

Ao meu irmão Vinicius, pela amizade e incentivo.

Ao meu esposo Fernando, pelo amor, carinho, apoio e incentivo constante ao longo desta caminhada.

A minha amada filha Kyria, que é a base que me manteve erguida nos momentos de angustia.

A Universidade Federal Fluminense, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao orientador Carlos Eduardo e a co-orientadora Fabiana pela paciência, contribuição e aprendizado durante todo processo.

A CAPES pela concessão da Bolsa.

Aos professores do curso de mestrado pelo aprendizado e compreensão.

A banca examinadora pelas contribuições dadas ao trabalho.

Aos amigos da primeira turma de Mestrado em Tecnologia Ambiental da UFF.

Ao estagiário Guilherme, ao técnico do laboratório de Biotecnologia Matheus, ao técnico do laboratório de Solo e Água Alexandre.

A Dr^a Dagmar Arbex pela liberação da área de estudo para coleta de campo.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

“A persistência é o menor caminho ao êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

O aumento da população e o crescimento industrial acelerado tem contribuído para a degradação ambiental através de despejo de resíduos sólidos e líquidos contaminados com metais pesados. A remoção destes poluentes do ambiente pode ser realizada por vias biológicas, a bioremediação. O isolamento de microrganismos de áreas contaminadas pode facilitar a seleção de agentes despoluidores eficientes para os estudos de bioremediação. O sucesso de um projeto de bioremediação de áreas contaminadas com metal pesado dependerá inicialmente do isolamento e seleção de microrganismos ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula. Este trabalho tem como objetivo isolar e identificar microrganismo de solo contaminado por Zinco e Chumbo, na cidade de Barra Mansa, RJ, oriundos de rejeitos industriais contaminados, para serem utilizados na biorremediação. A avaliação da capacidade de crescimento a altas concentrações de Zinco e Chumbo foram realizada em meio Caldo Nutriente acrescido com Pb e Zn com as bactéria isolada e previamente selecionada. As variáveis estudadas foram pH, temperatura e fontes de carbono (glicose, sacarose, lactose e frutose), por um periodo de 72 horas de cultivo. A identificação de metais traços presentes no solo foi realizada através da espectrofotometria de absorção atômica. Para a identificação do microrganismo foram realizados testes bioquímicos, tais como, Coloração de Gram, Triple Sugar Iron Agar, Teste do Citrato, Urease, Catalase, Indol, Metil Red, Voges-Proskauer, Hidrogeneon Sulfite, Litmus Milk, Oxidase, Redução de Nitrato, Fermentação de Carboidrato e a identificação molecular. Dentre os valores de pH testados, o que apresentou resultado representativo de crescimento e adsorção de Pb e Zn foi pH 5,5 com valores de crescimento 3,533 e 4,667 gL⁻¹ respectivamente, assim como a adsorção pelo microrganismo de 32,258 ppm de Pb na concentração inicial de 300 ppm e 445,603 ppm de Zn na concentração inicial de 1600 ppm. Após a escolha do pH 5,5 como o ideal, foi analisada a variável temperatura, mostrando-se a mais eficiente no crescimento e adsorção a temperatura de 30°C, para ambos metais. A variável fonte de carbono mostrou-se a mais eficiente na adsorção Sacarose para Pb e Glicose para Zn. A análise molecular resultou Família Enterobacteriaceae. Esses resultado indicam que o Isolado D possui um potencial uso na remoção de Pb e Zn quando as condições são ajustadas, mostrando-se uma alternativa promissora em tratamentos de solos contaminados.

Palavras-chave: Bioremediação, Metais Pesados, Solo.

ABSTRACT

The increase in population and the rapid industrial growth has contributed to environmental degradation by dump solid and liquid waste contaminated with heavy metals. The removal of these pollutants from the environment can be accomplished by biological pathways, bioremediation. The isolation of contaminated areas of microorganisms can facilitate the selection of effective clean-up agents for bioremediation studies. The success of a bioremediation project areas contaminated with heavy metal initially depend on the isolation and selection of microorganisms or a consortium of efficient microorganisms in the degradation of the molecule. This study aims to isolate and identify soil microorganisms contaminated by zinc and lead, in the city of Barra Mansa, RJ, coming from contaminated industrial waste, for use in bioremediation. The evaluation of capacity for growth to high concentrations of zinc and lead were carried out in Nutrient Broth medium plus Pb and Zn with the previously isolated and selected bacteria. The variables studied were pH, temperature and carbon sources (glucose, sucrose, lactose and fructose), for a period of 72 hours of cultivation. The identification of trace metals in the soil was performed by atomic absorption spectrophotometry. To identify the microorganism biochemical tests were performed, such as Gram staining, Triple Sugar Iron Agar, citrate test, urease, catalase, Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, Hidrogeneon Sulfite, Litmus Milk, Oxidase, reduction of nitrate , Carbohydrate Fermentation and molecular identification. Among the pH values tested, which showed representative result of growth and adsorption of Pb and Zn pH 5.5 with growth values 3.533 and 4.667 gl^{-1} respectively, as well as by adsorption of microorganism 32.258 ppm of Pb concentration in initial 300 ppm and 445.603 ppm Zn in the initial concentration of 1600 ppm. After the choice of pH 5.5 as the ideal, the temperature variable was analyzed and proved to be the most efficient growth and adsorption temperature of 30 ° C for both metals. The variable carbon source proved to be more efficient in adsorption Sucrose to Glucose Pb and Zn. Molecular analysis resulted Enterobacteriaceae family. These results indicate that the isolated D has a potential use in removing Pb and Zn when conditions are adjusted, being a promising alternative in contaminated soil treatments.

Key words: bioremediation, heavy metals, soil.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1: Área de coleta para isolamento de microrganismo. f. 41

Figura 2: Efeito do pH no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Chumbo nas concentrações 0, 35, 65, 150, 300 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 54

Figura 3: Efeito do pH na remoção de Chumbo no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 58

Figura 4: Efeito do pH na adsorção de Chumbo pelo isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 61

Figura 5: Efeito da temperatura no crescimento do isolado após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Chumbo nas concentrações 0, 35, 65, 150, 300 ppm no pH 5.5 em 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médio \pm . f. 65

Figura 6: Efeito da temperatura na remoção de Chumbo no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . F.68

Figura 7: Efeito da temperatura na adsorção de Chumbo pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm em 150 rpm no pH 5,5. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios. f. 71

Figura 8: Efeito da fonte de carbono no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Chumbo 300 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): Controle; (B): 300 ppm Chumbo sem fonte de carbono; (C): Glicose; (D): Frutose; (E): Sacarose; (F): Lactose Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 75

Figura 9: Efeito da fonte de carbono na redução de Chumbo no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo 300 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 300 ppm Chumbo sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 78

Figura 10: Efeito da fonte de carbono na adsorção de Chumbo pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo 300 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 300 ppm Chumbo sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E): Lactose. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 80

Figura 11: Efeito do pH no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 82

Figura 12: Efeito do pH na remoção de Zinco no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 86

Figura 13: Efeito do pH na adsorção de Zinco pelo isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 89

Figura 14: Efeito da temperatura no crescimento do isolado após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm no pH

5.5 em 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médio \pm . f. 92

Figura 15: Efeito da temperatura na remoção de Zinco no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 95

Figura 16: Efeito da temperatura na adsorção de Zinco pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm em 150 rpm no pH 5,5. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 98

Figura 17: Efeito da fonte de carbono no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Zinco 3200 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): Controle; (B): 3200 ppm Zinco sem fonte de carbono; (C): Glicose (D): Frutose; (E): Sacarose; (F): Lactose Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 102

Figura 18: Efeito da fonte de carbono na redução de Zinco no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco 3200 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 3200 ppm Zinco sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 104

Figura 19: Efeito da fonte de carbono na adsorção de Zinco pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco 3200 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 3200 ppm Zinco sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E): Lactose. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm . f. 107

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Microrganismos com capacidade de acumular Metais Pesados. Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados, 2008. OLIVEIRA *et al.* f. 34
- Tabela 2:** Concentrações pseudototais de Pb e Zn (mg kg^{-1}) nas amostras de solo na área de estudo. f. 41
- Tabela 3:** Crescimento dos isolados no caldo nutriente com tampão Citrato suplementado com Chumbo das bactérias isoladas do solo contaminado na 2^o coleta. f. 48
- Tabela 4:** Crescimento dos isolados no caldo nutriente com tampão Citrato suplementado com Zinco das bactérias isoladas do solo contaminado na 2^o coleta. f. 48
- Tabela 5:** Teste de coloração Gram nas Bactérias isoladas em solo contaminado com Chumbo e Zinco. f. 49
- Tabela 6:** Provas bioquímicas no isolado D. f. 51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

Al	Alumínio
Cd	Cádmio
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Hg	Mercúrio
Mn	Manganês
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
ppm	Parte por milhão
Sn	Estanho
U	Urânio
Zn	Zinco

SÚMARIO

1. Introdução	17
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. Revisão Bibliográfica	20
3.1 O solo.....	21
3.2 Metais Pesados	22
3.2.1 Metais Pesados no Solo.....	24
3.2.1.1 Chumbo (Pb)	26
3.2.1.2 Zinco (Zn)	28
3.3 Bactérias e Metais Pesados no Solo.....	30
3.4 Biorremediação	35
3.5 Mecanismos de captação dos metais.....	38
4. Materiais e Método	41
4.1 Análise Química do Solo	41
4.2 Isolamento de Microrganismos tolerantes a Chumbo e Zinco	42
4.3 Seleção da solução tampão	43
4.4 Efeito de diferentes concentrações de Chumbo e Zinco no crescimento dos isolados	43
4.5 Efeito do pH do meio de cultura no crescimento e adsorção/remoção de Chumbo e Zinco pelo Isolado	44
4.6 Efeito da temperatura do meio de cultura no crescimento e adsorção/remoção de Chumbo e Zinco pelo Isolado.....	44
4.7 Efeito de Fonte de Carbono Adsorção/Remoção na Chumbo e Zinco	44
4.8 Análise do Chumbo e Zinco residual no sobrenatante da cultura.....	45
4.9 Análise do Chumbo e Zinco adsorvidos na célula.....	45
4.10 Provas bioquímicas para a caracterização do isolado resistente ao Chumbo e Zinco.....	46
4.11 Identificação Molecular do Isolado D.....	46
5. Resultados E Discussão	48
5.1 Teste Tampão.....	48
5.2 Provas Bioquímicas	50

5.2.1 Coloração Gram dos Isolado.....	50
5.3 Análise Molecular Ddo Isolado D	52
5.4 Análise do Isolado D no meio de cultura complementado com Chumbo	53
5.4.1 Efeito do pH No crescimento, na redução de Pb no sobrenadante da cultura e adsorção de Pb pelo Isolado D	53
5.4.2 Efeito da temperatura no crescimento, na redução de Pb no sobrenadante da cultura e adsorção de Pb pelo Isolado D.....	64
5.4.3 Efeito da fonte de carbono no crescimento na redução de Pb no sobrenadante da cultura e adsorção de Pb pelo Isolado D.....	73
5.5 Análise do Isolado D no meio de cultura complementado com Zinco.....	81
5.5.1 Efeito do pH no crescimento, na redução de Zn No sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo Isolado D	81
5.5.2 Efeito da temperatura no crescimento, na redução de Zn No sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo isolado D.....	90
5.5.3 Efeito da fonte de carbono no crescimento, na redução de Zn no sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo Isolado D	99
6. Conclusão	108
7. Referências Bibliográficas	110

I. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental tem sido um dos problemas mais significativos dos últimos séculos, devido ao crescimento das atividades industriais. Os efluentes industriais que contêm metais pesados são as principais fontes de contaminação da água e do solo, deixando a população exposta a tais contaminantes, porém o uso destes metais torna-se um recurso valioso para diferentes aplicações industriais (MOORE, 1990).

A poluição por metais pesados representa um importante problema ambiental devido aos potenciais efeitos tóxicos destes, assim como sua acumulação na cadeia alimentar, o que pode ocasionar problemas ecológicos e de saúde a população humana. Dentre os diversos efeitos causados, pode-se destacar o bloqueio de grupos funcionais de enzimas vitais assim como, dano ao fígado, ossos e nervos e até mesmo problemas reprodutivos e cancerígenos (PAMPHLETT; EWAN, 1996).

As principais fontes de poluição do solo e da água por metais pesados são a mineração, indústrias de moagem e de acabamento de superfície, as quais descarregam uma grande variedade de metais tóxicos, tais como Cd (Cádmio), Cu (Cobre), Ni (Níquel), Co (Cobalto), Zn (Zinco) e Pb (Chumbo) ao meio ambiente. Podem ser utilizadas várias técnicas para recuperação desses metais, dentre as quais a técnica físico-química que é cara, e a técnica de adsorção, que gera uma série de resíduos tóxicos secundários devido à utilização de alguns reagentes (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, técnicas de biorremediação de metais pesados utilizando-se de microrganismos tem sido bastante estudadas e aperfeiçoadas, não apenas como uma novidade científica, mas pelo seu grande potencial na degradação. Tais técnicas podem elevar a remoção simultânea de metais tóxicos, cargas orgânicas e outras inorgânicas, bem como permitir o desenvolvimento de espécies resistentes. A grande dificuldade na utilização de microrganismos é a sensibilidade de células vivas a extremos de pH ou à altas concentrações de metal no solo (VEGLIO BEOLCHINI, 1997).

A superfície da bactérias pode adsorver espécies catiônicas como os metais pesados, uma vez que as paredes celulares microbianas possuem vários grupos funcionais carboxílicos, hidroxílicos, sulfídricos e amino, que tem a capacidade de se ligar íons metálicos. A potencial capacidade de adsorção e afinidade das bactérias aos vários tipos de metais depende do tipo e densidade dos grupos funcionais associados com a célula. (MOORE, 1990)

Estudos na área de biotecnologia para o isolamento de cepas bacterianas ou fúngicas resistentes a metais pesados vem acontecendo e mostrando que cepas (bactérias, fungos)

isoladas de locais contaminados possuem excelente capacidade de limpeza de metal. Algumas cepas de bactérias possuem alta tolerância a diversos metais pesados e podem ser altamente potenciais na sua remoção em solos contaminados por dejetos industriais (CHAVES, 2008).

Os microrganismos evoluíram em vários mecanismos para responder a stresse por metais pesados, através de processos como transporte na membrana celular, a absorção pelas paredes celulares e aprisionamento em cápsulas extracelulares, precipitação, complexação, oxidação e reações de redução (CHAVES, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Ojetivo Geral

Isolamento e caracterização de microrganismos presentes em áreas contaminadas com chumbo e zinco no município de Barra Mansa, RJ.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o solo quanto aos teores pseudototais de Chumbo e Zinco;
- Identificar o isolado selecionado através de provas bioquímicas;
- Fazer a identificação molecular do isolado selecionado;
- Identificar o melhor pH, temperatura e fonte de carbono para o crescimento bacteriano e adsorção de Chumbo e Zinco;
- Verificar a redução de Pb e Zn no sobrenadante da cultura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudos demonstraram a importância dos microrganismos em benefício da humanidade iniciando-se em 1856 com trabalhos de Louis Pasteur. Porém, nem mesmo Pasteur imaginou o grande potencial dos microrganismos na solução de problemas, como a recuperação de áreas contaminadas (LEONEL, 2010).

Existem diversas alternativas para tentar minimizar problemas de contaminação ambiental, como por exemplo, o uso de técnicas de biorremediação, ou seja, processos que empregam organismos vivos e suas enzimas na biodegradação de compostos xenobióticos (compostos constituídos por moléculas estranhas ao ambiente natural, ou em concentrações maiores que as encontradas em solos não contaminados), visando a sua erradicação, redução ou transformação em substâncias menos tóxicas (LEONEL, 2010).

Em 1951, Brito (2005), formulou o princípio da divisibilidade da decomposição biológica anaeróbica dos resíduos sólidos, favorecendo a aplicabilidade dos microrganismos em escala industrial nos processos de biorremediação. Esta teoria foi precursora do princípio de duas fases proposto por Barker (1956) e Brito (2005) que estudando a fermentação bacteriana verificou que a matéria orgânica dos resíduos é primeiramente consumida por microrganismos formadores de ácidos. Como resultado dessa primeira fase, são gerados ácidos graxos, açúcares e outros compostos orgânicos de baixo peso molecular. Em seguida surge outra fase, onde os ácidos são consumidos por microrganismos formadores dos produtos finais, como metano e dióxido de carbono.

Existem diversos microrganismos que apresentam potencial metabólico, que são utilizados nos processos de biorremediação, dentre eles, gêneros de bactérias como *Azospirillum* sp, *Pseudomona* sp, *Alcaligenes* sp, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia* e de fungos como *Mucor*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete* e *Trametes* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), as rotas metabólicas da degradação dependem de um conjunto de fatores determinados pela estrutura química funcional do composto, da capacidade do microrganismo em promover a degradação e do ambiente, como tipo de solo, local alcançado pelo composto, que pode ser de difícil acesso pelo microrganismo, bem como as condições desse ambiente para o organismo envolvido.

Os estudos pioneiros em biorremediação visavam principalmente à degradação de matéria orgânica, muito comum em resíduos domésticos destinados a lixões e aterros sanitários (BRITO, 2005). Mais recentemente, estudos envolvendo biorremediação de compostos químicos de composição variada e elevado potencial de toxidez também apresentam grandes avanços (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Os problemas ambientais tem se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Dessa maneira, os problemas devido a ação antrópica tem atingindo dimensões catastróficas, podendo ser observados por meio de alterações de qualidade do solo, ar e água (KUNZ *et al.*, 2002).

3.1 O Solo

O solo constitui a camada mais superficial da crosta terrestre, que sofre transformações decorrentes de fatores climáticos, biológicos e por atividades antropogênicas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O solo é formado a partir da ação do intemperismo sobre rochas e minerais, cujo processo é conhecido por pedogênese. Dentre os fatores responsáveis por esse processo estão o clima, o relevo, o tempo e os microrganismos que agem sobre a rocha matriz originando o solo (JORDÃO *et al.*, 2001).

O solo é constituído pelas fases sólida, líquida e gasosa, sendo a fase sólida composta por partículas de diversos tamanhos, minerais, raízes de plantas, populações de macro e microrganismos e suas enzimas. Assim, o conjunto de todos os componentes da fase sólida leva à formação de micro-habitats ou micro-sítios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Com características singulares, o solo atua como um dreno para contaminantes e também como tampão natural, que controla o transporte de elementos químicos e outras substâncias para a biosfera (OLIVEIRA *et al.*, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O subsolo brasileiro possui importantes depósitos minerais, sendo parte desta reserva considerada expressiva quando comparada ao restante do mundo. O Brasil produz cerca de 70 substâncias, sendo 21 dos grupos de minerais metálicos como Chumbo (Pb), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Cobre (Cu) entre outros, 45 dos não metálicos entre os quais argila, gipsita entre outros e quatro dos energéticos (BARRETO, 2001).

A poluição do solo tem despertado o interesse dos especialistas, das autoridades e da sociedade. A preservação do mesmo é importante não só sob o aspecto ambiental, mas também de saúde pública. Por tradição, o solo tem sido utilizado como receptor de substâncias resultantes das atividades humanas, principalmente para a disposição final de resíduos, o que pode agravar os problemas do solo, como a erosão e o esgotamento dos minerais (GUNTHER, 2005).

A introdução de contaminantes no solo pode resultar na perda de algumas ou várias funções do mesmo e provocar a contaminação das águas subterrâneas. A presença de contaminantes no solo, originados de várias fontes, acima de certos níveis, provoca uma série de consequências negativas para a cadeia alimentar, podendo atingir os diversos ecossistemas e o homem (RODRIGUES; DUARTE, 2003).

A contaminação do solo é resultado de atividades antrópicas, incluindo processos industriais, atividades de mineração, sendo que essa causa maior impacto nos ecossistemas devido a alterações nas propriedades físicas, químicas e principalmente na redução da atividade biológica do solo (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). No Brasil, ocorrências de contaminação de solos por metais pesados nas proximidades de áreas industriais tem sido relatadas (ARTAXO *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000)

3.2 Metais Pesados

Os metais pesados compreendem 40 elementos com densidade superior a 5 g/cm^3 . A presença de metais pesados no ambiente ocorre de forma natural, podendo fazer parte de algumas funções fisiológicas de organismos vivos, tornando-se, neste caso, essencial quando em concentrações adequadas (CHAVES, 2008).

Alguns, como zinco e outros, em pequenas quantidades, são elementos essenciais ao crescimento tanto de organismos procariotos quanto de eucariotos (HUGHES; POOLE, 1989). No entanto, outros, como o cádmio, não possuem função biológica conhecida (GADD, 1992b) e são extremamente tóxicos, mesmo em concentrações muito baixas. Os efluentes das indústrias do setor mineral e metal-mecânico, em particular os efluentes de plantas de acabamento superficial, contêm alta concentração de metais dissolvidos. De acordo com Volesky (2001), os metais que mais preocupam e representam um risco ambiental são em

ordem de prioridade: cádmio, chumbo, mercúrio, cromo, cobalto, cobre, níquel, zinco e alumínio.

Segundo Chaves (2008) devido a processos como adsorção, dessorção, solubilização, precipitação, complexação e oxi-redução os metais pesados apresentam baixa mobilidade quando no solo, o que torna sua toxicidade reduzida. Dessa forma, podem fazer parte de uma diversidade de formas químicas. No entanto, a contaminação por metais pesados, decorrentes da ação antropogênica, promove um elevado teor de toxicidade e o acúmulo desses elementos na camada superficial do solo, comprometendo a microbiota natural responsável pela ciclagem de nutrientes (FRANCO *et al.*, 2004).

A mobilidade dos metais pesados depende da sua forma química e das suas ligações, ou seja, se estão solúveis em água como íons livres; se reagem com ácidos fracos; se estão ligados a carbonatos; óxidos, como de ferro e manganês; ligados à matéria orgânica ou na fração residual, alojados na matriz. Alterações nas condições físico-químicas, como alteração do potencial de oxirredução, diminuição de pH ou aumento da concentração dos ligantes orgânicos, podem mobilizar os metais pesados tornando-os mais disponíveis.

De acordo com Moreira e Siqueira (2006) a presença de metais pesados no solo interfere no pH, aumentando a acidez e levando à inibição da atividade de algumas espécies de microrganismos.

Segundo SHENG *et al.*, (2004), a dissolução de metais pesados que escapem no meio ambiente pode acarretar sérios problemas de contaminação. O controle das descargas de metais pesados e a remoção de metais tóxicos de rejeitos líquidos têm se convertido numa séria preocupação, especialmente para as indústrias químicas.

Os metais tendem a acumular-se nos ecossistemas devido a sua fácil assimilação na cadeia alimentar dos seres vivos. O aumento da concentração destes metais pesados lançados ao meio ambiente por processos industriais, como extração de minério, tem sérias conseqüências a saúde humana e ao bem estar dos seres vivos em geral (SHENG *et al.*, 2004; TUNALI *et al.*, 2006).

Nos seres humanos os efeitos tóxicos dos metais pesados resultam no bloqueio de grupos funcionais e substituição de metais essenciais, redução da taxa de crescimento, inibição enzimática, paralisação cerebral entre outros. Os metais mais perigosos são o mercúrio, chumbo, cádmio e o cromo, pois não desempenham nenhuma função biológica (BUENO, 2007; JAYARAM e PRASAD, 2009).

3.2.1 Metais Pesados no Solo

A presença de Metais Pesados nos solos pode ter origem natural, dependendo do material de origem sobre o qual o solo se formou dos processos de formação e da composição e proporção dos componentes na fase sólida do solo. A origem antrópica vem sendo discutida como a principal razão do aumento do metal pesado no solo, provocando distúrbios muitas vezes de difícil recuperação do ambiente (ABREU *et al.*, 2001).

A atividade industrial junto com o rápido crescimento populacional contribui para o aumento natural na concentração de íons metálicos, passando a representar uma importante fonte de contaminação de solos (BISINOTI *et al.*, 2004).

Os principais Metais Pesados presentes no solo e nos produtos utilizados na agricultura são Co, Cd, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn (ABREU *et al.*, 2001). Muitos desses elementos podem causar prejuízos em animais e plantas devido formação de complexos estáveis com biomoléculas, porém alguns elementos como Cr, Cu e Zn são importantes componentes funcionais e estruturais dos seres vivos por serem propensos a perderem elétrons com facilidade, formando íons com carga positiva, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas (BISINOTI *et al.*, 2004).

A presença dos metais pesados no solo é um dos fatores que influencia negativamente o processo de degradação da matéria orgânica existente, pois essa representa um papel fundamental na fertilidade do solo (PAGANINI *et al.*, 2004).

Os metais pesados podem expressar seu potencial poluente diretamente sobre os organismos do solo, pela disponibilidade as plantas e contaminação de águas superficiais, via erosão do solo, e de águas superficiais, por movimentação vertical descendente por perfil do solo (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Além dos impactos no funcionamento e biodiversidade do ecossistema, a contaminação do solo por metais pesado é uma séria ameaça à saúde humana. Ao contrário de poluentes orgânicos, estes não são biodegradáveis e tendem a se acumular nos organismos vivos através da cadeia alimentar, poluindo o meio ambiente e trazendo sérios problemas para o ser humano. Esses elementos exercem ações inibitórias, bloqueando a atividade de grupos funcionais e modificando as conformações ativas das moléculas biológicas (HASSEM *et al.*, 1998), podendo resultar em toxicidade aguda ou crônica, bem como mutagênese ou

carcinogênese. Entre os diferentes metais pesados, As (Arsênio), Pb (Chumbo), Hg (Mercúrio), Cd (Cádmio), Cu (Cobre), Ni (Níquel) e Zn (Zinco) são considerados os mais perigosos (CAMERON, 1992).

Em áreas de exploração de minerais metálicos, o processamento destes gera uma grande quantidade de rejeitos que podem ser fontes de contaminação ambiental decorrente da presença de metais pesados. A atividade mineradora, quando comparada a outras fontes de degradação do ambiente, como a agricultura e a pecuária, afeta diretamente apenas pequenas áreas, entretanto os elementos solubilizados desses rejeitos, se atingirem os cursos d'água, podem impactar negativamente áreas localizadas a centenas de quilômetros da mineração (SALOMONS, 1995).

Em áreas próximas a mineração, pode ser encontrada concentrações elevadas de metais pesados na cadeia trófica, devido à entrada desses elementos em solos agrícolas, cursos d'água e alimentos produzidos próximo a essas áreas, colocando em risco a população localizada próximo aos empreendimentos de mineração (PRIETO, 1998; JUNG, 2001).

No solo, os metais podem ser constituídos de partículas separadas, esta adsorvidos às partículas de solo formando um filme líquido ou sólido em torno delas, associar-se à fase orgânica, ou ocorrer como fases líquidas ou sólidas nos poros das partículas de solo (RULKENS *et al.*, 1998).

De maneira geral, a remediação não depende apenas da natureza constituinte do solo como o conteúdo de areia e argila, o tamanho das partículas e o percentual de matéria orgânica, mas também das propriedades dos poluentes envolvidos como a volatilidade, solubilidade em água ou em solventes orgânicos, instabilidade química e térmica, biodegradabilidade, comportamento de adsorção e absorção, características magnéticas ou elétricas, de superfície, tamanho, forma e de densidade das partículas (RULKENS *et al.*, 1998).

Nos países das regiões oeste, central e leste da Europa, por exemplo, a poluição do solo constitui grave problema ambiental, mas, de maneira mais recente, os sedimentos poluídos também são motivo de grande preocupação para a sociedade (RULKENS *et al.*, 1998). Contudo, são escassas as opções de tratamento de sedimentos dragados em relação a outros resíduos (FÖRSTNER & CALMANO, 1998).

Na Inglaterra, diversos casos de envenenamento de crianças por Pb foram atribuídos ao contato freqüente delas com solo altamente contaminado, devido ao hábito de brincarem e

levarem as mãos à boca (BLOEMEN *et al.*, 1995). O continente sul-americano, por sua vez, também enfrenta a grande ameaça da poluição do solo, sendo que no Brasil a contaminação do solo por poluentes industriais como os organoclorados (MATHEUS *et al.*, 2000) e os metais pesados (CORUMBATAÍ NEWS, 1999a; JORDÃO *et al.* 1999; BONACIN SILVA, 2001) geralmente ocorreu devido à disposição inadequada de resíduos ou a ausência de controle na emissão de poluentes, como em muitos outros países do mundo.

Devido à ação negativa dos metais pesados na saúde humana e nos demais seres vivos, o desenvolvimento de tecnologia para remediar solos contaminados tem recebido grande destaque nos últimos anos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). A restauração da vegetação em locais com acúmulo de metais pesados pode ser facilitada pela ação de agentes imobilizantes, ou amenizantes que reduzem a disponibilidade destes metais tóxicos (RIBEIRO-FILHO *et al.*, 2011), representando um tratamento químico de grande importância para a recuperação destas áreas de mineração.

3.2.1.1 Chumbo (Pb)

O Pb está classificado na tabela periódica como o 82º dos elementos, possui massa atômica 207,2, densidade de 11,35 g mL⁻¹ e ocorre nos estados de oxidação 2 e 4. Embora ocorram variações, o Pb²⁺ apresenta 119 pm (picômetros, 10⁻¹² m) de tamanho de raio iônico e o Pb⁴⁺ 78 pm (NIEBOER; FLETCHER, 1996). O chumbo provém principalmente da galena (PbS), mineral que tem prata comumente como impureza, podendo conter também zinco, cádmio, antimônio, bismuto e cobre. Por alteração, a galena se converte em anglesita (PbSO₄), cerussita (PbCO₃) e outros compostos (CLEMENS; CARITAT 1998).

Segundo Alleoni e Camargo (1995), o chumbo é também encontrado adsorvido em óxidos-hidróxidos e minerais de argila. Solos com intenso processo de intemperismo contêm acúmulo de óxidos de ferro (hematita e goethita) e alumínio (gibbsita), além de minerais de argila (silicatos de alumínio hidratados) como caulinita, vermiculita, illita, montmorilonita e paligorskita. As cargas variáveis destes solos (carga superficial negativa dos óxidos de Fe e Al) atraem eletrostaticamente cátions metálicos como Cr, Cd, Zn, Co e Pb, podendo estes serem adsorvidos pelos óxidos-hidróxidos de Fe e Al (MOREIRA, 2004). A estabilidade da adsorção está relacionada com o pH da solução e concentração do metal pesado.

De acordo com Chen *et al.*, (2007) e Cao *et al.* (2002), o chumbo se encontra nas frações: trocável + solúvel (5 a 12%), ligado à matéria orgânica (5 a 15%), residual (20 a 30%), ligado a carbonatos (10 a 40%) e ligado a óxidos de ferro e manganês (20 a 40%), dependendo da concentração de ligantes. É possível, portanto, esperar que grande parte do chumbo seja encontrada, no solo, em frações não móveis.

O chumbo é considerado um metal perigoso mesmo em pequenas concentrações no ambiente. Acumula-se nos tecidos vivos podendo alcançar concentrações muito elevadas, nos organismos vivos, o chumbo não apresenta nenhuma função metabólica conhecida (PEREIRA, 2004). O chumbo é um metal não essencial, por isso perigoso e muito tóxico para plantas e animais, não degradável, pode causar danos no sistema renal e reprodutor. A principal causa de intoxicação com chumbo é a exposição a vapores e poeiras dos seus compostos. Os sintomas de intoxicação são: desconforto intestinal, fortes dores abdominais, diarreia, perda de apetite, náuseas, vômitos e câibras (MARTINS, 2004).

O chumbo pode afetar quase todos os órgãos e sistemas do corpo, mas o mais sensível é o sistema nervoso, tanto em adultos como em crianças, além do sistema nervoso este elemento tem a capacidade de inibir ou imitar a ação do cálcio e de interagir com proteínas (MOREIRA; MOREIRA, 2004). O padrão de potabilidade para o chumbo estabelecido pela Portaria 518/04 é de 0,01 mg/L. (CETESB, 2009)

O chumbo é um metal presente em muitos produtos industriais como baterias, materiais fotográficos, tintas e pigmentos e na indústria automotiva, aeronáutica e do aço (JALALI *et al.*, 2002; SEKHAR *et al.*, 2004). A produção estimada para o ano 2000 foi de 5.000 t; é usado na indústria de baterias, na cobertura de fios elétricos, dentre outras aplicações (MARKERT, 1992).

A ampla utilização do chumbo em diversos processos industriais gera efluentes altamente contaminados. Diante desse quadro faz-se necessário um tratamento adequado de modo a cumprir as normas de descarte. No Brasil o CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, estabelece para o chumbo concentrações máximas de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ em efluentes de qualquer fonte poluidora.

Após liberado no ambiente, o chumbo tem um tempo de persistência muito grande, quando comparado a outros poluentes permanece acessível à cadeia alimentar representando grande perigo para plantas e animais (SAMPAIO, 2003).

A Organização Mundial de Saúde recomenda uma concentração máxima de $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ de chumbo na água para consumo (WHO, 2006). O chumbo causa principalmente danos renais e neurológicos (MORTON, 1999).

No Brasil o abastecimento de chumbo é feito através da importação de metal e da produção de chumbo secundário oriundo principalmente da reciclagem de baterias (a grade das baterias tem 95% de chumbo em sua composição). As reservas nacionais de minérios de chumbo são pequenas e de baixa concentração e a produção de chumbo primário foi paralisada com o fechamento da Plumbum Mineração e Metalurgia S/A (MATOS E FERREIRA, 2007).

3.2.1.2 Zinco (Zn)

Zinco (Zn) é o metal de número atômico 30 e o 23º elemento mais abundante na Terra, sendo encontrado em praticamente todos os ambientes (CHANEY 1993, BROADLEY *et al.* 2007). Sua forma natural de entrada no substrato é através do intemperismo físico ou químico da rocha matriz do solo, se apresentando como Zn orgânico e inorgânico, e está disponível principalmente como Zn^{2+} ou complexado com ligantes orgânicos (SANTOS 2005, BROADLEY *et al.* 2007).

Provavelmente a primeira contaminação do solo por Zn, foi por antigas metalúrgicas do mediterrâneo 20 d.C., e mais tarde no século XIII, por metalúrgicas indianas (CHANEY 1993). Atualmente, a contaminação advém de atividades de mineração em solos agrícolas tratados com lodo de esgoto, especialmente em solos de pH baixo, onde o metal é melhor absorvido (BROADLEY *et al.*, 2006).

Chen *et al.* (2007) estudaram a mobilidade do zinco em solo (0-20 cm) da província de Qiyang, China. Para os autores, o estudo do zinco mostrou que está presente: 9-17% na fração orgânica, 10-18% ligado a carbonatos, 10-18% na fração solúvel + trocável, 20-30% ligado a óxidos de ferro e manganês e 25-45% na fração residual. Portanto, a maior parte do zinco mostrou-se imóvel.

É considerado um elemento essencial para a saúde do ser humano, sendo que a sua participação em diversos processos metabólicos. Contudo, poderá existir uma potente toxicidade gastrointestinal por causa de uma constante acumulação deste metal no corpo humano (WALSH *et al.*, 1994).

O Zinco é um dos metais mais encontrados nos efluentes das indústrias de galvanização, eletrodeposição, chapeamento (por meio de eletrólise), fábricas de baterias e outras indústrias metalúrgicas. Na sua forma metálica, tem uma limitada biodisponibilidade e não apresenta nenhum risco ecológico. Entretanto, o Zinco pode reagir com outras substâncias químicas, como ácidos e oxigênio, para formarem compostos que podem se tornar potencialmente tóxicos (RADHIKA *et al.*, 2006). Além disso, o zinco pode apresentar sérios riscos à saúde humana, se ingerido além do recomendado (100-300 mg Zn/dia), como: náuseas, vômito, problemas gastrointestinais, letargia, fadiga e alterações na resposta imune (FOSMIRE, 1990).

O zinco ocorre em vários minerais e em diferentes formas como sulfetos ou carbonatos de zinco. Pode ser encontrados em baterias, fertilizantes, tintas, plásticos, borrachas entre outros, sendo utilizados na composição de cosméticos na forma de pós, bases faciais, produtos farmacêuticos e em complexos vitamínicos (MOORE E RAMAMOORTHY, 1984; LESTER, 1987). Este metal é geralmente encontrado na natureza como sulfeto, muitas vezes associado a sulfetos de outros metais como o Pb, Cd, Cu e Fe. Pode também ocorrer como carbonato, silicato e hidróxido. A adsorção do zinco pelos sedimentos é maior nas frações mais finas e influenciada pelo aumento do pH e da temperatura (OLIVEIRA, 2007).

Esse elemento é um micronutriente essencial para os organismos, por ser um componente estrutural de muitas proteínas, além de ser particularmente indispensável para o crescimento das plantas (CHANEY 1993; LI *et al.*, 2002). Sendo assim, a deficiência de Zinco pode reduzir a produtividade de grãos e debilitar a resistência dos cereais a doenças, diminuir a qualidade nutricional dos grãos; redução drástica da síntese protéica (devido a relação com a atividade da RNAase); causa retardo e redução no crescimento; folhas pequenas e mal conformadas; entre nós curtos; formação de folhas em roseta; clorose internerval (devido a participação do Zn na formação de clorofila), além de necrose no meristema apical da raiz (BROADLEY *et al.*, 2007; MARENCO E LOPES 2009).

3.3 Bactérias e Metais Pesados no Solo

A comunidade microbiana tem sido relacionada com a qualidade do solo, porém existe a necessidade de investigação das interações e atividades metabólicas dos microrganismos nos processos ecológicos e do solo (TAYLO *et al.*, 2002).

No solo podem ser encontrados vários tipos de organismos, e dentre eles, bactérias, fungos, bem como protozoários de vida livre. Os microrganismos do solo são componentes essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, sendo fundamentais no processo e decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). As atividades dos microrganismos estão baseadas em sua diversidade metabólica e a adaptabilidade genética, o que torna esses microrganismos uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico (KUTBOKE *et al.*, 2004).

Comunidades microbianas podem ser afetadas qualitativamente e quantitativamente quando em contato com metais pesados. Alguns estudos demonstram que os metais influenciam os microrganismos afetando o seu crescimento, morfologia e metabolismo, resultando num decréscimo de biomassa (ELLIS *et al.*, 2003). Além dos efeitos tóxicos diretos, os metais podem exercer uma seleção na comunidade microbiana, resultando na presença de microrganismos mais tolerantes nas áreas impactadas comparados com os presentes no solo não contaminados, sendo que esta seleção pode conduzir ao estabelecimento de populações resistentes aos metais (PEREIRA *et al.*, 2006). Nos últimos anos, alguns trabalhos foram referenciados a respeito do aumento da tolerância a metais pesados e bactérias isoladas de locais contaminados (CARRASCO *et al.*, 2005; PEREIRA; LIMA; FIGUEIRA, 2006).

Estudos de Costa e Dutra (2001), demonstraram a existência de bactérias biodegradadoras presentes em amostras de solo, como é o caso da aplicação de *Bacillus subtilis* na remoção de metais como Chumbo, Zinco, Cobre, Prata e Cádmio, assim como estudos de Beveridge e Murray (1976), indicam que a presença *Bacillus subtilis* no solo proporciona biodegradação do Magnésio, Ferro, Sódio, Potássio, Manganês, Mercúrio, Cobalto, Bário e Alumínio. Microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* são amplamente distribuídos em sistemas naturais como solos, águas e sedimentos marinhos, sendo que alguns deles foram relatados como potenciais redutores de Fe (SCHEID *et al.*, 2004).

Outras bactérias têm apresentado um crescente interesse como organismo modelo, devido à sua resistência, para detoxicação de elementos-traços e para fins biotecnológicos (ROZYCKI; NIES, 2009). Estão relatadas na literatura resistências da bactéria *Cupriavidus metallidurans* a diversos elementos sendo que, nessa bactéria, foram identificados genes de resistência em elementos traços como Ni (II), Cu (II), Zn (II), entre outros. Cepas da bactéria *Ochrobactrum anthropi*, apresentam interesse particular para biorremediação, pois são capazes de degradar solventes tóxicos, resíduos de petróleo e, também de remover Cr, Cd, Cu e outros metais tóxicos do ambiente (CHENG *et al.*, 2010). A bactéria *Geobacter metallireducens* é uma das mais estudadas, pois foi um dos primeiros microrganismos que mostrou capacidade de oxidar, completamente, compostos orgânicos a dióxido de carbono, utilizando óxido de Fe(III) comoceptor de elétrons (LLOYD, 2003).

Segundo Lower *et al.*, (2001), *Shewanella oneidensis* MR-1, também é considerado um modelo de estudo, essa é uma bactéria anaeróbica facultativa encontrada em solos, sedimentos e meios aquosos (doces e marinhos), com capacidade para conservar energia para o crescimento utilizando oxigênio ou Fe (III) comoceptor final de elétrons. Essa bactéria *Shewanella oneidensis* é um microrganismo de uso potencial na biorremediação de sítios contaminados com metal pesado e metalóides, devido sua versatilidade metabólica, bem como sua capacidade de afetar o estado redox dos metais (MARSHALL *et al.*, 2006).

A degradação de substâncias xenobióticas por microrganismos presentes no solo depende da presença de várias enzimas que realizam metabolismo para seu crescimento, e dessa forma conseguem remediar os compostos químicos, reduzir as concentrações presentes no ambiente ou torná-los menos tóxicos. Dentre os microrganismos envolvidos neste processo estão presentes representantes dos eucariotos e procariotos de vários gêneros. O emprego de consórcios de microrganismos é viável, podendo proporcionar uma completa degradação dos contaminantes. Dessa forma microrganismos que não apresentam potencial para degradar completamente determinado composto, poderão transformá-lo em uma substância degradável por um segundo microrganismo.

As bactérias frequentemente participam do tratamento biológico de efluentes e também tem sido testada como biossorvente na remoção de metais pesados. Cabuk *et al.*, (2006) estudou as propriedades da bactéria *Bacillus* sp. no processo de biossorção de chumbo em coluna de leito fixo e obteve capacidade máxima de biossorção com pH inicial de 4,0, sua investigação também revelou que o comprimento da coluna e a vazão afetaram o processo de

biossorção. Sannasi *et al.* (2005) estudaram a utilização de uma cultura bacteriana mista para remover Cr (VI), Cu (II) e Pb (II) em solução aquosa. Os dados experimentais mostraram que a capacidade máxima de sorção é dependente do pH inicial da solução. O pH afeta a atividade dos grupos funcionais da superfície celular e as propriedades de ligação desses com os metais.

Segundo Azevedo (2008), os metais pesados, quando em excesso, são tóxicos a maioria dos microrganismos, devido a sua natureza fortemente iônica, que os torna capazes de se ligar a muitos constituintes celulares deslocando assim, alguns metais essenciais da célula microbiana de seus sítios de ligação. Esses elementos podem romper proteínas por meio de ligação aos grupos sulfidril, e ácidos nucléicos, aos grupos hidroxil e fosfato. Os microrganismos geralmente utilizam vias de transporte específicas para levar esses elementos da membrana celular ao citoplasma. (MELO; AZEVEDO, 2008)

A adaptação microbiana é um importante mecanismo de resposta a presença de contaminantes no solo, e pode resultar na compensação de um efeito adverso por meio do aumento da atividade da microbiota restante. Isso também ocorre na presença de metais, quando os microrganismos os transformam em formas menos tóxicas, imobilizando-os na superfície das células ou em polímeros intracelulares, por precipitação ou biometilação (MELO; AZEVEDO, 2008).

Alguns microrganismos são capazes de afetar a especiação dos metais, devido a sua capacidade efetora ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização, que influencia no equilíbrio das espécies metálicas entre as fases solúveis e insolúveis. A mobilização dos metais e a passagem de um estado insolúvel inicial, ou seja, metais na forma de sulfetos ou óxidos metálicos, correspondente a uma fase sólida, para um estado solúvel final aquosa (PÉREZ, 2006). Os microrganismos podem mobilizar os metais através da lixiviação autotrófica e heterotrófica, quelação por metabólitos e sideróforos, metilação, que pode resultar na volatilização. Esses processos podem levar a uma dissolução de componentes metálicos e minerais insolúveis, incluindo os óxidos fosfatos e sulfetos (GADD, 2004).

A maioria das interações metais-microrganismos tem sido significativas para remoção, recuperação ou detoxificação de compostos orgânicos e inorgânicos poluidores. Nesse contexto, a solubilização pode tornar possível a remoção desses compostos de matrizes sólidas, como solos, sedimentos, lixo e rejeitos industriais. Alternativamente, os processos de imobilização podem tornar possível que metais sejam transformados *in situ*, numa forma insolúvel e quimicamente inerte, e também são aplicáveis para remover metais em soluções

aquosas (GADD, 2004). Outro importante mecanismo de resposta à presença de contaminantes é a oxidação do metal pesado presente no solo. Já se sabe que ela pode ocorrer de forma química ou biológica. Existem estudos em que foram observadas bactérias capazes de promover essa oxidação, na presença de matéria orgânica, sem obtenção de energia nesse processo (CARDOSO *et al.*, 1992).

Conforme Tabela 1, existe uma diversidade de microrganismos viáveis a serem aplicados em processos de biorremediação, dentre eles destacam-se as bactérias, em decorrência da sua maior velocidade de crescimento em comparação a de fungos, quando em condições favoráveis (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* KUCD1 apresentou eficiência na remoção de cádmio de água em condições aeróbicas *in vitro*, por meio do acúmulo desse metal em sua membrana eperiplasma, observado por fracionamento celular. As bactérias provocam a detoxificação dos metais, isso demonstra potencialidades para utilização na biorremediação de ambientes contaminados (SINHA; MUKHERJEE, 2009).

Em um estudo com isolados de bactérias, Conceição *et al.*, (2007) obtiveram organismos com elevada resistência à concentração de 750 mg.L⁻¹ de cromo hexavalente assim como adaptados às variações do ambiente como temperatura e pH. Bactérias como *Bacillus subtilis*, *Citrobacter* sp e *Streptomyces longwoodensis* foram as que tiveram posição de destaque.

Tabela 1: Microrganismos com capacidade de acumular Metais Pesados

Biossorvente	Metal	RM/mg/g	Referências
Bactéria	Cu	9	Brierley <i>et al.</i> , 1987
<i>Bacillus subtilis</i>	U	85	Nakajima, 1986
Levedura : <i>Saccharomyces cerevisial</i>	Cd	9	Norris & Kelly, 1977
	U	140	
Fungo: <i>Rhizopus arrhizus</i>	Pb	165	Tsezos & Volesky, 1981
	Au	100	
Microalga	Cd	220	Brierley <i>et al.</i> , 1987
<i>Chlorella vulgaris</i>	Au	500	Darnall <i>et al.</i> , 1986
Macroalga	Cu	23	Costa <i>et al.</i> , 1995
<i>Sargassum natans</i>	Cu	41	Volesky, 1990; Kratochvil & Volesky, 1998
Macrófitas aquáticas	Sd	Sd	Schneider <i>et al.</i> , 1995
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cu	30	Schneider <i>et al.</i> , 1994
<i>Potamogeton lucens</i>	Cu	50	
Subprodutos agrícolas, cascas de árvores e serragem	Cu, As, Hg, Zn	20-40 40-60	Gaballah <i>et al.</i> , 1993, 1995, 1996
RM – Remoção do metal, mg/g Sd – sem dados			

Fonte: Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados, OLIVEIRA *et al.*, (2008).

Sabe-se que fungos filamentosos e leveduras possuem a capacidade de acumular micronutrientes, tais como Cu, Zn, Co, Cr e Mn e metais que não fazem parte da sua dieta nutricional como U, Ni, Cd, Sn e Hg, em quantidades maiores do que as do requerimento nutricional, no que tange aos primeiros. Sabe-se também que existem parâmetros importantes para estimular o processo de remoção com microrganismos, dentre os quais podemos destacar: a fonte de carbono, a temperatura e o pH. (SINHA e MUKHERJEE, 2009).

É importante dizer que o pH do meio afeta o processo adsorptivo e/ou bioacumulativo, uma vez que influencia a disponibilização ou não do metal na sua forma solúvel, bem como

interfere na carga da superfície microbiana. Observa-se que, para alguns microrganismos, a elevação do pH favorece a remoção de metais como o Cu e Zn, por exemplo. No entanto, o emprego de valores de pH acima de 5 promoveria a precipitação do cátion, inviabilizando a sua remoção. Por outro lado, o abaixamento do pH conduziria à obtenção de biomassas carregadas positivamente devido à alta concentração de prótons, inibindo, concomitantemente, a ligação dos íons metálicos, por causa da repulsão de cargas (GADD, 2004).

As espécies de *Acidithiobacillus* estão entre os organismos mais estudados, pois são capazes de suportar condições ambientais extremamente agressivas (pH = 1); produzem uma solução muito ácida, que é capaz de dissolver a maioria dos metais; são tolerantes a elevadas concentrações de metais pesados; utilizam uma de fonte de energia de baixo custo, se comparado a outros microrganismos quimiorganotróficos (HERBERT JR, 1999).

A bactéria *A. ferrooxidans* pertence o grupo dos organismos quimiotróficos, tem forma de bastonete, mede entre 0,5 – 1,0 μm , não produz esporos, é gram negativa e acidófila, sua fisiologia é baseada na fixação de CO_2 , onde retira o carbono, obtêm energia através da oxidação do Fe^{2+} ou composto reduzidos de Enxofre (HERBERT JR, 1999).

3.4 Biorremediação

A remediação de um solo contaminado com cátions metálicos tóxicos tem empregado, convencionalmente, técnicas que incluem a escavação e o depósito em aterros sanitários ou, ainda, o recobrimento do sítio contaminado. Essas tecnologias tradicionais, além de não serem capazes de remediar realmente os solos, são muito caras (MULLIGAN *et al.*, 2001). Recentemente, a busca por tecnologias inovadoras tem sido direcionada para a aplicação da biorremediação. Por esse motivo, as tecnologias que utilizam microrganismos e biossorbentes, de um modo geral, para remover metais pesados a partir de esgotos têm sido largamente estudados (BRUINS *et al.*, 2000; SAĀ *et al.*, 2003).

A biorremediação é uma técnica de despoluição de ambientes contaminados baseada na aceleração do processo natural de biodegradação de determinadas substâncias no meio ambiente. O processo dependente de algumas condições ambientais como, temperatura, presença de oxigênio e nutrientes, e pH (COELHO, 2005).

Essa técnica de limpeza usa microrganismos ou processos microbianos para reduzir a concentração e/ou a toxicidade de determinados poluentes acelerando o processo de biodegradação (ATLAS, 1981). Por tanto, pode se considerar que a biorremediação é a otimização da biodegradação, sendo que esta aceleração pode ser de três principais tipos: pela adição de fertilizantes (bioestímulo), pela introdução de microrganismos (bioaumento), ou ainda através da atenuação natural monitorada (biorremediação intrínseca).

A utilização da técnica de biorremediação foi descoberta através de pesquisas que investigavam a degradação de hidrocarbonetos no ambiente natural, nas quais foram identificados alguns microrganismos capazes de usar tais hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia (ZOBELL, 1946; ATLAS, 1981). Mas, só após a análise dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo de biodegradação que a técnica passou a ser aplicada na limpeza de ambientes contaminados por óleo (LINDSTROM *et al.*, 1991).

Essa biotecnologia vem sendo utilizada, há alguns anos, em vários países e, em certos casos, apresentam menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizadas em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (BANFORTH; SINGLETON, 2005).

Os microrganismos possuem uma longa convivência com os metais, sendo isto comprovado pela quantidade de metais divalentes e de transição presentes no centro ativo de uma série de enzimas (LOVLEY; COATES, 1997; CAMARGO *et al.*, 2007). Quando em excesso, os microrganismos desenvolveram mecanismos que permitem a sua sobrevivência na presença desses metais (SILVER; PHUNG, 2005).

Os principais mecanismos de resistência e tolerância a metais são os seguintes: biossorção, precipitação, biomineralização, reações/transformações, proteínas ligantes, sideróforos, biossurfactantes (NIES; 1999; CAMARGO *et al.*, 2007). Esses mecanismos são conferidos por plasmídeos ou transposons, podendo ser elementos facultativos ou acessórios, sem que isso afete sua viabilidade. Entretanto, sua presença pode conferir as células hospedeiras características fenotípicas adicionais ambientais, como por exemplo, a capacidade de sobreviver em ambientes contaminados (VERMELHO *et al.*, 2009).

A biorremediação pode ser utilizada para tratar as contaminações de hidrocarbonetos, solventes, orgânicos halogenados, compostos orgânicos halogenados, não clorados pesticidas

e herbicidas, compostos nitrogenados, metais (chumbo, mercúrio, cromo), radionuclídeos (EPA, 2005).

Estudos vem mostrando uma grande diversidade de microrganismos que absorvem metais pesados como Ferro, Cádmio, Manganês, Zinco, Chumbo e outros, presentes em amostras de solo, sedimentos, água doce ou marinha que ocorrem naturalmente nesses ambientes. (GADD, 2000; XIANG *et al.*, 2000; BARKAY; SCHAEFFER, 2001; CHEW *et al.*, 2001; COLLA *et al.*, 2008;).

O mecanismo bioquímico microbiano não consiste na degradação do átomo contaminante, mas na mudança do estado de oxidação do metal, permitindo a sua detoxificação. Independentemente das reações que ocorrem, provavelmente, o metal ainda permanecerá no local, pois sabe-se que as bactérias possuem capacidade para concentrar ou remover os mesmos, seja em forma de precipitados ou de substâncias voláteis, transformando as espécies em compostos menos tóxicas e mais facilmente disponíveis. Em outras palavras, os microrganismos podem apenas alterar a especiação dos contaminantes e convertê-los em formas não-tóxicas (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Segundo Piana (2001), esta troca no estado de oxidação permite que várias estratégias de biorremediação sejam seguidas: a) Metal se torna menos solúvel e precipita o que permite que esteja menos disponível para os organismos do ambiente. b) Torna-se mais solúvel, o que facilita sua remoção pela permeação através da sua membrana celular. c) Permite que possa haver uma volatilização do elemento e/ou do composto. d) Converte-se em um produto menos tóxico para os organismos do meio.

Microrganismos como o gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e, ainda, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* exibem resistência a metais tóxicos, o que proporciona o seu desenvolvimento em meios com altas concentrações desses elementos (BLUMER, 2002).

Vários estudos vem mostrando a existência de bactérias biodegradadoras presentes em amostras de solo, como é o caso da aplicação de *Bacillus subtilis* na remoção de metais como Cobre, Prata, Zinco e Cádmio (COSTA; DUTRA, 2001). Estão relatadas na literatura resistências da bactéria *Cupriavidus metallidurans* a diversos elementos sendo que, nessa bactéria foram identificados genes de resistência em metais pesados como Níquel, Ouro, Zinco entre outros. Outras bactérias tem apresentado um crescente interesse como organismos modelo, devido a sua resistência, para a detoxicação de metais pesados e para fins biotecnológicos (ROZYCKI; NIES, 2009).

Cepas de bactérias *Ochrobactrum anthropi*, apresentam interesse particular para biorremediação, pois são capazes de degradar solventes tóxicos, resíduos de petróleo e, também de remover Chumbo, Cromo e outros metais tóxicos do ambiente (CHENG *et al.*, 2010).

Segundo Piana (2001), esta troca no estado de oxidação permite que várias estratégias de biorremediação sejam seguidas, tais como o metal se torna menos solúvel e precipita o que permite que esteja menos disponível para os organismos do ambiente; torna-se mais solúvel, o que facilita sua remoção pela permeação através da sua membrana celular; permite que possa haver uma volatilização do elemento e/ou do composto e converterem-se em um produto menos tóxico para os organismos do meio.

Investigações do mecanismo de adsorção de metais tóxicos mostram que os íons metálicos são capturados por diferentes mecanismos, como troca iônica, complexação e adsorção dos grupos funcionais presentes na parede celular (RAO, 2006). Os grupos funcionais como cetonas, aldeídos, carboxilas, presentes na parede celular desses microrganismos, são responsáveis pela captação de metais tóxicos. Recentemente, têm-se dado importância à remoção de íons metálicos em soluções contendo dois ou mais espécies metálicas (SÁNCHEZ *et al.*, 1999; USLU; TANYOL, 2006; SHARMA *et al.*, 2009). A presença de mais de um íon metálico pode afetar de maneiras diferentes a eficiência do processo.

3.5 Mecanismos de captação dos metais

São os mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com os metais, captando-os do solo.

Mobilização

A mobilização dos metais é a passagem de um estado insolúvel inicial (metais na forma de sulfetos ou óxidos metálicos, por exemplo), correspondente a uma fase sólida, para um estado solúvel final em fase aquosa (PÉREZ, 2006). Os mecanismos empregados pelos microrganismos podem mobilizar os metais por meio de lixiviação autotrófica e heterotrófica, de quelação por metabólitos e sideróforos microbianos e, ainda, pela metilação, que pode

resultar em volatilização. Esses processos podem levar a uma dissolução parcial ou completa de componentes metálicos e minerais insolúveis, incluindo-se nesta condição os óxidos, fosfatos e sulfetos (GADD, 2004).

a) Lixiviação heterotrófica

Ainda segundo Gadd (2004), os microrganismos podem acidificar seu ambiente pelo efluxo de prótons via as H⁺-ATPases da membrana plasmática, responsáveis pela manutenção do equilíbrio, ou como um resultado da acumulação do dióxido de carbono respiratório. A acidificação pode levar à liberação dos metais por uma série de rotas. O metabolismo heterotrófico como resultado do efluxo de ácidos orgânicos e sideróforos, também podem conduzir à lixiviação. Os ácidos orgânicos podem fornecer suporte tanto para os prótons quanto para os ânions dos complexos metálicos. Os ânions dos citratos e dos oxalatos podem formar complexos estáveis com um grande número de metais.

Muitos citratos de cátions metálicos são altamente móveis e não são facilmente degradáveis. O ácido oxálico também pode atuar como um agente lixiviante para os metais que formam complexos de oxalatos solúveis, incluindo Al e Fe. Ultimamente, tem sido demonstrada uma lixiviação efetiva numa variedade de rejeitos, como, por exemplo, solos e lama, filtros de óxidos e poeira, cinzas e materiais de rejeitos eletrônicos (GADD, 2004).

b) Lixiviação autotrófica

A lixiviação autotrófica é, em geral, realizada por bactérias quimiolitotróficas e acidofílicas, que fixam o dióxido de carbono e obtêm energia da oxidação de íons ferrosos ou de compostos de enxofre reduzidos. Estes causam a solubilização dos metais por causa da produção de Fe (III) e H₂SO₄.

Os microrganismos envolvidos incluem as bactérias sulfatooxidantes como, por exemplo, *Acidithiobacillus thiooxidans*, bactérias ferro e sulfato-oxidantes, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bactérias ferro-oxidantes, como a *Leptospirillum ferrooxidans*.

Como resultado da oxidação do enxofre e do ferro, os sulfetos metálicos são solubilizados com o decréscimo do pH do ambiente, resultando, então, na solubilização de

outros componentes metálicos. Essa lixiviação de sulfetos pelas espécies de *Acidithiobacillus* e outras bactérias acidofílicas, já está bem estabelecida numa escala industrial.

No contexto da biorremediação, a produção autotrófica de ácido sulfúrico também foi usada para solubilizar metais a partir de lama de esgoto e solos. Assim, bactérias oxidantes de enxofre foram usadas para acidificar um solo e solubilizar metais tóxicos, num processo de dois estágios, sendo a remoção dos metais efetivada a partir da lixívia contaminada com metal (GADD, 2004).

c) Sideróforos

Os sideróforos apresentam moléculas de baixo peso molecular, sendo considerados agentes quelantes, são ion-férrico específicos, produzidos por microrganismos que crescem em ambientes de baixa concentração de ferro (BENITE et al., 2002). Essas moléculas são excretadas pelos microrganismos para auxiliar na assimilação do ferro (GADD, 2004). O papel desses compostos é remover ferro do ambiente e tornar esse elemento químico essencial, disponível para a célula microbiana (BENITE et al., 2002). A assimilação de ferro pode ser melhorada pela ligação com compostos de ferro, como, por exemplo, óxidos de ferro, o que facilita o contato com o substrato de ferro. Embora, primariamente produzidos para obtenção de ferro, os sideróforos também são capazes de se ligar a outros cátions, como o magnésio, manganês, cromo (III), gálio (III) e radionuclídeos, como plutônio (IV). Um método para o tratamento de solo arenoso contaminado por metais é a solubilização de metais mediada por sideróforos, produzidos por *Alcaligenes eutrophus*. Uma vez solubilizados, os metais podem ser absorvidos e/ou precipitados na biomassa, sendo a seguir separada da polpa por floculação (GADD, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

O isolamento foi realizado em solo coletado em área de aproximadamente 4.500 m², próxima ao rio Paraíba do Sul, no bairro Ano Bom, Barra Mansa (RJ), nas coordenadas Lon. -22.539593e Lat. -44.150387, cujo local serviu, por décadas, como depósito de rejeitos industriais.



Figura 1: Área de coleta para isolamento de microrganismo.

Inicialmente, foi realizada uma avaliação das concentrações de Chumbo e Zinco no local, visando definir as áreas de maior contaminação para o isolamento microbiano. Foram definidos 7 pontos de coleta, abrangendo toda a área do terreno e nomeados como P1 a P7. Amostras de solo nesses pontos foram coletadas na profundidade de 0-20 cm, sendo acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o laboratório onde foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira de 450 μm de malha. Os teores pseudototais de Zn e Pb foram determinados utilizando como extrator água-régia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$), na proporção 3:1 de acordo com ISO 11.466 (1995) e, em seguida os extratos foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica com chama ar/acetileno (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações pseudototais de Chumbo e Zinco (mg.k^{-1}) nas amostras de solo na área de estudo.

Área	Zinco	Chumbo
P1	0,242	0
P2	1416,100	108,750
P3	1281,350	22,850
P4	1036,050	45,666
P5	777,183	33,650
P6	433,433	88,933
P7	1213,517	226,083

Considerando as elevadas concentrações de Zinco e Chumbo no ponto P7, esta área foi selecionada para coleta de amostras de solo para o isolamento microbiano.

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS TOLERANTES A CHUMBO E ZINCO

Na obtenção de microrganismos resistentes foi utilizada a técnica de isolamento direto. Para a realização do isolamento direto, 25 g de amostra de solo foi adicionada a um frasco com 225 ml de solução salina a 0,9% (NaCl), agitada por 60 minutos a 150 RPM em temperatura de 30°C. Posteriormente estas amostras foram diluídas até 10^{-4} , retirando-se 0,1 ml para o plaqueamento em ágar nutritivo suplementado com diferentes concentrações de Chumbo (35, 65, 150 e 300 ppm) e Zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por um período de 48 horas. As colônias foram purificadas por

repiques sucessivos em Ágar Nutritivo suplementado com Chumbo (35, 65, 150, 300 ppm) e Zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm). A composição do meio Ágar Nutritivo é composta por: Digestão péptica de tecido animal (5.00 g/L), extrato de levedura (1.50 g/L), extrato de carne bovina (1.50 g/L), cloreto de sódio (5.00 g/L) e Agar (15.00 g/L).

4.3 SELEÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO

Os isolados da segunda coleta foram crescidos em 50 ml caldo nutriente tamponado em diferentes soluções tampões, em pH 5.5 na temperatura de 30°C e suplementados com Pb (100 e 200 ppm) e Zn (400 e 800 ppm) por 72 horas com agitação constante de 150 rpm, para verificar o crescimento nesses diferentes tampões. Os tampões utilizados foram Ácido Bórico + Ácido Ortofosfórico; Acetato de Sódio; Tris-HCL; Citrato e Fósforo-Citrato.

4.4 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CHUMBO E ZINCO NO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS

Após o isolamento e escolha do Isolado D que apresentou maior crescimento em meio tamponado citrato pH 5.5, o isolado foi cultivado em frascos elermeyers contendo 100 ml de Meio Caldo Nutritivo e incubados durante 24 horas a 30°C a agitação de 150 rpm. Aliquotas desta cultura foram posteriormente inoculadas, para ter a DO/ml inicial 0,1, em 30 ml de Meio Caldo Nutritivo contendo 0 (controle), 35, 65, 150 e 300 ppm de concentração de chumbo e 0 (controle), 400, 800, 1600 e 3200 ppm de zinco e incubados a 30 °C em uma incubadora refrigerada com agitador rotativo a 150 rpm (TECNAL TE-421), sendo o crescimento monitorado por um período de 72 horas e analisado a cada 24 horas.

A cada 24 horas de crescimento uma alíquota de 2 ml da suspensão celular foi levada a uma micro centrífuga refrigerada, marca Novatecnica modelo NT 805, a velocidade de 10.000 rpm por 10 minutos com temperatura de 5°C. O precipitado constituído pelas células foi lavado três vezes com água destilada e levado a estufa na temperatura de 80°C para a determinação do peso seco.

4.5 EFEITO DO PH DO MEIO DE CULTURA NO CRESCIMENTO E ADSORÇÃO/REMOÇÃO DE CHUMBO E ZINCO PELO ISOLADO

Para verificar o efeito do pH na adsorção e remoção de Pb e Zn pelos isolados, estes foram cultivados em caldo nutriente tamponado com citrato adicionados de Zn (400, 800, 1600 e 3200 ppm) e Pb (35, 65, 150 e 300 ppm) em diferentes valores de pH (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 e 6.0) no experimento. O pH foi ajustado para o valor desejado com HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N. Foi adicionado uma aliquota do inóculo, para que tivesse uma DO/ml inicial de 0,1, em frascos contendo 50 ml de caldo nutriente nos diferentes valores de pH contendo diferentes concentração dos metais pesados Chumbo e Zinco e incubados a 35°C a 150 rpm. O crescimento foi analisado a cada 24 horas, durante 3 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados representados pelos valores médios.

4.6 EFEITO DA TEMPERATURA DO MEIO DE CULTURA NO CRESCIMENTO E ADSORÇÃO/REMOÇÃO DE CHUMBO E ZINCO PELO ISOLADO

Para avaliar o efeito da temperatura, foram inoculado 0,1 D.O/ml dos isolados em 100 ml de caldo nutriente (tampão citrato pH 5.5), adicionados de Zn (400, 800, 1600 e 3200 ppm) e Pb (0, 35, 65, 150 e 300 ppm). Os isolados foram incubados nas temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45°C, a 150 rpm, sendo analisadas a cada 24 horas, durante 3 dias.

4.7 EFEITO DE FONTE DE CARBONO ADSORÇÃO/REMOÇÃO EM CHUMBO E ZINCO

Para estudar os efeitos das fontes de carbono, foram utilizados o caldo nutriente pH 5,5 adicionados das seguintes fontes de carbono na concentração de 1%: glicose, sacarose, lactose, frutose. O crescimento do isolado na temperatura de 30°C durante 72 horas, a 150 rpm, com Chumbo na concentração de 300 ppm e Zinco na concentração de 3200 ppm, separadamente. O experimento foi realizado em triplicada e os resultados apresentados como valores médios \pm desvio padrão.

4.8 ANÁLISE DO CHUMBO E ZINCO RESIDUAL NO SOBRENATANTE DA CULTURA

Os isolados foram cultivados na presença de diferentes concentrações de chumbo (35, 65, 150 e 300 ppm) e zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm), durante 72 horas. A concentração residual de íons dos metais no sobrenatante foi determinada utilizando-se espectrofotometria de absorção atômica, com chama de acetileno em comprimentos de onda específicos para Chumbo e Zinco. O instrumento foi calibrado através da execução de soluções em branco e padrão antes da análise de cada elemento. A espectrofotometria de absorção atômica por chama é um método de análise para determinar a presença de elementos químicos em amostras líquidas. O método consiste em identificar o elemento de interesse por absorção de ondas de radiação ultravioleta. O elemento químico em estudo (metais) absorve um comprimento de luz específico que nenhum outro elemento absorve, passando para um estado excitado (absorção de energia), conseqüentemente aumentando o número de átomos presentes no caminho da radiação emitida. A quantidade específica de radiação absorvida pelos átomos da fonte de luz permite determinar a concentração do elemento de interesse no estudo (RODRIGUES *et al.*, 2012).

As análises de metais das amostras de solo, sobrenadante e massa celular foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas, da Universidade Federal Fluminense, Pólo Vila Santa Cecília, Volta Redonda.

4.9 ANÁLISE DO CHUMBO E ZINCO ADSORVIDOS NAS CÉLULAS

Para a análise do Chumbo e Zinco adsorvidos nas células foi realizada a metodologia de Digestão via úmida nitro-perclórica (NP), adaptado de ZasouskeBureau, (1977). À massa celular seca foram adicionados 3,5 mL de ácido nítrico P.A, a 25°C, ambiente termostaticado. Após repouso por uma noite, os tubos foram aquecidos em bloco digestor (80°C a 100°C), em capela, por aproximadamente 02 horas e 30 minutos, para evaporação do ácido utilizado para digestão. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de ácido perclórico P.A. e a temperatura foi gradativamente aumentada até atingir 200°C, procedendo-se a digestão até a dissipação de vapores emanados do tubo. Posteriormente, foram adicionados 10 ml de água deionizada à amostra mineralizada. As determinações de Zn e Pb foram feitas em Espectrofotômetro de

Absorção Atômica no Laboratório de Análises Químicas, da Universidade Federal Fluminense, Pólo Vila Santa Cecília, Volta Redonda

4.10 PROVAS BIOQUÍMICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO RESISTENTE AO CHUMBO E ZINCO

Para a identificação do isolado D, foram realizados os seguintes testes bioquímicos: Coloração de Gram (NEDER, 2000), Triple Sugar Iron Agar (HAJNA, 1945), Teste do Citrato (MURRAY *et al.*, 1940), Urease (HOGAN *et al.*, 1983), Catalase (SPECK, 1984), Indol (MURRAY *et al.*, 1940), Metil Red (CLARKE, 1941), Voges-Proskauer (MacFaddin, 1980), Hidrogênio Sulfite (PADRON, 1972), Litmus Milk (SKERMAN, 1959), Oxidase (MURRAY, 2007), Redução de Nitrato (COLLINS, 1969) e Fermentação de Carboidrato (DAVIS, 1955).

4.11 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO D

A identificação molecular foi realizada pela Fundação André Tosello, situada em Campinas, São Paulo.

Para a identificação molecular o DNA foi extraído com kit comercial (UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit - MoBio) segundo as instruções do fabricante. A amplificação do DNA alvo através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se deu por meio dos oligonucleotídeos iniciadores 27F (5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3') e 1492R (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACTT – 3').

Após corrida eletroforética em gel de TBE1X-agarose 1% (p/v), o produto foi purificado através do UltraClean® PCR Clean-Up Kit (MoBio). Após nova corrida eletroforética em gel de TBE1X-agarose 1% (p/v), o produto purificado foi quantificado, concentrado, alíquotado e acrescido do oligonucleotídeo (27F) utilizado para seqüenciamento. Este material, já alíquotado, foi seqüenciado no 3730xl DNA Analyzer.

As seqüências foram alinhadas e construído um consenso com o auxílio do programa CodonCodeAligner. A classificação taxonômica da seqüência nomeada FAT150013 se baseou na comparação de seqüências entre a obtida da amostra e as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) via BLASTn. As seqüências de DNA obtida das amostras enviada

foi alinhada com sequências similares disponíveis no banco de dados e construída uma árvore fenética com auxílio do programa MEGA6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a identificação do local com a maior concentração de metais no solo, ponto P7, concentrações Zn: 1213,517ppm e Pb: 226,083 ppm, foi realizada uma nova coleta solo para o isolamento das bactérias resistentes a Chumbo e Zinco.

Após o isolamento das bactérias presentes no solo da segunda coleta, realizada dia 14 de Abril de 2014, foram contabilizadas 9 diferentes colônias, 5 no meio suplementado com Chumbo (35, 65, 150 e 300 ppm) e 4 no meio suplementado com Zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm). Estas foram distinguidas e diferenciadas inicialmente pelas formas e coloração apresentadas.

5.1 TESTE TAMPÃO

Após o teste para a identificação do crescimento das bactérias nas soluções tampões com pH 5,5, o tampão citrato apresentou-se como o mais indicado, devido pouco ou nenhuma variação do pH durante o crescimento dos isolados. Um novo teste foi realizado com todas as bactérias, sendo estas inoculadas em meio caldo nutritivo sem tampão citrato e sem metal, tampão citrato sem metal, tampão citrato + Pb 100 ppm, tampão citrato + Pb 200 ppm, tampão citrato + Zn 400 ppm, tampão citrato +Zn 800 ppm. Após o período de 24 horas ocorreu o crescimento do isolado D em todas as variações, sendo este selecionado para as posteriores análises conforme Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Crescimento dos isolados no caldo nutriente com tampão Citrato suplementado com Chumbo das bactérias isoladas do solo contaminado na 2^o coleta com Pb e Zn.

Isolados	Meio Sem Tampão e sem Metal	Citrato / Sem metal	Citrato + Pb 100	Citrato + Pb 200
Bac A	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac B	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac C	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac D	Cresceu	Cresceu	Cresceu	Cresceu
Bac E	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac F	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac G	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac H	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac I	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu

Tabela 4: Crescimento dos isolados no caldo nutriente com tampão Citrato suplementado com Zinco das bactérias isoladas do solo contaminado na 2^o coleta com Pb e Zn.

Isolados	Meio Sem Tampão e sem Metal	Citrato / Sem metal	Citrato + Zn 400	Citrato + Zn 800
Bac A	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac B	Cresceu	Cresceu	Cresceu	Cresceu
Bac C	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac D	Cresceu	Cresceu	Cresceu	Cresceu
Bac E	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac F	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac G	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac H	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu
Bac I	Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu	Não Cresceu

5.2 PROVAS BIOQUÍMICAS

5.2.1 Coloração Gram Dos Isolados

As colônias de bactérias isoladas em ágar nutriente suplementado com chumbo e zinco foram submetidas ao teste de coloração de Gram, conforme descrito por Neder (2000), como primeiro critério para auxiliar na identificação. Dessa forma as colônias isoladas foram ativadas em novos tubos de ensaio com os referidos meios de cultura, e estes incubados por 24 horas em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação foi realizado o esfregaço das colônias em lâminas de vidro contendo uma gota d'água destilada/deionizada esterilizada, com posterior secagem e fixação de células. Em seguida foi adotado o procedimento de Neder (2000), com a utilização de cristal violeta, lugol, acetona e fucsina para coloração das lâminas. Foi realizada a Coloração Gram para a identificação quanto à forma das bactérias que cresceram em Chumbo e Zinco. A Coloração de Gram permite a identificação da morfologia (esférica, bastonete, espiralada ou vibrião), a dimensão e o modo de agrupamento das células. Bactérias Gram negativas, quando tratadas com etanol, o lipídio na membrana externa é dissolvido e removido. Isto rompe a membrana externa e aumenta sua permeabilidade. Assim o complexo corante (cristal violeta) pode ser removido, descorando a bactéria Gram negativa, que pode então ser tingida com o corante de fundo safranina (TORTORA, 2000). O isolado D escolhido para as análises posteriores, conforme Tabela 5, é um bacilo Gram negativo.

Tabela 5: Teste de coloração Gram nas Bactérias isoladas em solo contaminado com Chumbo e Zinco

Bactéria A	Gram Positiva	Cocos
Bactéria B	Gram Positiva	Bacilo
Bactéria C	Gram Positiva	Bacilo
Bactéria D	Gram Negativo	Bacilo
Bactéria E	Gram Positiva	Bacilo
Bactéria F	Gram Negativa	Bacilo
Bactéria G	Gram Positiva	Cocos
Bactéria H	Gram Negativa	Bacilo

Bactérias Gram negativas tem ganhado interesse crescente como organismos modelos para detoxificação de metais pesados e para fins biotecnológicos. A resistência de bactérias aos cátions de metais de transição é predominantemente baseada na resistência devida aos genes (ROZYCKI e NIES, 2009).

Estão relatadas na nomenclatura resistências da bactéria bacilo Gram negativa *Cupriavidus metallidurans* CH₃₄ a arsênio (AsO₄⁻³), bismuto (Bi⁺³), gadolínio (Gd⁺³), ouro (Au⁺), prata (Ag⁺), selenito (SeO₃⁻²), tálio (Tl⁺) e urânio (U⁺²), entretanto, a maioria dos mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos (BIONDO, 2008).

A bactéria *Ochrobactrum anthropi* é um bacilo Gram negativo, classificado como *Achromobacter* e atualmente reconhecido como pertencente ao gênero *Ochrobactrum*. Este organismo tem distribuição ambiental ampla, sendo encontrada na água, no solo, em plantas entre outros ambientes. Embora seja considerado um agente patogênico oportunista em pacientes imunocomprometidos, é crescente o reconhecimento de que seja um agente casual de hospedeiros saudáveis (OZDEMIR *et al.*, 2006).

Cepas de *Ochrobactrum* apresentam interesse particular para biorremediação. São capazes de degradar pesticidas organofosforados, solventes tóxicos, resíduos de petróleo (SELEEM *et al.*, 2006) e, também são capazes de remover cromo, chumbo, zinco e outros metais tóxicos do ambiente (OZDEMIR, *et al.*, 2003, CHENG *et al.*, 2010).

Segundo estudo de Borba (2010), onde foi avaliada a capacidade de bioacumulação de metais pesados, *Bacillus subtilis* (bactéria Gram-positiva) bioacumulou taxas bem inferiores de metais-pesados quando comparadas com as bactérias Gram-negativas *Ochrobactrum anthropi* e *Cupriavidus metallidurans*. Estes resultados são corroborados por Hu (1992), que justifica o fato das bactérias Gram-negativas apresentarem maior capacidade de adsorção do que as bactérias Gram-positivas, devido ao maior teor de lipídios da membrana externa.

Após a determinação do Isolado D como a mais indicada para a realização da pesquisa, foi realizado os testes bioquímicos (Tabela 6): Triple Sugar Iron Agar, Teste do Citrato, Urease, Catalase, Indol, Metil Red, Voges-Proskauer, Hidrogênio Sulfite, Litmus Milk, Oxidase, Redução de Nitrato, Fermentação de Carboidrato (Tabela 6), e a identificação molecular pela Fundação André Tosello, situada em Campinas, São Paulo.

Tabela 6: Provas bioquímicas no isolado D

Teste Bioquímico	Resultado
Coloração de Gram	Bacilo Gram Negativo
Triple Sugar Iron Agar	Ácido
Teste do Citrato	Negativo
Urease	Negativo
Catalase	Positiva
Indol	Negativo
Metil Red	Negativo
Voges-Proskauer	Negativo
Hidrogênio Sulfite	Positivo sem motilidade
Litmus Milk	Proteólise
Oxidase	Negativo
Redução de Nitrato	Positivo
Fermentação de Carboidrato (Sacarose, Glicose, Frutose, Maltose, Xilose, Galactose)	Positivo fermentativo (para todas as fontes de carbono)

5.3 ANÁLISE MOLECULAR DO ISOLADO D

A análise molecular foi realizada na Fundação André Tosello, Campinas, onde foi possível somente a identificação até a família Enterobacteriaceae.

Conforme resultado do Laboratório a amostra referencia resultou uma similaridade de < 97% quando comparada com a seqüência depositada no GenBank mais similar a ela. Assim, com a base nas seqüências depositadas naquele banco de dados a espécie avaliada permanece indeterminada, sendo assim, a identificação deve ser confirmada a partir de outras análises moleculares e técnicas bioquímicas.

Classificação Taxonômica (NCBI): Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae.

As bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae são bastonetes Gram-negativos de até 3 mm de comprimento, fermentam a glicose entre outros açúcares, são oxidase negativa e catalase positiva, anaeróbios facultativos e não formadoras de esporos, crescem bem em

ágar MacConkey, pois não são inibidos pelos sais biliares presentes no meio. A família contém mais de 40 gêneros e mais de 180 espécies. Constituem os principais componentes da microbiota intestinal humana normal, sendo relativamente incomum em outros locais do organismo (MURRAY *et al.* 2004).

As enterobactérias podem ser agrupadas em três categorias: agentes patogênicos, patógenos oportunistas e agentes não patogênicos. Aqueles que não têm importância patogênica para animais e humanos, tais como *Hafnia* e *Erwinia* podem ser isolados de fezes, do ambiente e podem contaminar amostras clínicas. Patógenos oportunistas são aqueles que podem causar, ocasionalmente, doença clínica em diferentes locais. Os principais agentes patogênicos, são responsáveis por doenças entéricas e sistêmicas e até infecções hospitalares, são *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.* e *Serratia marcescens*, representam 80% de todos os bastonetes Gram-negativos e 50% de todas as bacteremias observadas clinicamente (MURRAY *et al.* 2004).

É válido acrescentar que, devido ao metabolismo de grande parte dos representantes da família Enterobacteriaceae ser anaeróbio facultativo, os enriquecimentos utilizados neste trabalho não seriam capazes de excluí-los. Além disso, representantes do gênero *Enterobacter*, já foram relatados como capazes de utilizar o lactato de sódio como fonte de carbono, ou mesmo o citrato (GRIMONT & GRIMONT, 2006). Outra questão importante é a taxonomia deste gênero que é considerada como altamente heterogênea ao se considerar outros representantes da família Enterobacteriaceae (GRIMONT & GRIMONT, 2006).

5.4 ANÁLISE DO ISOLADO D NO MEIO DE CULTURA COMPLEMENTADO COM CHUMBO

5.4.1 Efeito do pH no crescimento, na redução de Pb no sobrenadante da cultura e adsorção de Pb pelo isolado D

Muitos microrganismos exibem a habilidade de crescer em altas concentrações de metal tóxico. Os fatores ambientais como o pH, o suprimento de nutrientes e oxigênio, presença de outros íons metálico, agentes quelantes e concentração celular influenciam na toxicidade dos metais (VALDMAN e LEITE, 2000).

As bactérias possuem caráter aniônico em pH de solo e de água. As cargas negativas são originadas da ionização dos radicais carboxílicos, fosfáticos, hidroxílicos e sulfídricos encontrados nos polímeros da parede celular (BEVERIDGE, 1989; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Pegoraro *et al.* (2006), ressaltam que o pH atua direta e indiretamente sobre a biodisponibilidade dos íons metálicos.

O Isolado D foi crescido em caldo nutriente complementado com concentrações 0, 35, 65, 150 e 300 ppm de chumbo em diferentes valores de pH (3.5; 4; 4.5; 5; 5.5 e 6), na temperatura de 30°C para verificar em qual pH obtém-se o melhor crescimento e adsorção.

Após as análises das variações de pH no Isolado D constatou-se que tanto para o crescimento bacteriano (Figura 2), quanto para a redução do Chumbo no sobrenadante (Figura 3), dentre os valores de pH inicial, o pH ótimo foi o de 5.5 observando-se uma redução de até 71,29% de chumbo no sobrenadante e a adsorção de 32,258 ppm/g de célula seca pelo microrganismo, sendo este pH escolhido para uso nas análises das variações de temperatura e fontes de carbono.

Os resultados apresentados na Figura 2 demonstraram que as distintas concentrações de chumbo não limitaram circunstancialmente o crescimento do Isolado D durante o período de cultivo. O isolado D apresentou crescimento durante as 72 horas de incubação no pH 3.5 (Fig. 2D) em todas as concentrações de chumbo analisadas. Estudo realizado por Ueki *et al.*, (2003) com a bactéria *Escherichia coli* modificada geneticamente também demonstrou crescimento durante o período de cultivo (72 horas) em alta concentração de Chumbo (635,5 mg L⁻¹), evidenciando que microrganismos com tolerância/resistência a presença de metal tóxico podem ser potencialmente utilizados em processo de biorremediação/adsorção.

Pode-se destacar o crescimento do isolado D no pH 5.5 (2E), na maior concentração analisada que produziu ao final de 48 horas de cultivo 3.533 gL⁻¹ de massa celular seca, na concentração de 300 ppm de chumbo (Figura 2). Ainda analisando o crescimento do isolado D no pH 5.5 (2E) apenas nas concentrações iniciais de 150 e 300 ppm de chumbo, houve um decréscimo após 48 horas de incubação.

Ao analisar o crescimento do Isolado D, observa-se que os valores de pH 3.5 e 4.0 (mais baixos) pode ser um fator inibitório de crescimento nas diferentes concentrações do metal. Pode-se observar que houve uma diminuição na taxa de crescimento proporcional a diminuição do pH inicial.

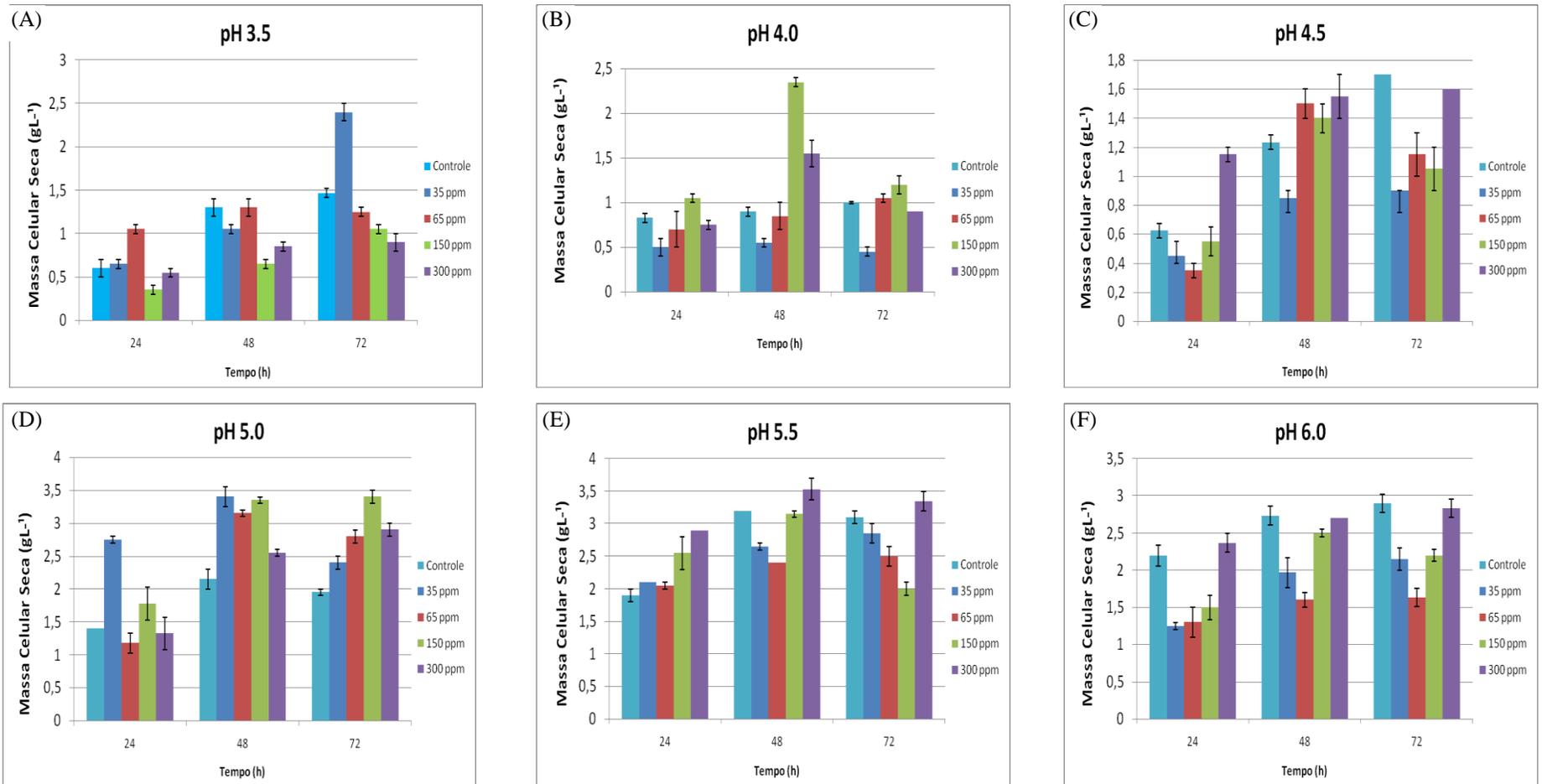


Figura 2: Efeito do pH no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Chumbo nas concentrações 0, 35, 65, 150, 300 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Diferente do que encontrado neste estudo, onde o pH ótimo encontrado é 5,5, segundo Evans *et al.* (2002), *Salmonella* (espécie da família Enterobacteriaceae) cresce em intervalo de pH 4.0 a 9.0, com crescimento ótimo na faixa de 7,0. Os resultados deste estudo estão de acordo com Gast (2003), que ao analisar a bactéria *Enterococcus faecalis* observou que esta é capaz de sobreviver em pH na faixa de 2 a 10, tendo um crescimento ótimo encontrado no pH 5,5.

O Isolado D no final do período de cultivo apresentou valores de biomassa próximos aos valores encontrados nas amostras cultivadas na ausência do metal demonstrando habilidade em sobreviver a estas concentrações de chumbo.

A redução mais drástica no crescimento ocorreu na concentração de 35 ppm de chumbo no pH 4.0 (0,550 gL⁻¹ de massa celular seca), porém não foi inibitória, sendo que o Isolado D foi capaz de resistir ao chumbo, o que sugere o desenvolvimento de adaptação fisiológica ao metal.

Pesquisas na literatura revelam potencial de tolerância/resistência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em diferentes concentrações de metais. Sharma e Fulekar (2009), verificaram que a cepa bacteriana Gram-negativa *Citrobacter freundii* possui capacidade de crescimento em diferentes concentrações de chumbo e zinco sendo capaz de crescer até a concentração de 800 mg L⁻¹ de Pb e Zn, assim como verificado neste estudo, onde o Isolado D foi capaz de crescer mesmo em concentrações de 300 ppm de Pb e 3200 ppm de Zn.

Kim *et al.* (2007), testando as habilidades de crescimento de *Bacillus* em presença de diferentes concentrações de metais verificaram que apenas um isolado foi capaz de crescer em 400 mg L⁻¹ de chumbo, cobre e zinco.

Segundo Tangaromsuk *et al.*, (2002), a bactéria Gram-negativa *Sphingomonas paucimobilis* cultivada em presença de cádmio não apresentou crescimento constante, durante as 72 horas analisadas, quando comparadas as amostras cultivadas na ausência do metal. Além disso, o cádmio foi inibitório uma vez que não se observou aumento de crescimento no meio com metal. Assim como no estudo acima, também não foi observado o crescimento constante durante as 72 horas de análise do crescimento do Isolado D nos pH 4; 4.5; 5; 5.5 e 6 para algumas variações de concentrações estudadas.

Neste estudo, não podemos afirmar que o chumbo alterou o padrão de crescimento normal do Isolado D quando comparado ao crescimento do controle. Entretanto pode-se dizer

que o chumbo não inibiu o crescimento do Isolado D, atribuindo a esta bactéria resistência/tolerância ao metal nas concentrações utilizadas.

Bactérias tolerantes a metal podem desenvolver vários mecanismos de resistências e detoxificação (BRUINS *et al.*, 2000). Em alguns casos, a resistência bacteriana a metais foram mostradas, para apresentar diferenças na absorção e/ou transporte do metal tóxico, enquanto em outros casos, o metal é enzimaticamente transformado, por oxidação, redução, metilação ou desmetilação, em espécies químicas que sejam menos tóxicas ou mais voláteis do que o composto original (WILLIAMS; SILVER, 1984).

Pesquisas apontam grande relação entre componentes do meio, como fontes de carbono, nitrogênio e fosfato na acumulação de metais (SING; YU, 1998; DONMEZ; AKSU, 2001).

Conforme Ellis (2003) exposição dos microrganismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância pela comunidade microbiana exercendo pressão seletiva a resistência aos metais, então esses organismos por sua vez podem ser utilizados na remoção de metais, dado este que corrobora com os resultados deste trabalho, visto que mesmo em concentração de 300 ppm de Pb não houve inibição do crescimento do Isolado D, que é proveniente de solo contaminado com chumbo.

Em estudos realizados por Boechat (2014) isolados bacterianos de *Kluyvera intermédia* e *Klebsiella oxytoca*, avaliadas em diferentes pH na concentração de 200 ppm de Pb apresentaram o máximo de crescimento no pH 6,5, seguido dos demais pHs iniciais. A produção celular do isolado bacteriano de *Kluyvera intermédia* não diferiu nos pHs 5.0; 6.0 e 7.0. Porém, no pH 6,5 atingiu o maior crescimento. Diferentemente do estudo de Boechat (2014), no presente estudo, o Isolado D em uma concentração mais alta (300 ppm) obteve o melhor crescimento no pH 5.5 (Fig. 2E), seguido dos pH 5; 6; 3.5; 4 e 4.5 (Fig. 2D, 2F, 2A, 2B e 2C respectivamente). O pH da matriz de crescimento é um dos parâmetros mais importantes que afetam o processo de adsorção de metais pesados (DONMEZ & AKSU, 1999), como foi observado na adsorção de Chumbo pelo Isolado D nas Figura 4.

Ainda conforme estudo de Boechat (2014), não foi observado crescimento dos isolados sob pH inicial do meio de 3.5 e 4.0 (mais ácidos), mostrando que todos os isolados das bactérias *Kluyvera intermédia* e *Kluyvera intermédia* são dependentes de pHs neutros ou próximos a neutralidade, porém neste estudo ocorreu o crescimento do Isolado D nos valores de pH 3.5 e 4.0, mesmo que menores quando relacionados à pH de valores mais altos

estudados neste trabalho. Segundo Boechat (2014), a biorremocão de chumbo e o crescimento microbiano são dependentes da temperatura, pH inicial e da concentração inicial de chumbo.

Lemos *et al.* (2008) observaram que o pH ótimo para que ocorra a remoção de Zn e Pb sem que haja precipitação do mesmo foi de 5.0 e que acima deste valor pode ocorrer a precipitação do metal inviabilizando a sua remoção. O pH altera a solubilidade dos metais pesados, além de afetar a atividade dos grupos funcionais presentes na parede celular, que são sítios de ligação a esses elementos (SANNASI *et al.*, 2006), porém neste estudo verificou-se o pH 5.5 (Fig. 3E) como o mais eficaz na remoção do Chumbo, assim como no crescimento da massa celular (Fig. 1E), não observando-se a precipitação de chumbo no meio caldo nutriente.

A maior redução de chumbo no sobrenadante foi observada no pH 5.5 na concentração de 65 ppm (Fig. 3E). Faz-se importante destacar, que mesmo nos valores de pH abaixo de 5.5 analisados houve um percentual de redução de até 25,80%, no pH 3.5 para a concentração de 35 ppm de chumbo, sinalizando que trabalhos de bioacumulação podem ser realizados em solos apresentando variações de pH entre 3.5 a 6.0.

A remoção de Pb no pH 5.5 mostrou-se eficiente em todas as concentrações estudadas neste trabalho. Este resultado vai de encontro ao estudo realizado por Gong (2005), onde ao analisar a remoção de chumbo do sobrenadante pela bactéria *Spirulina maxima* observou que o resultado foi dependente do pH da solução e a remoção máxima (95% de remoção no meio) foi obtida em uma solução de pH de aproximadamente 5.5.

Diversos estudos revelaram grande potencial de remoção de Chumbo por comunidades bacterianas especificamente *Pseudomonas cepacia*, 86% de remoção em Pb 200 ppm; (SAVVAIDIS *et al.*, 2004), *Enterobacter* sp., 80% de remoção em 400ppm (LU *et al.*, 2006), *Amycolatopsis* sp., 85% de remoção em Pb 400 ppm (ALBARRACIN *et al.*, 2008), *Bacillus cereus*, 92% de remoção em Pb 300 ppm (CHATTERJEE; LALITAGAURI, 2008) e *Citrobacter freundii*, 88% de remoção em Pb 400 ppm (SHARMA; FULEKAR, 2009).

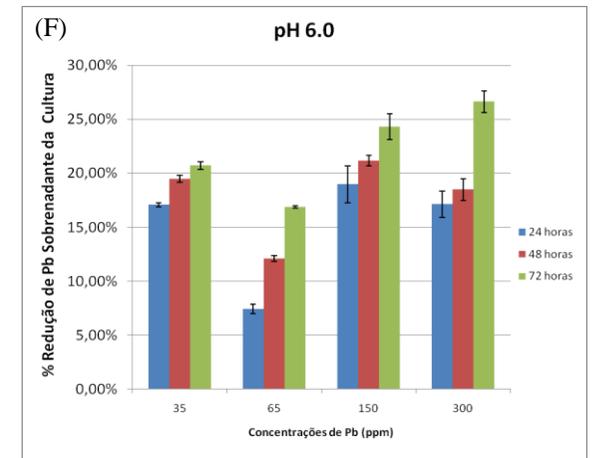
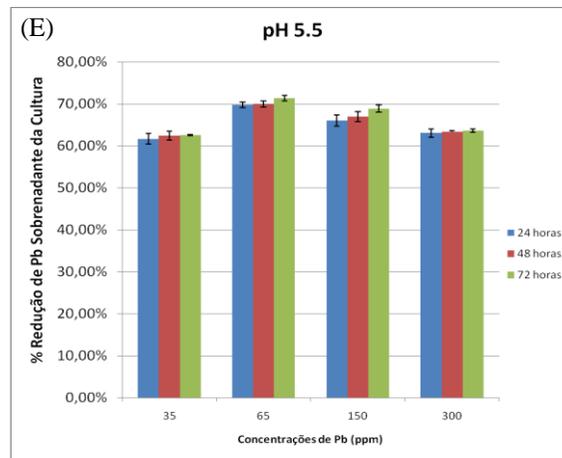
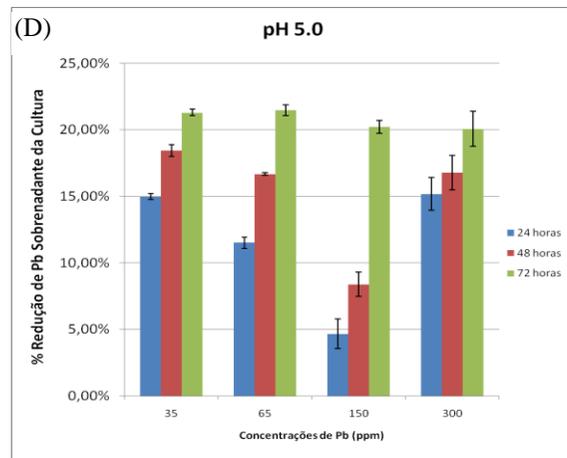
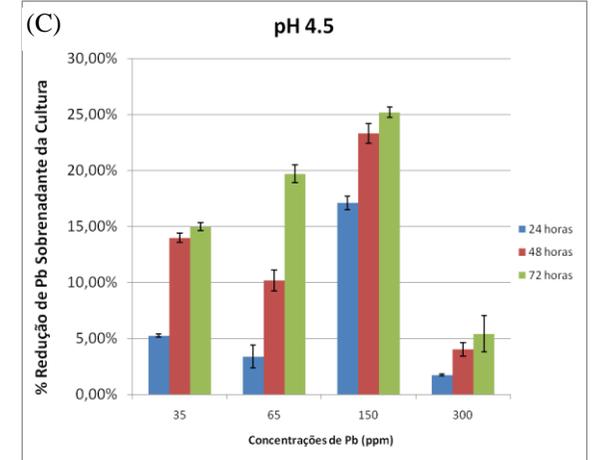
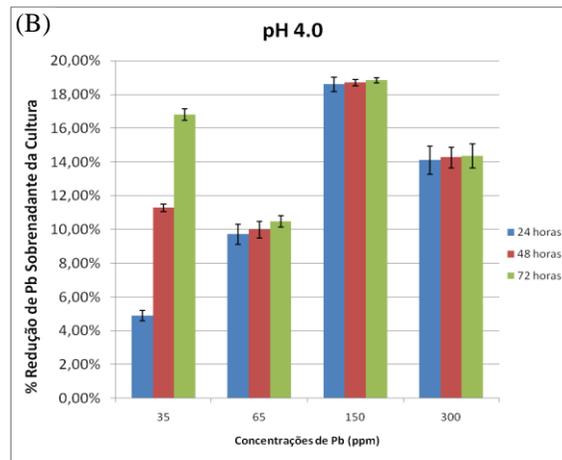
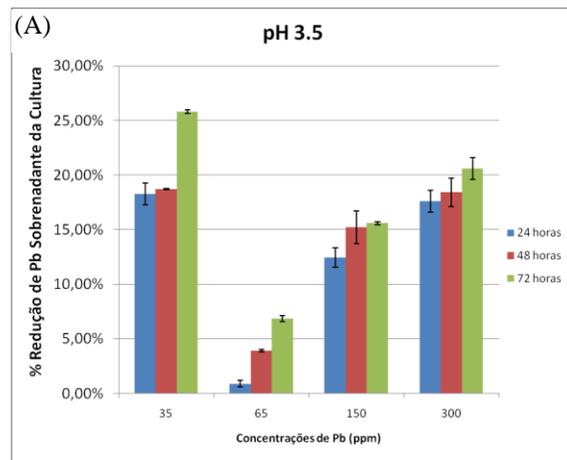


Figura 3: Efeito do pH na remoção de Chumbo no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutricional complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Inúmeras pesquisas discutem o efeito do pH sobre o desempenho de remoção de íons metálicos por diversos tipos de biomassa. Volesky *et al.*, (1999), estudaram a capacidade de biossorção de cádmio por diferentes espécies de algas pertencentes ao gênero *Sargassum* e verificaram grande eficiência de remoção em pH 4.5, em valor inicial de 200 ppm no meio, tendo a redução de até 78% e conforme se elevou o pH, aumentou a redução de cádmio no sobrenadante da cultura.

Neste estudo, assim como Voss e Thomas (2001), verificou-se que conforme se eleva o valor de pH, o percentual de remoção do chumbo também se eleva, porém discretamente. Deve-se destacar o menor percentual, que ocorreu no pH 4.5 (Figura 2C) na concentração inicial de 300 ppm, com uma redução máxima de 5,43% do chumbo no sobrenadante, assim como o maior percentual de redução no pH 5.5 (Figura 3E) com 71,29% com concentração inicial de 65 ppm. Quando falamos de valores absolutos, podemos destacar a remoção no pH 5.5 (Figura 3E) na concentração de 300 ppm de chumbo, que obteve a redução percentual de 63,3%, inferior a redução percentual de 65 ppm (71,29%), porém ao verificar-mos em valores absolutos, temos 46,34 ppm e 190,86 ppm de chumbo retirados do meio respectivamente (Fig. 3E).

Donmez e Aksu (1999), relataram bioacumulação de Cu (II) por várias cepas de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida* sp. Tais autores verificaram que a bioacumulação foi dependente da concentração inicial de Cu (II) e também do pH. A adsorção de cobre aumentou significativamente com o aumento de pH 2.0- 6.0, independentemente da espécie de *Bacillus* (LO *et al.*, 2003), assim como foi observado na remoção do chumbo pelo Isolado D na concentração inicial de 65 ppm de chumbo, que teve o aumento da remoção conforme o aumento do pH, só decrescendo no pH 6.

Luo *et al.*, (2006), ao avaliaram a adsorção de chumbo pela alga castanha, *Laminaria japonica*, concluíram que a adsorção do chumbo é fortemente condicionada pelo valor de pH e observaram que o valor de pH para o qual a remoção é máxima é de 5.3, tendo observado uma redução de 74% de chumbo do meio.

Lu *et al.*, (2006), investigaram a cinética e equilíbrio de adsorção de diferentes íons metálicos utilizando a biomassa de *Enterobacter* sp. Tais autores verificaram que ajustando o pH para 3,0 levou a quase completa remoção de chumbo e cádmio, porém neste trabalho foi encontrado uma maior eficiência na adsorção de Pb pelo Isolado D no pH 5.5 (Figura 4E),

onde ocorreu a remoção de aproximadamente 32 ppm de Pb/g de massa celular seca. Neste estudo o menor pH avaliado foi 3,5 (3A) que apresentou uma adsorção máxima de aproximadamente 2,2 ppm de Pb/g de massa celular seca para a concentração inicial de 150 ppm de Pb.

A eficiência de um processo de remoção de metais não depende apenas do microrganismo utilizado, mas também do tipo de íon e sua concentração, temperatura, pH, e presença de outros íons. Estes parâmetros são extremamente relevantes para a eficácia de todo o processo. Neste sentido, os fatores que influem na capacidade de remoção de um metal por um microrganismo devem ser minuciosamente controlados (TEODÓSIO, 2011)

Os métodos convencionais utilizados na remoção de metais, tais como precipitação química, membrana de separação ou resina de troca iônica, podem ser muito caro e, às vezes, não muito eficazes. O tratamento a base de sistemas biológicos, oferece redução dos níveis de metais tóxicos aos limites ambientalmente aceitáveis a custo relativamente baixo e se comparado aos processos físico-químicos (VOLESKY, 2001; KADUKOVA; VIRCIKOVA, 2005).

Foi analisado o efeito do pH na adsorção de Pb pelas células do Isolado D (Figura 4), observou-se que o pH 5.5 (Figura 4E) teve a maior adsorção de Chumbo pelo microrganismo, apresentando um valor máximo de adsorção de 32,258 ppm/g de célula seca em uma concentração inicial de 300 ppm de chumbo. Deve-se destacar que a adsorção de chumbo pelo microrganismo apresentou-se com maior valor em todas as concentrações testadas de chumbo no valor inicial de pH 5.5.

Foi observado que a adsorção de chumbo foi dependente da concentração do metal para os valores de pH 5.0 e 5.5 (Figura 4D e 4E), variando proporcionalmente com a concentração do chumbo usada, ou seja, conforme aumentava-se a concentração de Pb, a adsorção do metal pelo Isolado D também aumentava. O Isolado D apresentou a menor adsorção de metal no pH 3.5 (Figura 4A) com a concentração inicial do meio caldo nutriente de 35 ppm de chumbo, apresentando uma adsorção de 0,432 ppm de Pb.

Os resultados apresentados na figura 4 revelam que houve diferenças na adsorção de chumbo pelas biomassas, acompanhando o aumento das concentrações do metal. A adsorção de chumbo foi maior em relação às concentrações mais elevadas, enquanto que em relação à remoção percentual (%) no sobrenadante (Figura 3), os maiores índices foram correlacionados as menores concentrações inicial.

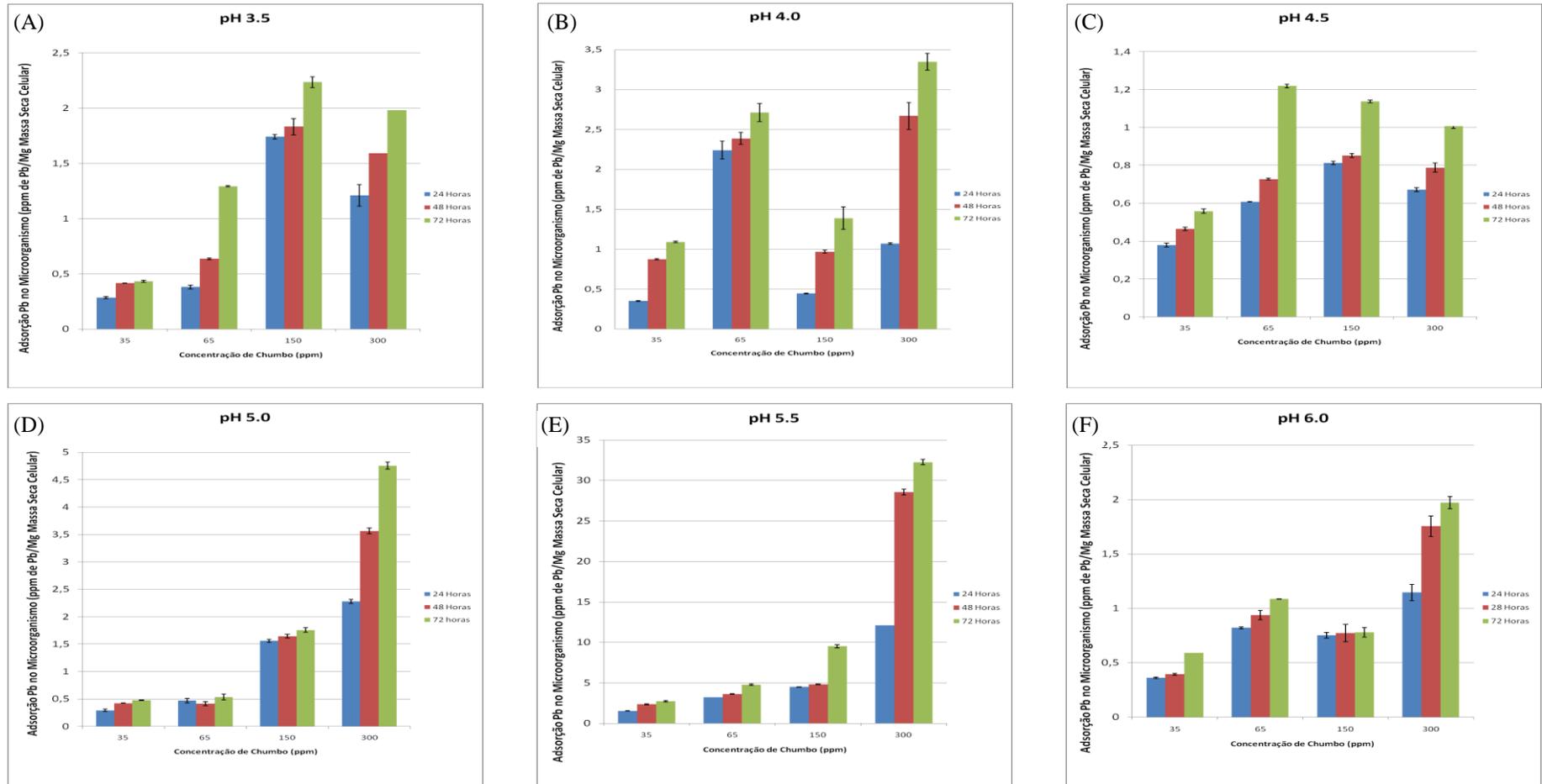


Figura 4: Efeito do pH na adsorção de Chumbo pelo isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Os maiores índices de capacidade de adsorção embora tenham ocorrido na concentração mais elevada de chumbo (Figura 4), os teores remanescentes do metal em solução (Figura 3) foram proporcionalmente maiores, resultando em menores taxas de remoção percentual. Comportamento semelhante foi observado por Souza *et al.* (2008), em relação a adsorção de cobre por diferentes espécies de fungos zoospóricos. Tais autores relataram que houve aumento na capacidade de adsorção e concomitante diminuição na remoção percentual em relação ao aumento da concentração inicial do metal.

É sabido que o pH tem significantes efeitos na solubilidade, especiação e capacidade de adsorção dos metais pesados (SHENG 2004; ABU AL-RUB, 2006). Os diferentes valores de pH podem ser atribuídos à natureza das interações químicas de cada componente com as células microbianas (KIRAN *et al.*, 2005). O pH pode influenciar a adsorção dos íons metálicos pela competição entre o metal e os íons H^+ pelos sítios ativos. Adicionalmente, a dependência do pH na captação das espécies metálicas pela biomassa pode ser também justificada pela associação-disociação de certos grupos funcionais tais como os grupos carboxilas (YALÇINKAYA *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2002). É conhecido que, para baixos valores de pH, os grupos carboxílicos não estão dissociados e não podem ser ligados aos íons metálicos na solução, embora eles possam tomar parte nas reações de complexação.

Outro dado a se observar é o efeito da concentração da biomassa na adsorção de Chumbo, quando a concentração da biomassa se incrementa a percentagem de remoção aumenta. Com uma maior concentração de biomassa, obtém-se a maior percentagem de remoção, sendo que esse fato pode ser atribuído ao incremento da área superficial de adsorção e à disponibilidade de sítios livres de adsorção.

O efeito do tempo de contato na adsorção de Pb por isolado D é observado que a quantidade em ppm captada de chumbo foi crescente em todo o período de 72 horas. Para as faixas de concentração do metal utilizado, observou-se que, com o aumento da concentração inicial de chumbo, ocorreu um aumento na remoção do íon. Segundo Van Hullebusch *et al.*, (2003), se há uma maior concentração metálicas na solução, elas ocuparão os sítios ativos presentes nas bactérias, efetuando-se o processo de adsorção mais eficientemente. Dessa forma, a quantidade de íons metálicos captados pela biomassa será maior, por ser diretamente proporcional à concentração inicial do metal na solução.

Voss e Thomas (2001), ao estudarem a remoção de chumbo, cobre e manganês por *Bacillus sp* e *Pseudomonas sp*, verificaram maior capacidade de remoção de chumbo para

Bacillus sp no primeiro período de cultivo. Entretanto a capacidade de remoção de chumbo por *Pseudomonas* sp aumentou 65% quando comparado a *Bacillus* sp quando o tempo de crescimento das células passou de 16 para 90 horas. Desta forma tais resultados sugerem maior capacidade de remoção de chumbo pela bactéria Gram-negativa do que pela bactéria Gram-positiva em crescimento ativo. A remoção de Pb pelo do Isolado D em todas os valores de pH, assim como em todas as concentrações de Pb, pode estar relacionado ao fato o Isolado D ser uma bactéria Gram-negativa, que conforme estudo de Voss e Thomas (2001), torna-se eficiente na adsorção de Pb.

Para encontrar o pH ótimo para a adsorção de Pb (concentração inicial de 100 ppm) pela bactéria *E. faecium*, Yilmaz *et al.* (2010), realizaram experimentos em diferentes valores de pH inicial variando de 1.0 a 6.0. Estes autores concluíram que o processo de remoção dos íons Pb é fortemente dependente do pH e os dois maiores valores de adsorção foram obtidos em pH 5 e 6, verificaram também que eficiência de remoção de íons Pb de *E. faecium* caiu drasticamente no $\text{pH} \leq 4.5$. Isso corrobora com nossos dados onde observou-se a menor adsorção de Pb pelo Isolado D no pH 4.5.

Voss e Thomas (2001) verificaram que alterando o pH de 5.0 para 3.0 diminuiu a quantidade de metal adsorvido. Esse decréscimo foi de 55,05 % para Cu^{2+} em *Pseudomonas* sp.. A biomassa nestas condições apresenta potencial para remoção de íons metálicos carregados positivamente. Este mesmo resultado foi observado neste estudo, porém para a alteração do pH 5.0 para 3.5, onde foi diminuída a quantidade de adsorção de Pb pelo Isolado D.

Segundo Boechat (2014), em meio complementado com 200 mg L^{-1} de chumbo a bactéria *Kluyvera intermédia* adsorveu 49% de chumbo no meio, seguida por *Klebsiella Oxytoca* com a adsorção de 27%. Neste mesmo estudo, ainda foram avaliadas as adsorções destas bactérias nas concentrações de 400 mgL^{-1} e 600 mgL^{-1} para as bactérias *Kluyvera intermédia* e *Klebsiella Oxytoca* tendo 18 e 22%, de remoção de Pb 400 mgL^{-1} e 26 e 23%, de Pb 600 mg L^{-1} respectivamente.

5.4.2 Efeito da temperatura no crescimento, na redução de Pb no sobrenadante da cultura e adsorção de Pb pelo isolado D

Para a realização de um processo que seja eficaz e aproveite o máximo da capacidade do adsorvente é necessário que estudos relacionados à temperatura de adsorção sejam realizados sendo que normalmente esta se encontra em um intervalo entre 10 e 70 °C (COSSICH, 2000).

Após a escolha do pH 5.5, o Isolado D foi cultivado em meio caldo nutriente com concentrações iniciais de 0, 35, 65, 150 e 300 ppm de Chumbo e diferentes temperaturas (25; 30; 35; 40 e 45), para verificar em qual obtém-se o melhor crescimento bacteriano, a redução de Pb no sobrenadante e adsorção de Pb pelo Isolado D. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressados em valores médios.

No período de 72 horas de incubação não foi possível distinguir um crescimento bacteriano considerado padrão (Figura 5). Em sua grande maioria, o isolado D apresentou crescimento em até 72 horas de avaliação. Ao se comparar a eficiência no crescimento através da análise do peso seco, observa-se um maior crescimento na temperatura de 30°C (Figura 5B) na maior concentração de chumbo, 300 ppm, chegando a um crescimento de 3,533 g.L⁻¹ de massa seca celular, seguido pela temperatura de 35°C apresentando um crescimento da massa seca de 3,2 g.L⁻¹ (Figura. 5C).

Segundo Diels *et al.*, (1989), esta resposta do melhor crescimento na maior concentração de Chumbo no meio, 300 ppm (Figura 5B), pode estar relacionada à expressão de genes de tolerância ao chumbo codificados pelo plasmídeo durante as etapas de isolamento e purificação dos isolados em meio contendo chumbo, aumentando consideravelmente a tolerância. A resistência ao chumbo foi reconhecida cedo, como sendo plasmideal em *R. metallidurans*, embora só nas últimas décadas fosse descrita em um nível molecular (BORREMANS *et al.*, 2001).

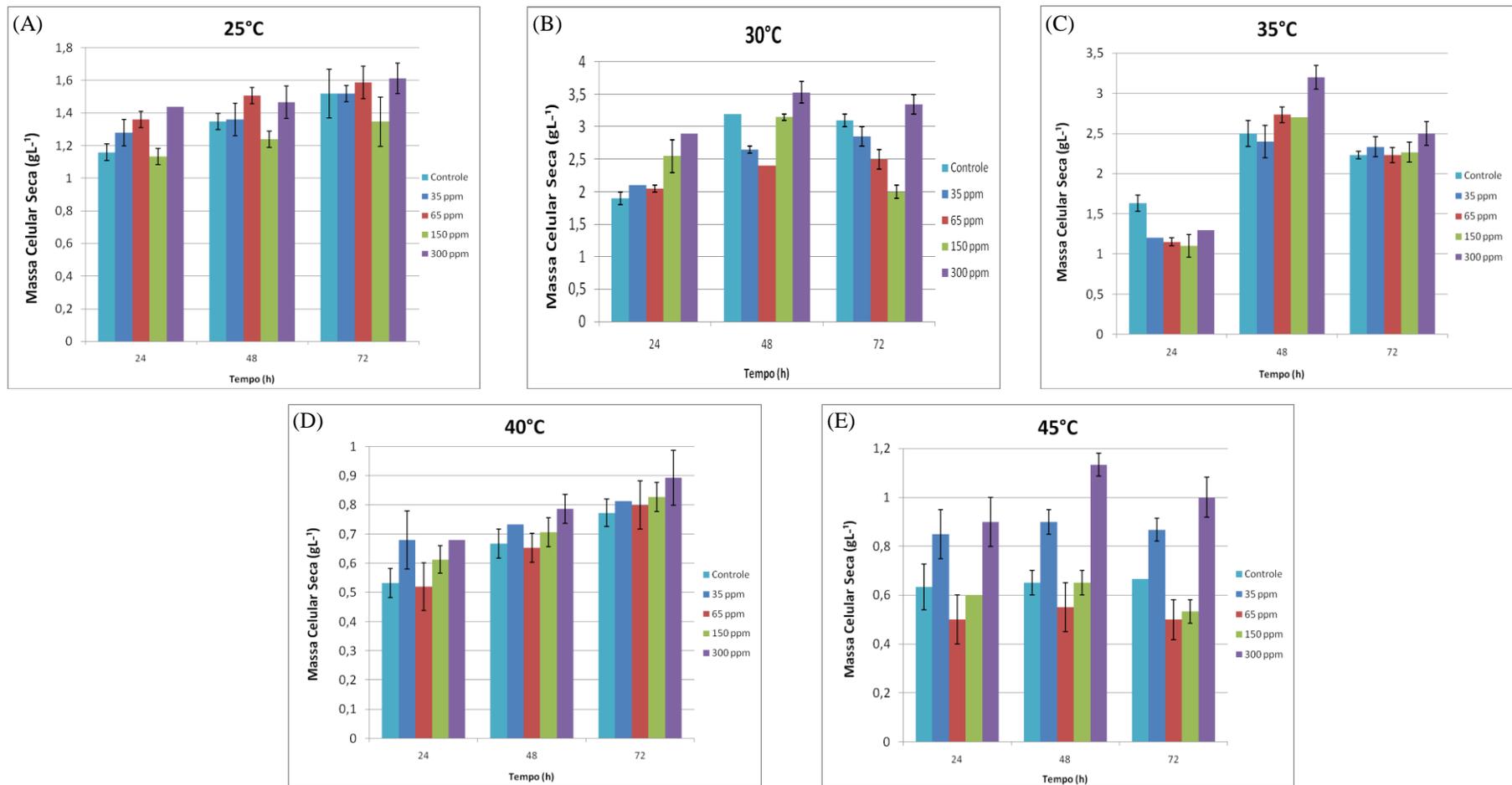


Figura 5: Efeito da temperatura no crescimento do isolado após 72 horas de incubação, em meio caldo nutricional complementado com Chumbo nas concentrações 0, 35, 65, 150, 300 ppm no pH 5.5 em 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médio \pm .

As análises de crescimento nas temperaturas de 40°C e 45°C (Figuras 5D e 5E) apresentaram o menor crescimento entre as temperaturas avaliadas, sendo picos de crescimento de 0,893 g.L⁻¹ e 1,133 g.L⁻¹ respectivamente, ambos na concentração de 300 ppm, indicando que Bactéria D é termotolerante ao Pb.

Andrezza *et al.* (2010), observaram que o crescimento de *Pseudomonas* sp. se deu entre 20°C e 30°C, porém os autores descrevem o crescimento ótimo da bactéria sob a temperatura de 30°C com o crescimento de 2,112 g.L⁻¹ em meio complementado com 400 ppm de Pb, corroborando com os resultados deste trabalho. Chatterjee *et al.*, (2012), observam uma faixa ótima de temperatura para o crescimento de duas bactérias resistentes a chumbo entre 37°C e 45°C.

Pode-se observar na temperatura de 25°C (Figura 5A) o crescimento do isolado D foi semelhante em todas as concentrações, não havendo grandes diferenças no acúmulo de massa seca celular. Nas maiores temperaturas analisadas (40°C e 45°C), observa-se um decréscimo no crescimento do isolado D.

O efeito da temperatura na redução de Chumbo no sobrenadante foi avaliado durante 72 horas, com análises a cada 24 horas. Verificou-se que a temperatura influenciou diretamente na eficiência de remoção de chumbo pelo Isolado D no sobrenadante (Figura 6), foi observada que na temperatura de 30°C houve uma redução de 71,29% de chumbo no sobrenadante quando a concentração inicial foi 65 ppm (Figura 6B). A remoção nas outras faixas de temperatura (25°C, 35°C, 40°C, 45°C) não foi tão eficiente, se comparadas à temperatura de 30°C. Apesar disto, a capacidade de remoção de chumbo no sobrenadante, deve ser considerada visto que chegou a 22,22% de remoção na temperatura de 35°C na concentração de 300 ppm de chumbo (Figura 6C). A menor redução observou-se na temperatura de 45°C (Figura 6E) após as 72 horas de crescimento (3,33%). Com esse resultado, o Isolado D mostra-se eficiente e tolerante a chumbo e a temperatura de 45°C, podendo assim ser utilizado em processos de biorremediação de solos que variam a temperatura ao longo do dia. Conforme Andrezza *et al.* (2010) esse comportamento é considerado uma vantagem metabólica no biotratamento de ambientes naturais contaminados em que a temperatura pode variar.

A redução de chumbo do sobrenadante decresceu na seguinte ordem de temperatura para a concentração 35 ppm de 30°C > 35°C > 40°C > 45°C > 25°C; na concentração de 65 ppm 30°C > 35°C > 45°C > 25°C > 40°C; na concentração 150 ppm

30°C > 35°C > 40°C > 25°C > 45°C; e concentração 300 ppm 30°C > 35°C > 25°C > 40°C > 45°C.

Estes percentuais de redução do chumbo no sobrenadante podem ser explicadas pelo fato de elevadas temperaturas, até certo limite, conduzir o aumento da atividade metabólica (PRESCOTT *et al.*, 2002) e da energia do sistema, promovendo a absorção ativa ou a fixação do metal na superfície celular, respectivamente (KEFALA *et al.*, 1999; GOYAL *et al.*, 2003) ou ainda compartilhar a peculiaridade fenotípica de sobreviver e manter as funções metabólicas ativadas mesmo em temperaturas elevadas como acontece nos microrganismos termotolerantes.

Khatti *et al.* (2000) destaca que o aumento na temperatura pode afetar a solubilidade e o potencial químico do adsorvato. Desta forma, a alteração na temperatura de um processo conduz a uma mudança na capacidade de adsorção.

Em processos de remoção, o efeito da temperatura sobre o sistema, afeta principalmente a constante de velocidade de remoção. Um aumento na temperatura pode ocasionar aumento de energia cinética e na mobilidade das moléculas do adsorvato e ainda provocar um aumento na taxa de difusão intra-partícula do adsorvato, o que pode incidir no decréscimo da adsorção do metal pelo microrganismo (JIMENEZ R., 2004). Fato este observado neste estudo, onde houve decréscimo da adsorção chumbo pelo isolado D conforme aumento da temperatura (Figura 6).

Segundo Vegliò e Beolchini (1997), a temperatura na bioadsorção parece afetar apenas extensão dentro da faixa de 20°C - 45°C. Temperaturas dentro desta faixa aumentam a sorção devido ao aumento da atividade de superfície e energia cinética do bioadsorvente, no entanto, danos físicos para o bioadsorvente podem ser esperados em maiores temperaturas, devido à natureza exotérmica da adsorção de alguns processos. Um aumento excessivo de temperatura foi observado como redutor da capacidade de bioadsorção da biomassa.

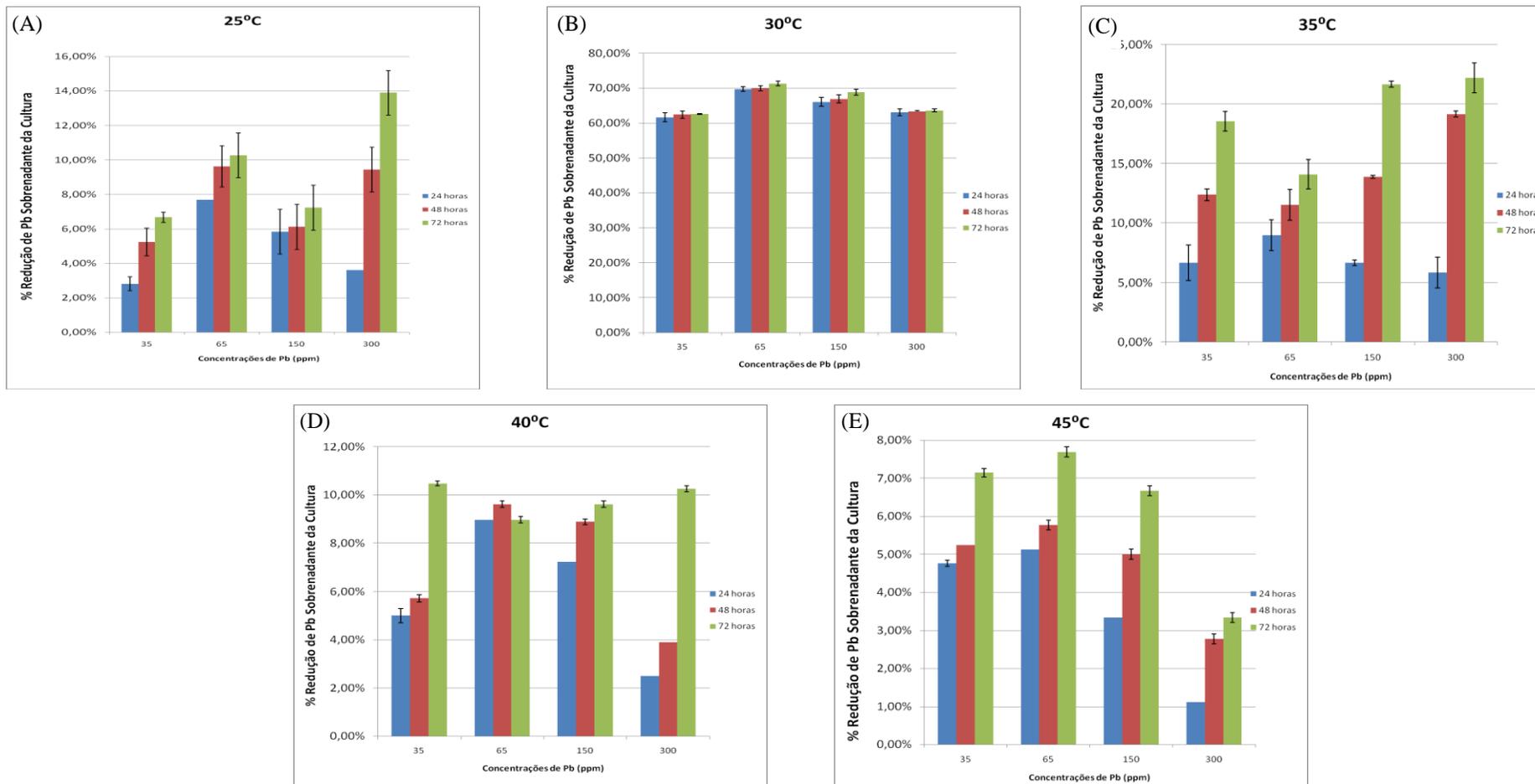


Figura 6: Efeito da temperatura na remoção de Chumbo no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutricional complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Podemos observar neste estudo que conforme Vegliò e Beolchini (1997) afirmaram, quando a temperatura foi elevada no experimento, a taxa de remoção de redução do chumbo no sobrenadante foi decaindo. Ao elevar a temperatura de 25°C para 30°C (Figuras 6A e 6B) foi observado um grande aumento no percentual de remoção do Pb. Foi observado que após o maior valor de remoção encontrado na temperatura de 30°C (Figura 6B), conforme foi aumentando a temperatura foi decaindo o valor da remoção de Pb no sobrenadante, fato este que, conforme Vegliò e Beolchini (1997), em altas temperaturas, a parede celular pode ficar permanentemente danificada, e por este motivo, uma redução na taxa de ligação é observada.

Estudos realizados por Takamatsu (1995), com o uso de proteobactéria do gênero *Thiobacillus* em meio complementado com Pb, Zn e outros provenientes de lodo, no pH 4 a temperatura de 40°C, observou-se a remoção de 90% e 50% ,respectivamente, dos metais. Os resultados encontrado por Takamatsu (1995) discordam com os resultados achados neste estudo, visto que na temperatura de 40°C (Figura 6 D) o percentual de redução foi bem menor em todas as concentrações de chumbo utilizada. Este fato pode se explicado devido as bactérias usadas nestes estudos serem de espécies diferentes.

A temperatura de 30°C (Figura 6B) parece afetar substancialmente na remoção de Pb no sobrenadante pelo Isolado D. Takamatsu (1995), relatam que em temperaturas mais altas geralmente aumentam a adsorção devido o aumento da atividade de superfície e energia cinética do soluto. No entanto, Vijayaraghavam *et al.*, (2007) relatam que danos físicos para o microrganismo pode ser esperado em maiores temperaturas.

A adsorção de íons metálicos não envolve reações de energia, e a remoção de metais em solução se dá devido aos fenômenos puramente físicos e interações químicas entre a biomassa e os metais em solução. O aumento excessivo da temperatura reduz a capacidade de adsorção da biomassa. Segundo Marder *et al.*, (2003) foi observado que 62,3 % de Cd^{3+} foram removidos em 1g de algas secas na temperatura de equilíbrio a 20°C. Quando a temperatura foi elevada acima de 50°C, a percentual de adsorção de Cd^{2+} do meio diminuiu.

Basicamente, a adsorção é um processo de transferência de massa através da qual uma substância é transferida da fase líquida para a superfície de um sólido, e permanece ligada por interações físicas e/ou químicas. Korngold *et al.* (2002) revisaram mais de 100 trabalhos, entre 1984 e 2005, sobre a aplicação de vários adsorventes de baixo custo

derivado de resíduos agrícolas, subprodutos industriais ou material natural para a remoção de metais pesados (Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{4+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}) de efluentes contaminados. Em geral, a aplicabilidade da técnica e relação custo-benefício são fatores chave que desempenhem um papel importante na seleção dos mais adequados adsorventes para o tratamento de efluentes inorgânicos (AGUSTIONO *et al.*, 2006).

A adsorção (sorção e/ou absorção) de metais por microrganismos tem despertado a atenção de pesquisadores pela capacidade superior da biomassa microbiana em comparação com outros sorventes inorgânicos e orgânicos (KUREK *et al.*, 1982). Estudos têm demonstrado que, na maior parte dos casos, a bioacumulação de metais por microrganismos se deve a fenômenos de superfície (adsorção e/ou precipitação) (BEVERIDGE, 1989; SHOKOHIFARD *et al.*, 1990; COLLINS ; STOTZKY, 1992).

Eventualmente, conforme o tipo de metal e do microrganismo, a adsorção supera o número de cargas, com ocorrência de precipitados, de tal forma que se tem desenvolvido filtros biológicos para retirar metais pesados de soluções (BEVERIDGE; MURRAY, 1976).

O efeito da temperatura na adsorção de Pb pelo Isolado D pode ser observado na Figura 7. A maior adsorção de chumbo pelo Isolado D foi observada na temperatura de 30°C (Figura 7B) na concentração inicial de 300 ppm de chumbo, com a concentração de 32,258 ppm/mg massa seca seguida da temperatura de 35°C (Figura 7C) com a adsorção de 13,795 ppm/mg massa seca na concentração de 300 ppm e a menor adsorção foi observada na temperatura de 40°C ppm/mg massa seca com concentração de 35 ppm.

A adsorção do chumbo após 72 horas pelos microrganismos decresceu na seguinte ordem de temperatura (Figura 7): 35 ppm 35°C > 30°C > 45°C > 25°C > 40°C; 65 ppm 35°C > 40°C > 25°C > 45°C > 30°C; 150 ppm 35°C > 40°C > 30°C > 45°C > 25°C; 300 ppm 30°C > 35°C > 40°C > 45°C > 25°C (Figura 7). Embora os mecanismos de resistência bacteriana estão sendo estudados muito cuidadosamente, os exatos mecanismos por trás da resistência ao elemento Chumbo permanecem vagos (HYNNINEN, 2010). Várias $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ATPase de efluxo são conhecidas para transportar também Pb^{2+} (RENSING *et al.*, 1998) e além disso, o seqüestro de chumbo é conhecido por ser utilizado como um mecanismos de resistência (LEVINSON *et al.*, 1996; LEVINSON; MAHLER, 1988; MIRE *et al.*, 2004).

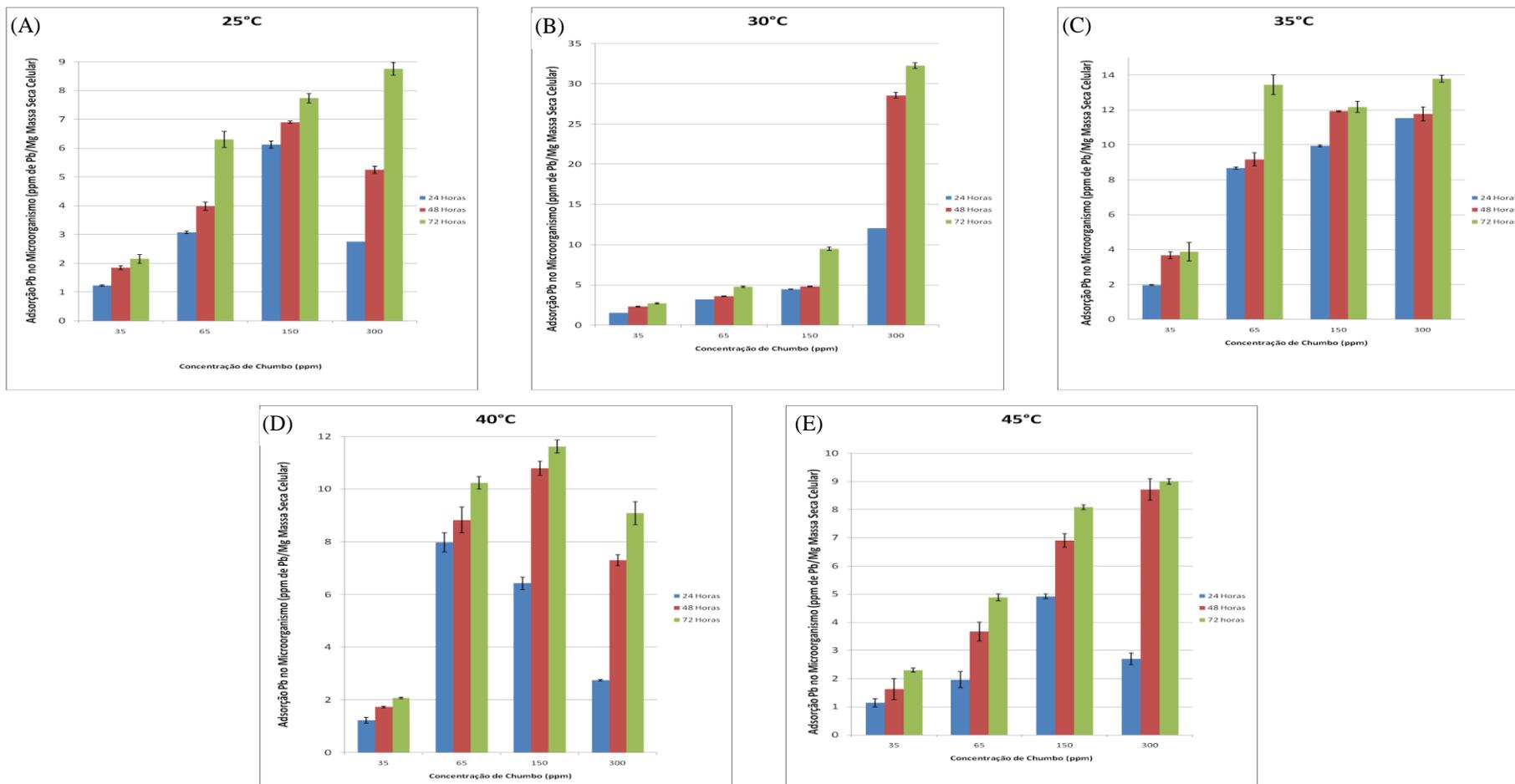


Figura 7: Efeito da temperatura na adsorção de Chumbo pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Chumbo nas concentrações 35, 65, 150, 300 ppm em 150 rpm no pH 5,5. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios.

Os mecanismos moleculares por traz do seqüestro de chumbo, ainda são poucos claros. Um dos poucos determinantes conhecidos da resistência de chumbo e codificado pelo agrupamento de genes *pbrTRABCED* oriundo de *C.metallidurans* CH34 (BORREMANS *et al.*, 2001). No entanto as suas funções exatas na resistência ao Pb são desconhecidas (HYNNINEN, 2010).

Zhou e Kiff (1996) relataram que a eficiência de remoção de Cu^{2+} por *R. arrizus* foi maior nas baixas concentrações iniciais. O tempo de contato curto (2,83 segundos) com a biomassa sugere que a adsorção na superfície da célula bacteriana é o principal mecanismo de captação, diferentemente de Zhou e Kiff, observaram que na menor concentração analisada, 35 ppm, houve um decréscimo na porcentagem de remoção em relação as concentrações superiores estudadas (65, 150 e 300 ppm).

Assim como Pons e Fuste (1993) que relataram que a porcentagem de captação de U aumentou com a concentração inicial aumentada, este estudo observou o mesmo para Chumbo (Figura 7).

Este estudo vai de encontro a afirmação de Vijayaraghavan *et al.* (2006) que reportaram que a taxa inicial de absorção do metal aumentou com o aumento da concentração inicial do metal no meio. A menor concentração inicial de chumbo (35 ppm), com a mesma quantidade inicial de Isolado D (0,1 DO/ml) que as demais concentrações (65, 150 e 300 ppm), obteve os menores valores de captação de chumbo pelo Isolado D. O aumento da remoção do chumbo pelo Isolado D do sobrenadante foi crescente conforme aumento da concentração inicial de chumbo em todos os valores de temperatura analisada.

Indo de encontro com o descrito acima Kuyucak e Volesky (1988) reportaram que a taxa inicial de absorção do chumbo aumentou com o aumento da concentração inicial de metal.

Pode-se observar notar na figura 7 houve uma pequena redução no valor de remoção do chumbo pelo Isolado D no valor de 35°C para 45°C (Figuras 7C e 7E), porém houve um aumento de remoção de Chumbo quando alterada a temperatura de 25°C para 30°C (Figuras 7A e 7B).

Na Figura 7 podemos observar que não houve grande mudança no valor de remoção do chumbo nas temperaturas de 25°C e 45°C (Figuras 7A e 7E). Porém houve um aumento no valor de remoção na temperatura de 30°C (Figura 7B) para a concentração de 300 ppm de chumbo. Estes dados de remoção podem estar relacionados ao crescimento do

Isolado D nas temperaturas de 25°C e 45°C (Fig. 5A e 5E) que também foram baixos quando comparados ao crescimento nas temperaturas 30°C e 35°C. Aksu e Kutsal (1991) relataram que a captação de Pb por *Chlorella vulgaris* incrementou com o aumento da temperatura de 15°C a 35°C Kuyucak e Volesky (1989) relataram que a adsorção de Co^{2+} por algas marinhas aumentou com um aumento na temperatura.

Segundo Vegliò e Beolchini (1997), a temperatura de biossorção parece afetar apenas a uma menor medida dentro do intervalo de 20°C - 35°C, dado este que corrobora com este estudo que obteve a temperatura de 30 °C sendo mais eficiente na remoção do chumbo no sobrenadante assim como a adsorção do chumbo pelo Isolado D.

5.4.3 Efeito da fonte de carbono no crescimento, na redução de Pb no sobrenadante da cultura e adsorção de Pb pelo isolado D

Para verificar o crescimento bacteriano em diferentes fontes de carbono foi utilizado de meio caldo nutriente complementado com 300 ppm de Chumbo, concentração esta, a de maior valor analisada nas variações de pH e Temperatura. Como fontes de carbono foram utilizadas a 1% de Glicose, Frutose, Sacarose e Lactose, Controle 1 sem a adição de fonte de carbono com Pb e 0 sem a adição de Chumbo e Fonte de Carbono.

É de suma importância o acompanhamento da interação entre metais com o metabolismo microbiano, através das variações do substrato a ser utilizado com o processo de bioacumulo de micronutrientes, pois seu rendimento altera com essas variações. (TORTO; PRIOR, 2005).

Alguns elementos como o carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio são constituintes principais das moléculas orgânicas. O carbono participa da síntese dos compostos orgânicos necessários para que a célula se torne viável, sendo considerado o elemento celular básico da constituição de todos os seres vivos (TORTORA *et al.*, 2004).

Neste trabalho foram utilizadas como fontes de carbono a glicose, frutose, sacarose e a lactose, que foram adicionadas na concentração de 1% ao meio de cultura complementado com 300 ppm de chumbo. Ao comparar o crescimento da massa celular seca, observa-se um crescimento muito próximo entre todas as fontes de carbono testadas com a concentração de 1% (Figura 8). O crescimento quando se utilizou Chumbo + Frutose (Figura 8D) foi superior ao crescimento do controle (0 metal e 0 fonte de carbono),

chegando ao peso de 6,790 g.L⁻¹, enquanto controle teve o peso de 6,157 g.L⁻¹. Possivelmente, isso deve-se ao fato da adição da frutose ser um elemento de fonte de energia.

Dos resultados mostrados na figura 8, podemos observar que Frutose (Figura 8D) ocorreu o crescimento quando comparado com as demais fontes de carbono. Resultados semelhantes também foram encontrados por Gonzales *et al.* (2008), onde os autores estudaram também o uso de sacarose como fonte de carbono em meio complementado com chumbo, e neste meio o crescimento foi superior aos outros complementados com outras fontes de carbono.

Pode-se observar que mesmo com a adição de 300 ppm de chumbo nas amostras não houve a inibição do crescimento celular quando comparado ao controle (0 metal, 0 fonte de carbono). Os resultados mostram o crescimento da massa celular constante em todas as amostras pelo período de 72 horas, somente a amostra complementada com frutose (Figura 8D) teve uma retração após 48 horas de incubação, fato este que pode estar relacionada ao grande crescimento nas primeiras 24 horas, onde foram consumidas a maior parte dos nutrientes do meio. A amostra complementada com glicose (Figura 8C) obteve o menor crescimento, mesmo comparada ao controle (Figura 8A) (0 metal + 0 fonte de carbono).

O crescimento da massa seca celular decresceu na seguinte ordem: Frutose \geq Lactose > Controle > Sacarose > Chumbo sem fonte de carbono > Glicose (Figura 8) no tempo 48 horas.

Normalmente, o meio de cultivo é importante para o crescimento dos microrganismos. Fatores tais como concentração inicial de açúcar, fontes complexas de nitrogênio, concentrações de íons carbonato, pH e temperatura do meio de crescimento são reportados como os fatores mais críticos que afetam o crescimento celular (SAMUELOV *et al.*, 1991; NGHIEM *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1999 a, b).

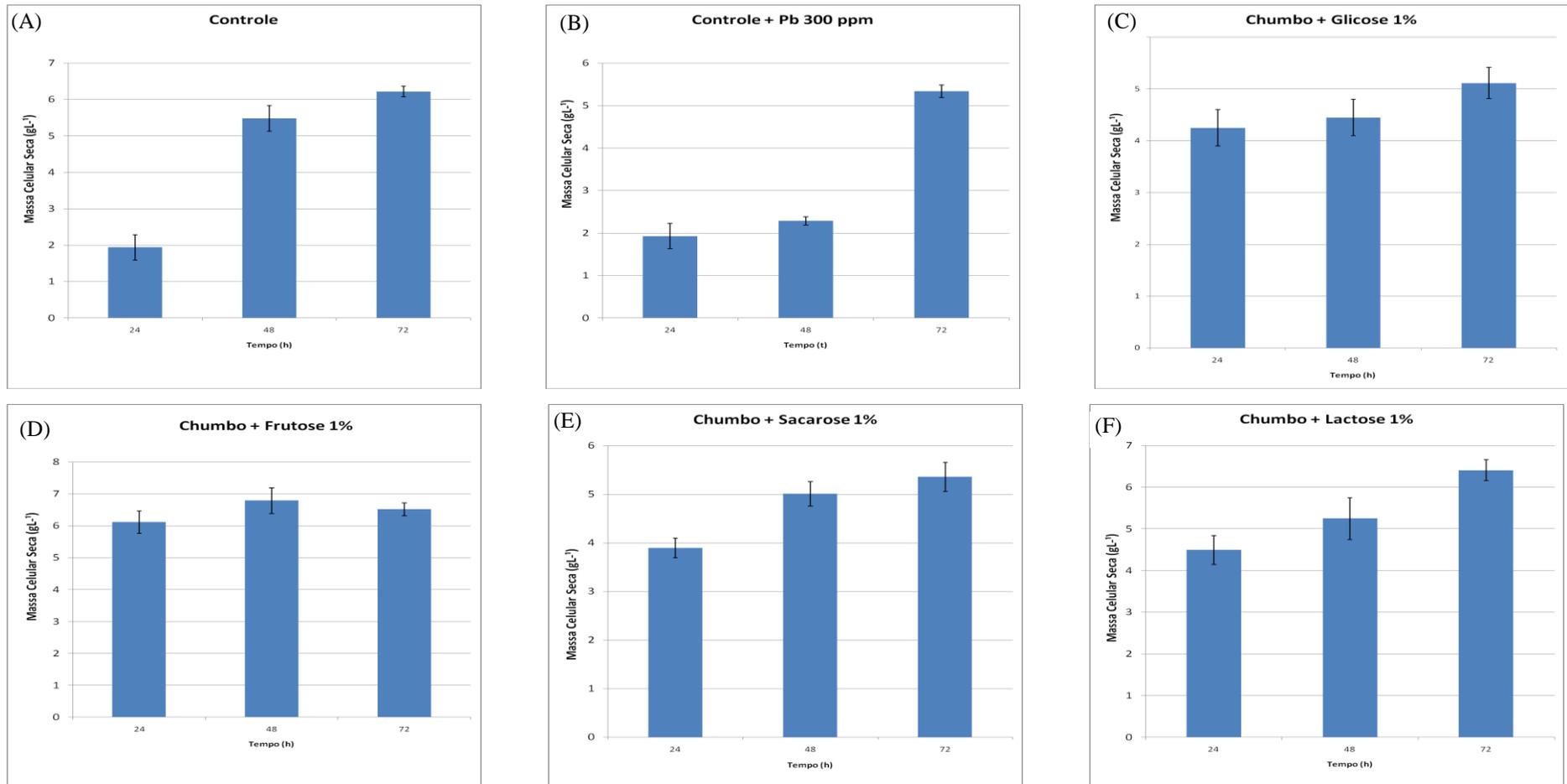


Figura 8: Efeito da fonte de carbono no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Chumbo 300 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): Controle; (B): 300 ppm Chumbo sem fonte de carbono; (C): Glicose; (D): Frutose; (E): Sacarose; (F): Lactose. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

A maioria dos microrganismos sofre inibição do crescimento celular em concentrações iniciais de glicose como fonte de carbono acima de 20,0 g/L (GONZALES *et al.*, 2008; CORONA *et al.*, 2008). Os dados encontrados neste estudo (figura 8) evidenciam que, quando utilizada a glicose como fonte de carbono verifica-se um relativa redução do crescimento celular, mesmo quando comparando ao controle, sugerindo um começo de inibição. Comportamento semelhante foi observado por outros autores, além de Gonzales *et al.* (2008) durante experimentos com variação na concentração inicial de glicose, entre 10 e 90 g/L, por CHEN *et al.* (2010), onde efeitos de inibição sobre o crescimento de *Actinobacillus succinogenes* NJ113 foram observados em 50 g/L de glicose, um valor bem mais alto que usado neste estudo.

Quando comparamos o crescimento do Isolado D nas diferentes fontes de carbono ao meio complementado com chumbo (Figura 8B), destaca-se o uso das fontes de carbono frutose e lactose (Figuras D e F), onde a massa seca celular foi superior ao crescimento do controle. Nota-se que não houve inibição do crescimento celular no experimento. Verifica-se que para os diferentes ensaios, os resultados foram semelhantes em todos os experimentos.

Pode-se observar que a presença da glicose (Figura 8C) pode ter contribuído com o decréscimo no crescimento do Isolado D quando relacionamos as outras fontes de carbono utilizadas. Guetler *et al.* (1998) observaram em seu estudo resultado semelhante, onde bactérias Gram negativas foram testadas em meio complementado com chumbo e adicionado com variados substratos, como celobiose, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, manose, sorbitol, glicose, xilose e sacarose, resultando um menor crescimento na glicose.

Bae *et al.* (2001), avaliando o efeito das fontes de carbono maltose e sacarose no crescimento de microrganismos e produção de exopolímeros para o fungo *Paecilomyces japonica*, ressaltaram que estas duas fontes de carbono são ideais para o crescimento de *P. japonica* não apresentando diferenças significativas na quantidade de biomassa produzida.

A maioria das bactérias são heterotróficas, ou seja, obtém energia a partir de fontes orgânicas de carbono. Destas, as mais comuns são os carboidratos, particularmente D-glicose; aminoácidos; ácidos carboxílicos; lipídios; álcoois e até mesmo polímeros como amido e celulose. Na realidade, qualquer composto orgânico e muitos sintéticos podem ser utilizados por algum microrganismo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O percentual de redução de chumbo no sobrenadante das amostras mostrou-se mais eficaz com o complemento Lactose (Figura 9E), tendo uma redução observada de 17,92% após o período de 72 horas. Observa-se também que o maior percentual de redução nas primeiras 24 horas foi para glicose e lactose com a redução de 7,08% (Figuras 9B e 9E).

Ao comparar-mos o percentual de redução de chumbo no sobrenadante do controle 300ppm (chumbo 300 ppm sem fonte de carbono – Figura 9A) com as amostras complementadas com frutose, lactose e sacarose observa-se um percentual de redução maior nas amostras complementadas, 15,83%, 17,92% e 16,25% respectivamente (Fig. 9C, 9E e 9D). A amostra complementada com glicose foi à única que teve o percentual de redução máximo inferior ao controle, dado esse possivelmente ligado diretamente ao crescimento da massa celular, onde a amostra com glicose foi a com menor peso celular após 72 horas de inoculação.

Quando comparamos a menor taxa de redução de chumbo no sobrenadante com o menor crescimento celular podemos destacar que o resultado para glicose, que se encontra proporcional, onde menor crescimento do isolado D houve a menor remoção do chumbo no sobrenadante.

Analisando os resultados de crescimento e capacidade percentual de remoção do sobrenadante, podemos observar que as fontes de nutrientes disponíveis no meio onde se obtém o maior crescimento de biomassa não produzem necessariamente o melhor resultado em relação à capacidade de remoção de chumbo do sobrenadante. Esse dado pode ser observado na figura 7, no meio chumbo + frutose 1% (Figura 8D) que teve o melhor crescimento, ou seja, maior concentração de massa celular, porém o percentual de remoção de chumbo no sobrenadante foi observado para o meio chumbo + lactose 1% (Figura 9E).

Buscando avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na concentração de 1% no crescimento e na capacidade de adsorção da biomassa do Isolado D (Figura 10), foram testadas diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose e lactose). Estas fontes de carbono e concentração são geralmente utilizadas para o crescimento de diferentes espécies de microrganismos, sendo que cada espécie se comporta diferentemente em relação aos nutrientes disponíveis no meio de cultivo (AGUILAR USCANGA; FRANÇOIS, 2003).

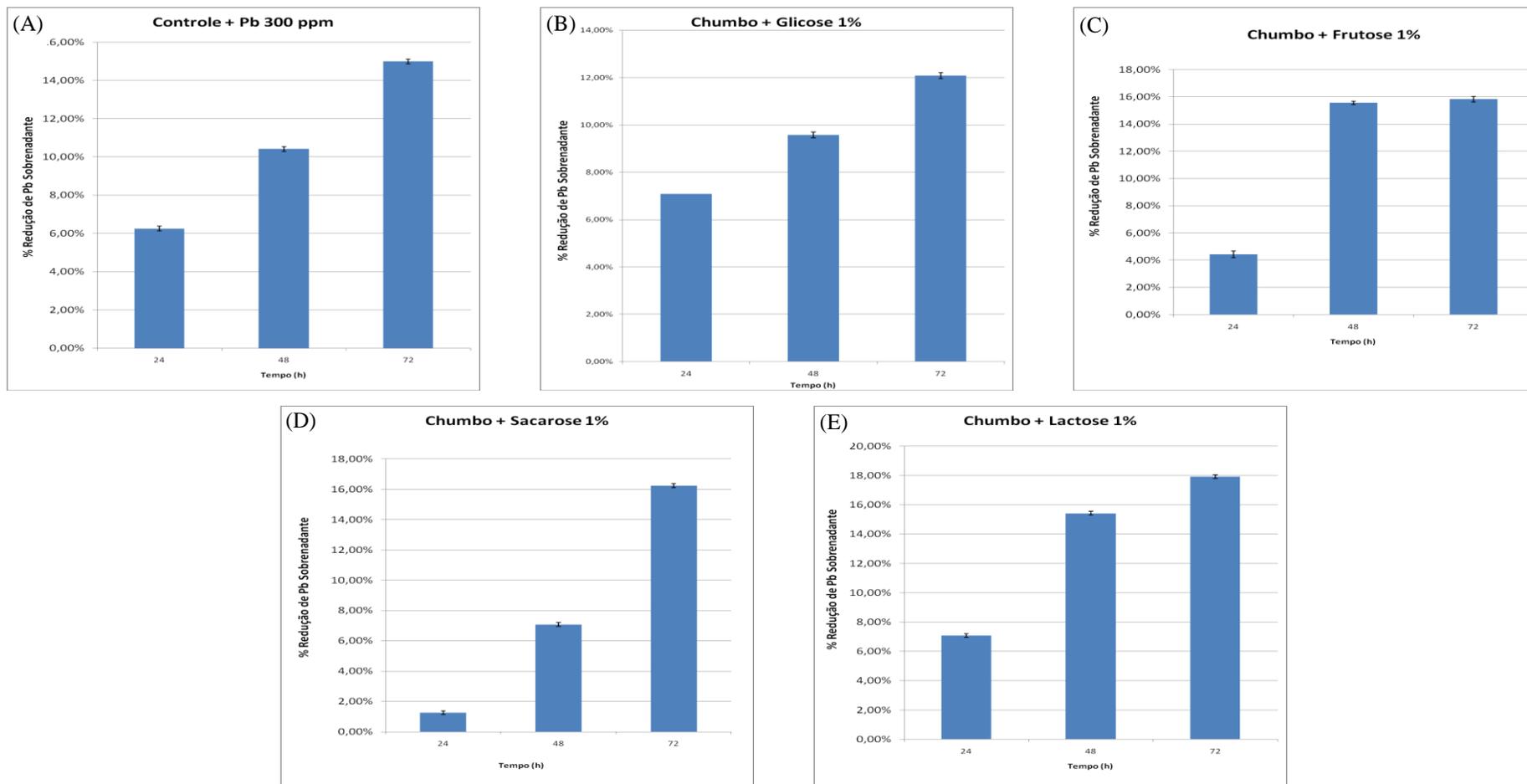


Figura 9: Efeito da fonte de carbono na redução de Chumbo no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutricional complementado de Chumbo 300 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 300 ppm Chumbo sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Foi avaliada a quantidade de Chumbo adsorvido pelo microrganismo através da digestão e análise de espectrofotometria de absorção atômica da massa seca (pellet) nas amostras com diferentes fontes de carbono. Após as análises observou-se uma maior concentração de chumbo na amostra complementada com sacarose com 13,88 ppm/mg massa celular seca (Figura 10D), seguida pelo controle (sem adição de fonte de carbono) (Figura 10A) com a concentração de 10,68 ppm/mg massa seca. A menor concentração adsorvida de chumbo no microrganismo foi para o meio complementado com frutose (Figura 10C), tendo apenas 3,401 ppm/mg massa celular seca.

Podemos observar na Figura 10, que somente o meio chumbo + sacarose (13,88 ppm/mg massa celular seca) teve valor superior de adsorção do metal pelo Isolado D do que o valor apresentado no Controle (10,68 ppm/mg massa celular seca). Esse dado pode significar que as outras fontes de carbono (glicose, frutose e lactose) podem inibir a adsorção do metal pelo microrganismos. A capacidade bioassortiva foi variável para cada fonte de carbono.

Ao analisarmos os dados de crescimento do Isolado D, observou-se o maior crescimento celular no meio chumbo + frutose (6.790 g.L⁻¹), porém a maior adsorção de chumbo no isolado D foi observada em chumbo + sacarose (13,88 ppm mg massa seca). Conforme Barbieri (2014), nem sempre a fonte de carbono que determina o melhor crescimento da biomassa é a mais favorável à capacidade de adsorção do microrganismo.

De acordo com Ene *et al.* (2012), em um estudo com o fungo ascomiceto *Candida albicans*, diferentes fontes de carbono promovem uma remodelação da parede celular afetando processos relacionados com a superfície das células, dado este que pode ter ocorrido com as bactérias do Isolado D.

Ao analisar o efeito do tempo de crescimento na adsorção de chumbo, pode-se observar que para todas as fontes de carbono a adsorção de chumbo no Isolado D foi maior durante as 72 horas de crescimento. Podemos destacar a adsorção no meio chumbo + sacarose (Figura 10D), onde as primeiras 48 horas foram praticamente estáveis (24 horas: 4,039 ppm e 48 horas: 4,102 ppm/mg Massa celular seca), tendo um acréscimo nas últimas 24 horas (72 horas: 13,88 ppm/mg Massa celular seca).

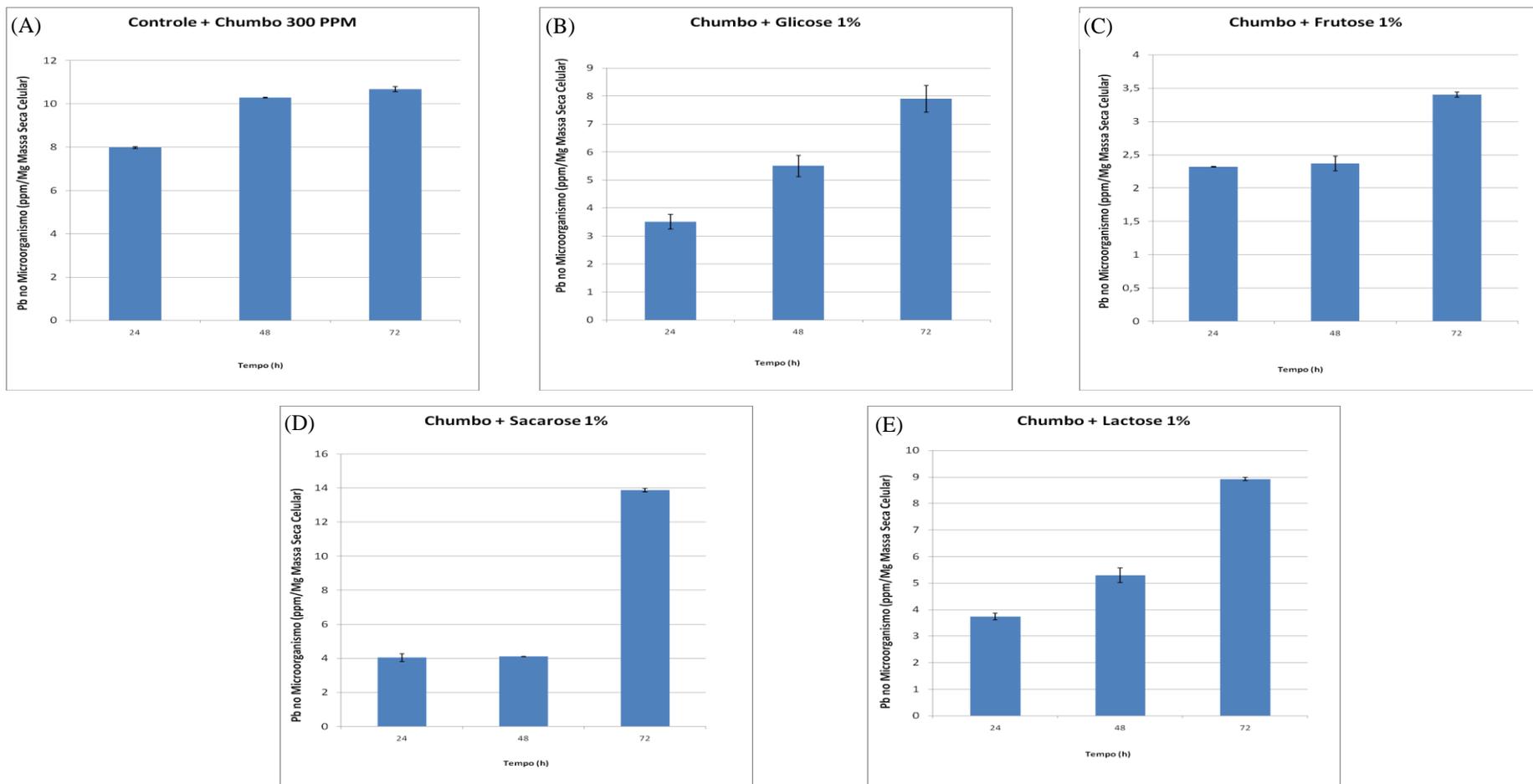


Figura 10: Efeito da fonte de carbono na adsorção de Chumbo pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutricional complementado de Chumbo 300 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 300 ppm Chumbo sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E): Lactose. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

5.5 ANÁLISE DO ISOLADO D NO MEIO DE CULTURA COMPLEMENTADO COM ZINCO

O zinco é considerado elemento essencial as plantas e animais pelo seu papel nos processos metabólicos de carboidratos, ácidos nucléicos e lipídeos, na ativação de enzimas e na síntese de proteínas. Em concentrações acima de 3mg/mL, causa efeitos de adstringência e coloração empalidecida à água potável (WHO, 1996).

O zinco é essencial ao corpo humano, em pequenas quantidades. Só se torna prejudicial à saúde quando ingerido em concentrações muito elevadas, o que é extremamente raro, e, neste caso, pode acumular-se em outros tecidos do organismo humano (CETESB, 2009). É um dos poluentes mais comumente encontrados nos efluentes industriais. As emissões antropogênicas são maiores que as naturais, provenientes das metalúrgicas, bacias de rejeitos da mineração, cinzas de processos de combustão, e o uso de produtos comerciais, tais como conservantes de madeira e fertilizantes a base de zinco (CLARISSE; AMORIM; LUCAS, 1999).

5.5.1 Efeito do pH no crescimento, na redução de Zn no sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo Isolado D

Neste estudo as amostras com concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm de zinco foram submetidas a diferentes valores de pH (3.5; 4; 4.5; 5; 5.5 e 6), inicialmente na temperatura de 30°C para verificar em qual pH obtém-se o melhor crescimento, redução de Zn no sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo Isolado D. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios.

Na Figura 10 podemos observar o efeito do pH no crescimento do Isolado D nos pH 5.0 e 5.5 foram próximos em todas as concentrações analisadas de zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm). Outro dado que foi verificado, é que em todos os valores de pH analisados, o Isolado D manteve crescimento constante durante as 72 horas de incubação, para todas as concentrações (exceto para o pH 5.5 concentração inicial de 400 ppm).

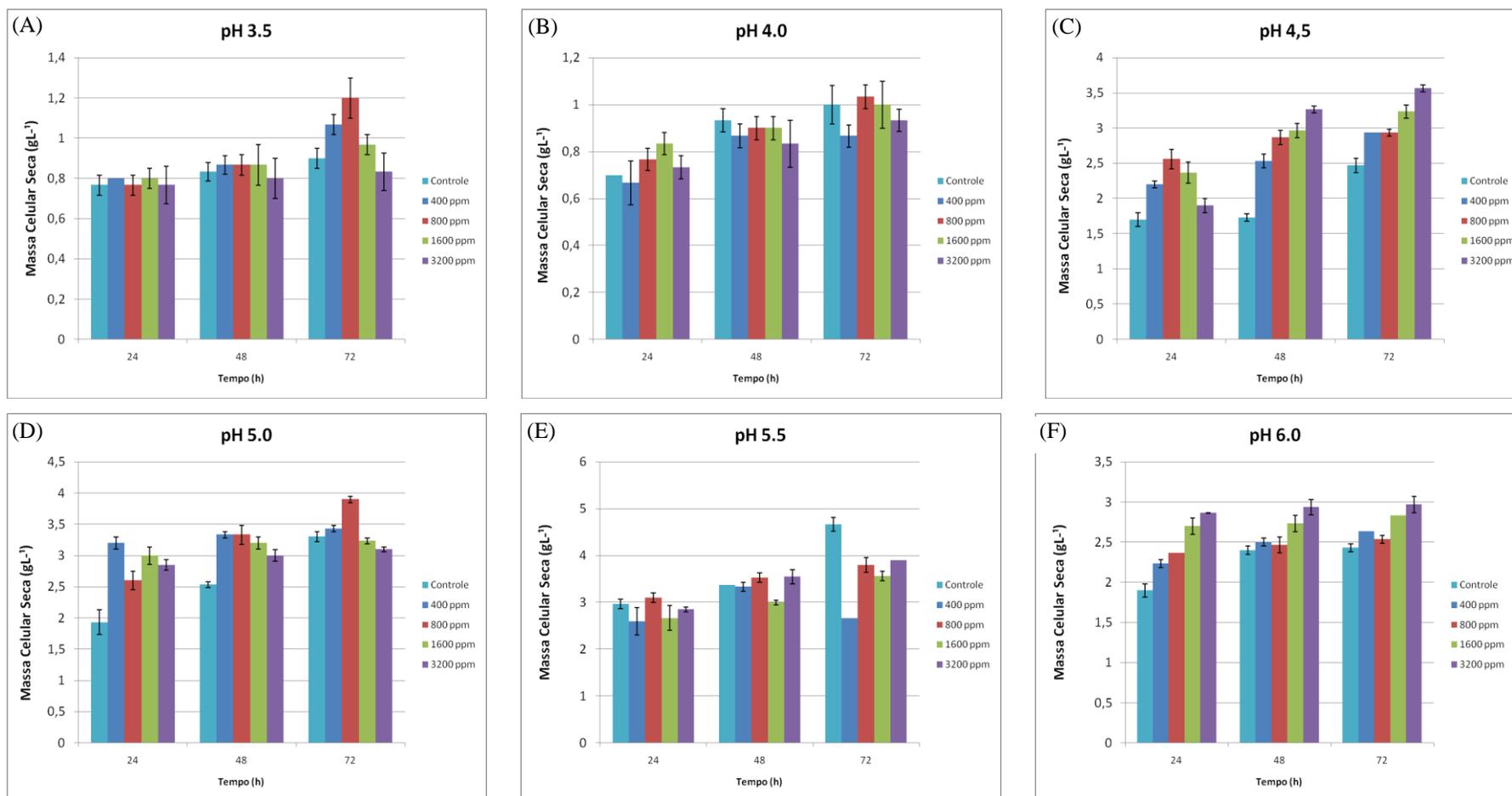


Figura 11: Efeito do pH no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Verificamos que no pH 5.5 ocorreu o maior crescimento do Isolado D. Este dado confronta ao estudo de Lemos *et al.* (2008), que observaram para um crescimento microbiano o pH 5 é o mais eficiente, visto que valores acima deste podem causar a precipitação do zinco no meio, além de dificultar sua remoção pelo microrganismo. A maioria das bactérias cresce entre pH 6 e 8 e poucas crescem em pH 4.0. Um grupo distinto de bactérias, as acidófilas são capazes de se desenvolver em pH ácido e as quimioautotróficas que oxidam o enxofre para formar o ácido sulfúrico podem sobreviver em pH 1,0. (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002)

Observou-se que os valores mais baixos de pH (3.5 e 4.0) obtiveram os menores crescimentos do Isolado D (Figuras 10A e 10B) para todas as concentrações de Zn quando comparadas com os outros valores de pH analisados. Os microrganismos do solo podem ser classificados em relação à tolerância de pH como insensíveis quando são tolerantes a uma ampla faixa de pH, neutrófilos se não toleram acidez e alcalinidade, acidófilos quando crescem bem em condições ácidas e basófilos se apresentarem melhor crescimento em condições alcalinas (TORTORA *et al.*, 2004).

Conforme Catelan e Vidor (1990), a grande maioria dos solos tem pH entre 4.0 e 8.5. O pH pode baixar quando ocorrer nesse solo a fertilização em grandes quantidades e também a fixação biológica do nitrogênio. O substrato a ser metabolizado pelos microrganismos também influencia na flutuação do pH do solo (CATELAN E VIDOR, 1990), sendo assim a capacidade do Isolado D da Família Enterobacteriaceae em ter um bom crescimento na faixa de pH 7 a 7.5 pode ser útil para estabelecer estratégias de remoção do zinco em ambientes contaminados.

O crescimento do Isolado D foi crescente, conforme foi aumentado o valor do pH (3.5 a 5.5), decrescendo somente no último valor de pH analisado (6.0) (Figura 10E), o que demonstra que as concentrações de Zinco não limitaram o crescimento do Isolado D em nenhum valor de pH testado. Observa-se que o crescimento foi constante durante todas as 72 horas de inoculação. Em estudos realizados por Chen *et al* (2006), *Pseudomonas putida* CZ1 foi capaz de crescer continuamente durante todo o período de 72 horas de cultivo na presença de cobre e zinco assim como observado neste estudo.

O crescimento do Isolado D pode ser destacado no pH 5.5 (Figura 10E), na maior concentração estudada (3200 ppm), que produziu ao final de 72 horas de cultivo 3,9 g.L⁻¹ de massa celular seca. Deve-se salientar, que o crescimento foi crescente nas 72 horas de análise, não havendo a observação de decaimento da massa seca celular para a concentração inicial de

3200 ppm no pH 5.5. Ainda analisando o crescimento do isolado D no pH 5.5 apenas na concentração inicial de 400 ppm houve um decréscimo após 72 horas de incubação, fato este, que não foi observado nos outros valores de pH estudado.

Segundo Frazier & Westhoff (1933) as bactérias da Família Enterobacteriaceae tem como seu pH ótimo de crescimento a faixa de e 7,0 a 7,5, com um pH mínimo e máximo de crescimento no valor de 4,0 a 8,5 respectivamente. O valor encontrado neste estudo, de pH ótimo de 5.5, discorda do estudo de Frazier e Westhoff, porém ainda se encontra dentro da faixa de crescimento proposta por eles (4,0 a 8,5).

Conforme observado na Figura 10, o menor crescimento do Isolado D ocorreu no pH 4.0 (Figura 10B), com a concentração total de $0,867 \text{ g.L}^{-1}$ de massa celular seca na concentração inicial de 400 ppm de zinco, todavia, não podemos considerar que o Zn teve ação inibitória, sendo que o Isolado D foi capaz de resistir a concentração zinco presente e teve um crescimento superior nas concentrações maiores, o que sugere o desenvolvimento de adaptação fisiológica ao metal.

Estudos demonstram que a exposição dos microrganismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância pela comunidade microbiana exercendo pressão seletiva a resistência aos metais, então esses organismos por sua vez podem ser utilizados biorremediação de metais (ELLIS, 2003). Este dado pode explicar a resistência do Isolado D ao zinco complementado ao meio de cultura neste estudo, que mesmo nas concentrações mais altas (3200 ppm de Zn) ocorreu o crescimento.

Conforme observamos na Figura 11, após as análises do efeito do pH, constatou-se que tanto para o crescimento bacteriano quanto para a redução do Zinco no sobrenadante, dentre as variações de pH analisadas, o pH ótimo foi o de 5.5 (Figura E) observando-se uma redução de até 43,79% de zinco no sobrenadante para a concentração inicial de 400ppm, sendo este pH escolhido para uso nas análises das variações de temperatura e fontes de carbono, assim como ocorreu para Pb, que teve o maior percentual de remoção no pH 5.5 na concentração de 65 ppm de Pb. No pH 5.5 observou-se que houve um percentual de redução maior em todas as concentrações analisadas.

A biossorção de zinco em onze diferentes espécies de microalgas marinhas a diferentes valores de pH foi testada por Senthilkumar *et al.* (2006). Estes autores concluíram que a alga verde *Ulva reticulata*, exibe o maior valor de acumulação com $36,1 \text{ mg g}^{-1}$ no pH 5.5 e para uma concentração inicial de Zn (II) de 100 mg/l.

Moberly *et al.* (2010) verificaram que o aumento da concentração de ZnHPO_4 (aq) com elevação do pH favoreceu uma maior remoção da espécie *Arthrobacter* sp devido transportadores específicos para a molécula de fosfatos inorgânicos. Neste trabalho, a elevação do pH em conjunto com as variações na concentração de Zinco no meio também pode ter contribuído para o aumento da remoção pelo Isolado D, pertencente família Enterobacteriaceae, mesmo em pH mais baixo, como ocorreu no pH 3.5 (Figura A) com a redução de 0,68% de zinco na solução com concentração inicial de 3200 ppm, fato que pode estar relacionado a disponibilidade de sítios de ligação nas células.

Diferenças na afinidade entre elementos e suas espécies iônicas pode existir pela variação de ligantes encontrados nos sistemas biológicos (GUPTA *et al.*, 2000). Pagnanelli *et al.* (2003), a partir de dados obtidos em experimentos utilizando *Sphaerotilus natans* observaram o efeito positivo do aumento do pH na remoção de poluentes e também as séries de afinidade da biomassa (Pb>Cu>Zn>Cd) refletindo as propriedades hidrolíticas dos metais.

Assim como para o crescimento bacteriano, o percentual de remoção de zinco do sobrenadante foi crescente conforme o aumento dos valores de pH, diminuindo a remoção, assim como o crescimento no maior valor de pH estudado (pH 6.0). Deve-se destacar que esse fato não foi observado quando comparamos o percentual de remoção nos valores de pH 4.0 (3,63%) e 4.5 (2,71%) na concentração inicial de 800 ppm de zinco, que tiveram valores de remoção inferior ao encontrado no pH 3.5 (7,69%). O mesmo fato ocorreu para os valores de pH 3.5 (4,54%) e 4.0 (2,27%) na concentração de 1600 ppm, onde o valor de remoção de Zn foi inferior no pH 4.0 (Figura 11).

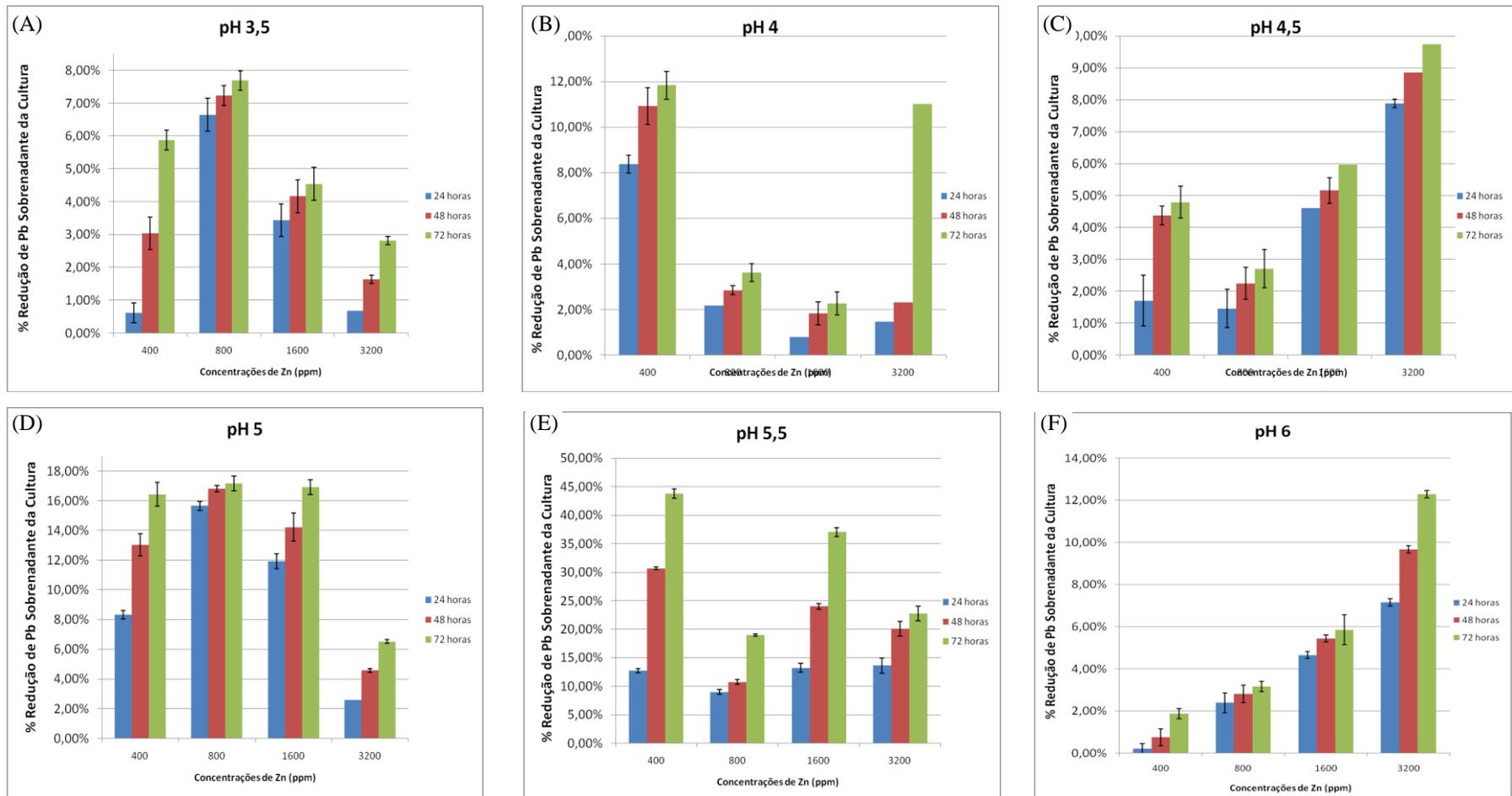


Figura 12: Efeito do pH na remoção de Zinco no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Mohapatra & Gupta (2005), utilizando como bioissorvente a planta *O. angustissima* observaram que capacidade de sorção monocomponente diminuem nesta ordem: Zn(II) > Co(II) > Cu(II); enquanto a afinidade para os metais mostrou uma tendência inversa Cu(II)>Co(II)>Zn(II) para pH 5.5, assim como o resultado de pH 5.5 obtido neste estudo.

Saeed *et al.* (2005), obtiveram boa eficiência na remoção de íons metálicos de soluções aquosas utilizando a biomassa da planta *Cicer arietinum*, com ordem de seletividade de Pb>Cd>Zn>Cu>Ni. A quantidade máxima removida de metais pesados (q_{max}) foi de respectivamente 49,97; 39,99; 33,81; 25,73 e 19,56 mgg⁻¹ da biomassa, remoção máxima em pH 5.

O pH da solução desempenha um papel muito importante na absorção e adsorção de metais pelos microrganismos por influenciar na especiação química dos metais em solução, bem como nas propriedades de superfície das células bacterianas (LOPES, *et al.*, 2000; PARDO *et al.*, 2003).

Os valores de pH analisados neste estudo (pH 3.5; 4; 4.5; 5; 5.5 e 6), foram mantidos através de solução tampão citrato, sendo assim, pouco ou nada alterados ao final de 72 horas de inoculação. Conforme estudo de Alexander (1977), caso haja variações altas no pH, a estirpe analisada pode ser capaz de causar uma reação de alcalinização no meio, podendo reduzir a solubilidade e atividade dos metais, uma vez que o aumento do pH pode promover a dissociação de alguns grupos hidroxila (OH) dos componentes do meio com predomínio de cargas negativas, as quais se ligam aos metais, diminuindo a disponibilidade e, portanto, a toxidez dos mesmos.

Segundo Sekhar *et al.* (2003), quanto maior a concentração do íon metálico, menor a eficiência de remoção pelo bioissorvente. Pois quando aumenta a concentração, sem variar a massa de bioissorvente, os sítios são saturados mais rapidamente. Este dado não foi observado neste experimento, a maior concentração de zinco no Isolado D foi observada no pH 5,5 (Figura 12E) na concentração inicial do meio de 1600 ppm com o acúmulo de 445,603 ppm no microrganismo. Foi observado nos pH 4.0 e 5.0 (Figuras 12C e 12D), que à medida que se aumentava a concentração de Zinco no meio, também aumentava a adsorção pelo Isolado D, dado este que pode estar relacionado ao crescimento bacteriano (Figura 10) que também foi crescente, conforme se aumentava a concentração de zinco no meio caldo nutritivo.

Estes dados diferem do resultado observado no percentual de remoção de Zinco no sobrenadante nos pH 4.0 e 5.0 (Figuras 11B e 11E), onde as menores concentrações do metal

ocorreram nos maiores valores de remoção pelo Isolado D no meio. Barros *et al.*, (2003) observaram comportamento similar a este em relação à biossorção de cádmio por biomassa de *Aspergillus Níger*, houve aumento na capacidade de adsorção e concomitante diminuição na capacidade de remoção percentual em relação ao aumento da concentração inicial do metal.

As maiores adsorções do metal pelo Isolado D ocorreram no pH 5.5 na concentração inicial de 1600 ppm, totalizando o acúmulo de 445,603 ppm de zinco, seguido pela concentração de 3200 ppm (314,32 ppm de zinco). Nos valores de pH analisados (exceto 5.5), a adsorção de zinco foi crescente conforme aumentava-se a concentração do metal no meio.

Banerjee *et al.*, (2007), estudaram a capacidade da adsorção de Zn, Cu, Ga, Ge e As por microrganismos e constataram que a adsorção é melhor no pH 4 para todos os metais estudados, exceto para Ge que é removido até 100% em pH 7 em 6 horas de contato. Goksungur *et al.* (2003) estudaram a adsorção do Cu^{2+} em solução aquosa de concentração inicial de 10-50 mg/ml com pH 4.0 e obtiveram 100% de remoção para as maiores concentrações entre 30 e 60 minutos.

.Assim como observado nesse estudo, Pagnaneli *et al.* (2003) diz que a tendência geral é que a remoção de metal aumente com o aumento do pH. Isto não acontece apenas por causa da competição de íon do hidrogênio a baixo pH, mas também por causa da natureza ácida fraca dos sítios ativos do biossorvente, cuja desprotonação com pH crescente, favorece a captação de metal. Ao contrário quando o pH é baixo, a superfície do biossorvente torna-se mais positiva, reduzindo a atração entre a biomassa e o cátion metálico (SAEED *et al.*, 2005).

Sekhar *et al.* (2003) estudaram a remoção de metais em pH variando entre 1 a 7, e obtiveram o maior seqüestro de íons entre valores 4 e 5, sendo que o acúmulo se manteve constante até valores de pH próximos a 7. Diferentemente de Sekhar *et al.* (2003), neste estudo observou-se que o pH 5.5 (Fig. 12E) obteve a melhor adsorção de Zn, decaindo a adsorção no pH 6 (Figura 12 F)

Alguns metais microprecipitam em pH próximos a 5 e 6, sendo os ensaios conduzidos em condições de pH inferiores, principalmente quando se estuda a adsorção para metais como zinco, cobre e prata (VOLESKY; HOLAN, 1995). Porém mesmo trabalhando com pH 5.5 e 6 não observou-se a precipitação do Zn.

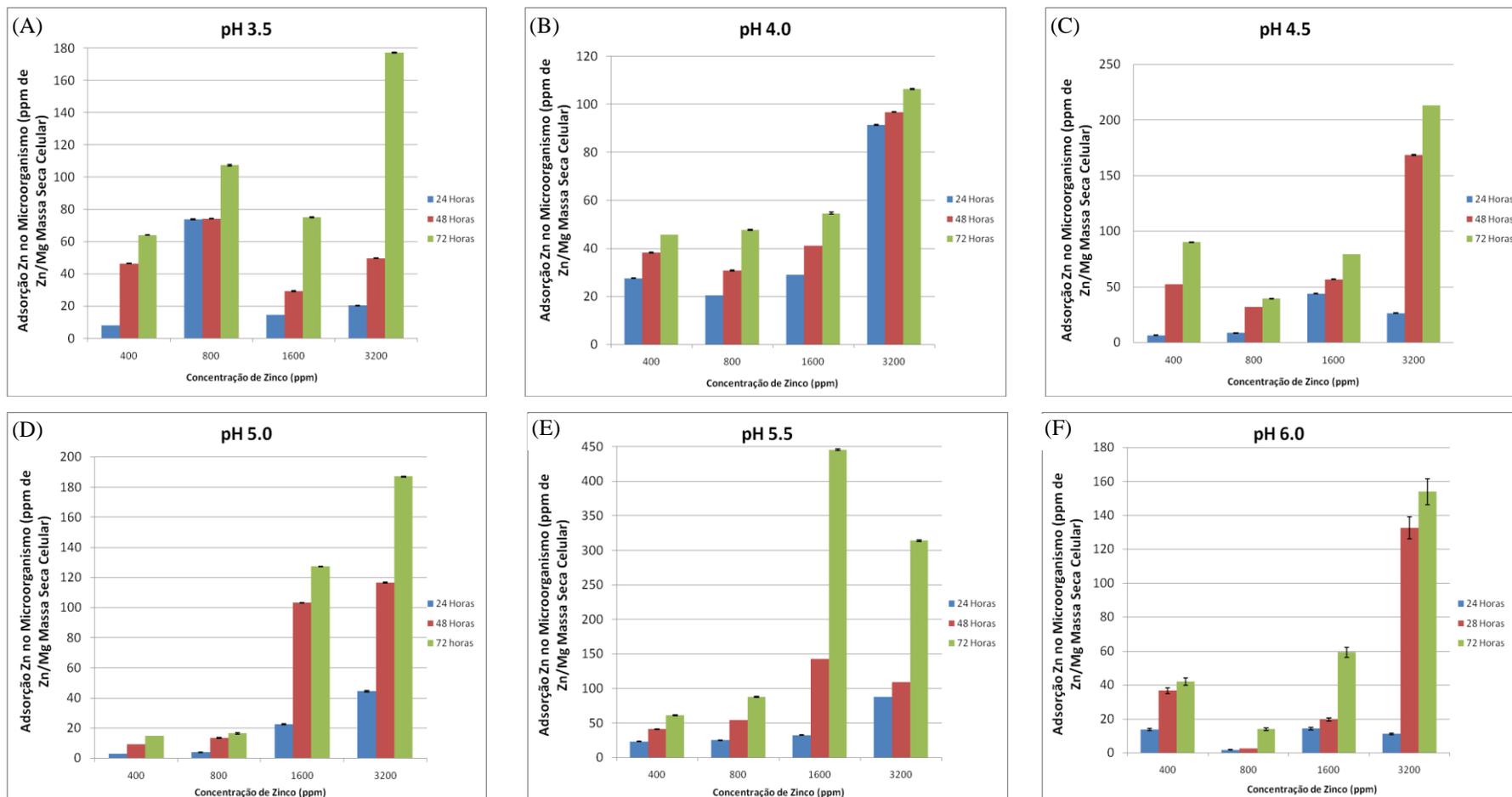


Figura 13: Efeito do pH na adsorção de Zinco pelo isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

5.5.2 Efeito da temperatura no crescimento, na redução de Zn no sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo Isolado D

A limitação do crescimento pela temperatura mais baixa depende da solidificação dos lipídios e da membrana, ou ainda, da sensibilidade ao resfriamento do processo de iniciação da síntese de proteínas. Por outro lado, um pouco acima da temperatura limite, muitas enzimas são desnaturadas e a célula morre (TORTORA *et al.*, 2002). A temperatura exerce efeito nos processos de colonização e reprodução das bactérias e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença (BEDENDO, 1995).

Segundo Lizama *et al.*, (2011), a concentração de metais no meio é um fator determinante para a inibição do metabolismo dos microrganismos. Para que os microrganismos sejam capazes de sobreviver em ambientes com condições diferentes das ideais, muitos possuem mecanismos genéticos que lhes garantem resistência a componentes que podem causar stress. Algumas bactérias possuem genes específicos que possibilitam que essas sobrevivam em ambientes contendo altas concentrações de metais (LIAO *et al.*, 2011).

Após a escolha do pH 5,5, o Isolado D foi cultivado em meio caldo nutritivo complementado com as concentrações 400, 800, 1600 e 3200 ppm de Zinco nas temperaturas de 25; 30; 35; 40 e 45°C, para verificar em na qual obtém-se o melhor crescimento bacteriano. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios.

Na figura 13, observa-se que a maior concentração de massa bacteriana é apresentada na temperatura de 30°C (Fig. 13B) para todas as concentrações de Zinco analisadas, chegando a uma concentração de massa de 3,9 g.L⁻¹ após um período de 72 horas de incubação.

O crescimento do Isolado D nas temperaturas 25°C, 35°C, 40°C e 45°C nas diferentes concentração de zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm) apresentou um crescimento até 48 horas de incubação. O Isolado D na temperatura de 30°C (Figura 13 B) apresentou um período de crescimento que foi observado até 72 horas de incubação. O crescimento de microrganismos em todas as amostras contendo diferentes concentrações de Zinco (400, 800, 1600 e 3200 ppm) demonstra a resistência do isolado D ao elemento tóxico, embora tenha sido observado o efeito inibitório do crescimento nas maiores temperaturas, 40 e 45°C (Figuras 13D e 13E). Pode-se destacar que nas temperaturas 25°C e 35°C (Figuras 13A e 13C) na concentração de 3200 ppm de zinco o crescimento foi menor quando comparados a outras temperaturas (30°C, 40°C e 45°C).

A capacidade de alguns organismos crescerem em condições de com elevadas concentrações de metais pode ser resultado de mecanismos intrínsecos ou induzidos, bem como fatores ambientais (pH, potencial redox, etc) que também podem reduzir a toxicidade a toxicidade desses metais (ZOUBOULIS *et al*, 2004; LEEADJARV *et al*, 2008; XIAO *et al.*, 2010). Sabe-se que os mecanismos de resistência a metais em bactérias são vários, e que esses variam muito pouco entre isolados de ambientes não contaminados para aqueles de ambientes contaminados (BARKAY; SCHAEFER, 2001; MATSUDA *et al.*; 2002; ZOUBOULIS *et al.*, 2004) o que explica a capacidade das Bacteria D analisada neste estudo em resistir altas concentrações de Zinco.

Matsuda *et al* (2002) trabalhando zinco utilizando de diferentes porções de solo contaminado, avaliou a sobrevivência de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, e observou o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* em até 45% (1250, 206, 67,5 e 192,5 mg dm⁻³ de Zn, Cu, Cd e Pb respectivamente) de contaminação. Em outro trabalho, uma estirpe de *Mesorhizobium metallidurans* inoculada em rejeito de mineração com teores de Zn e Cd de 35000 e 16,5 mg Kg⁻¹ respectivamente, manteve um crescimento constante de 10⁴ UFC por grama de solo nos 45 dias de avaliação do experimento (MAHIEU *et al.*, 2001).

Nota-se neste trabalho que não houve muita variação do crescimento bacteriano nas diferentes temperaturas estudadas, sendo a totalidade de massa celular seca próxima quando comparadas entre as concentrações estudadas de Zinco nas diferentes temperaturas.

Ao variar a temperatura e as concentrações de Zinco no meio, verificou-se que não houve muita diferença no crescimento celular nas temperaturas de 25°C e 35°C, assim como nas temperaturas 40°C e 45°C, apresentando um pico de crescimento bacteriano na temperatura de incubação de 30°C. Sob a temperatura de 30°C o maior crescimento foi na concentração de 3200 ppm de Zinco e o menor na concentração de 400 ppm, tendo como resultados 3,900 e 3,333 g.L⁻¹ respectivamente.

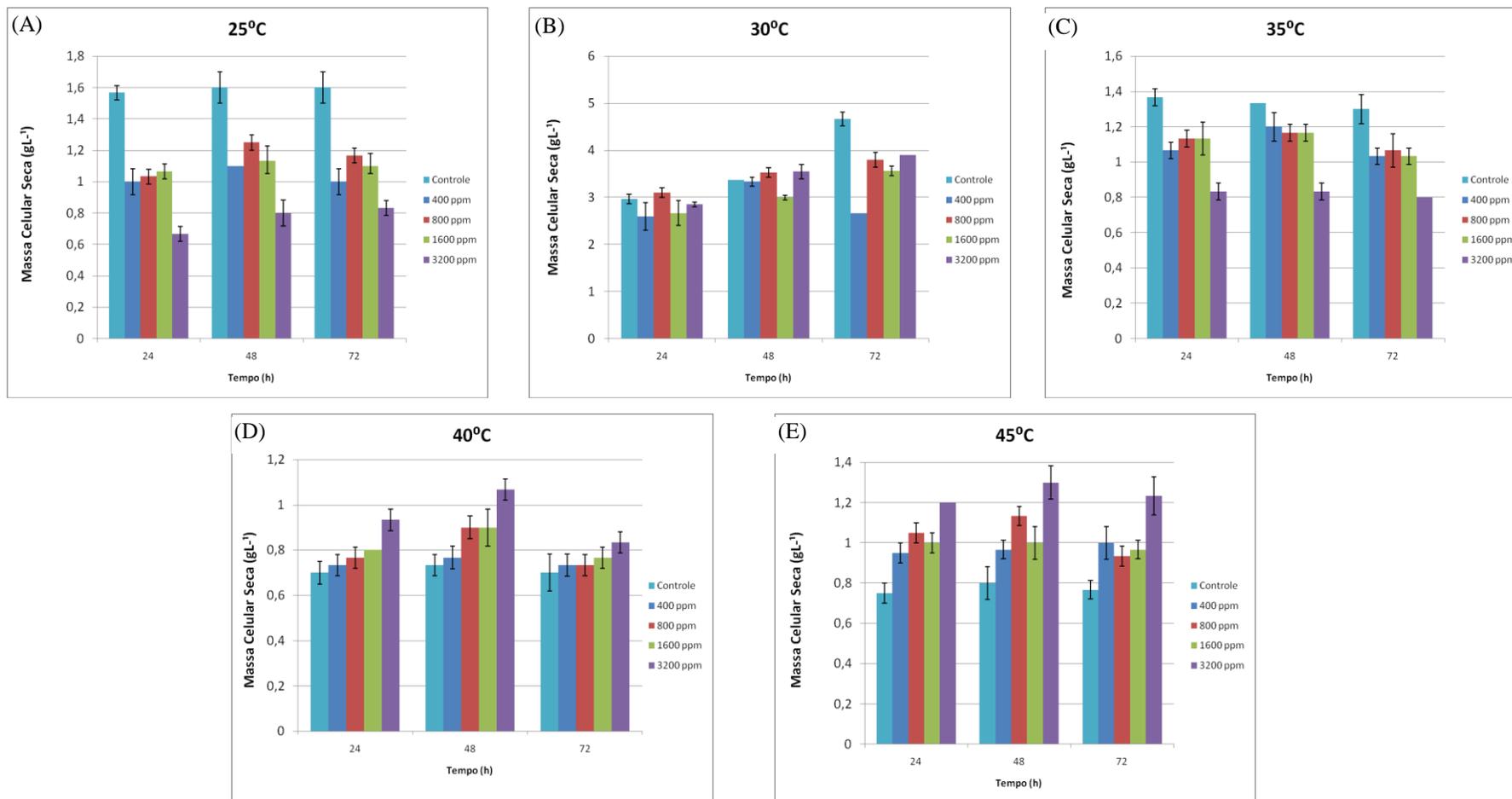


Figura 14: Efeito da temperatura no crescimento do isolado após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm no pH 5.5 em 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médio \pm .

O Isolado quando incubado as temperaturas de 40°C apresentou menor crescimento entre as temperaturas testadas, porém pode-se observar que o crescimento da massa bacteriana parece ter sido estimulado por algum fator na temperatura de 45°C, alcançando a massas de 0,967; 1,133; 1,000; 1,300 para as concentrações de 400; 800; 1600; 3200 ppm de Zinco respectivamente.

O máximo crescimento celular, conforme figura 13, foi observado na temperatura de 30°C (Figura 13B), seguida das temperaturas de 25 e 35°C (Figuras 13A e 13C). Andrezza *et al.* (2010), observaram que o crescimento de *Pseudomonas* sp., se deu entre 20°C e 30°C, porém os autores descrevem o crescimento ótimos para a temperatura de 30°C. Chatterjee *et al.* (2012), observaram a faixa ótima de temperatura para o crescimento de duas bactérias resistentes a chumbo e zinco entre 37°C e 45°C.

Segundo Holt *et al.*, (1994), a maioria das espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae desenvolvem-se bem na temperatura de 37°C, entretanto algumas têm temperatura ótima entre 25°C e 30°C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas, assim como o gênero psicrotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos seres humanos e animais.

Na Figura 14 podemos observar a melhor porcentagem de remoção de Zn do sobrenadante da cultura na temperatura de 30°C (Figura 14A), na concentração de 800 ppm de zinco (71,29%), seguida pelas concentrações de 1600 ppm (68,86%), 3200 ppm (63,62%) e 400 ppm (62,56%).

Quando o Isolado D foi crescido nas temperaturas de 35°C, 40°C e 45°C, observou-se uma redução do teor de Zn no sobrenadante, fato que pode estar relacionado ao crescimento do Isolado D (Figura 13), que teve seu decaimento nas mesmas temperaturas analisadas.

Segundo Mameri *et al.*, (1998), a adsorção de íons metálicos não envolve reações de energia e a remoção dos metais e solução se dá devido aos fenômenos puramente físicos e interações químicas entre a biomassa e os metais em solução. O aumento excessivo da temperatura reduz a capacidade de biossorção da massa. Mameri *et al.*, (1998), observou que 62,3 mg de Cd³⁺ foram adsorvidos e 1g de algas secas na temperatura de equilíbrio de 20°C. quando a temperatura foi elevada acima de 50°C o percentual de remoção diminuiu.

Observou-se que a remoção de Zinco pelo Isolado D não foi muito afetada, quando ocorreu o aumento da temperatura, principalmente nas maiores concentração. Mesmo assim, observa-se um percentual de redução do sobrenadante na temperatura de 45°C (Figura 14E).

Pode-se observar na temperatura de 45°C a adsorção do metal concentrações de 800 ppm (7,60%) e 3200 ppm (5,10%) chegaram a ser maiores do que a ocorreu na temperatura de 40°C (7,03% e 3,65% respectivamente).

Como podemos notar na figura 14, de forma geral, houve uma pequena redução no percentual de redução de Zinco nos valores de 35°C a 45°C (Figuras 14C e 14E), como relatado em diversos artigos. Porém houve um aumento significativo na porcentagem de remoção de zinco quando alterada a temperatura de 25°C para 30°C (Figuras 14A e 14B).

Assim como para Zn a temperatura de 30°C também foi a mais eficiente na remoção de Pb no sobrenadante da cultura.

Aksu e Kutsal (1991) relataram que a captação de chumbo e zinco por *Escherichia coli* incrementou com o aumento da temperatura de 15°C a 35°C. Gadd (2004), relatou que a adsorção de Zn por *Escherichia coli* aumentou com o aumento da temperatura de 20°C para 30°C. O aumento do percentual de remoção neste trabalho foi encontrado nas temperaturas de 25°C para 30°C (Figuras 14A e 14B).

Segundo Véglio e Beolchini (1997), a temperatura de bioadsorção parece afetar apenas a uma menor medida dentro do intervalo de 20°C – 35°C. No entanto, Tsezos e Volesky, (1981); Kuyucak e Volesky, (1989); Aksu e Kutsal (1991) registraram um ligeiro aumento na captação de cátions por algas na faixa de 4°C a 55°C.

Temperaturas mais altas geralmente aumentam a remoção devido ao aumento da atividade de sorção na superfície e energia cinética do soluto (SAG; KUTSAL, 2000), porém danos físicos para o bioadsorventes podem ser esperados em maiores temperaturas.

Devido à natureza exotérmica de alguns processos de adsorção, um aumento de temperatura foi observado como redutor da capacidade de adsorção da biomassa (MAMERI *et al*, 1999)

É sempre desejável a conduta de avaliar a adsorção, pois é visto que a adsorção somente é incrementada dentro de uma determinada faixa de temperatura.

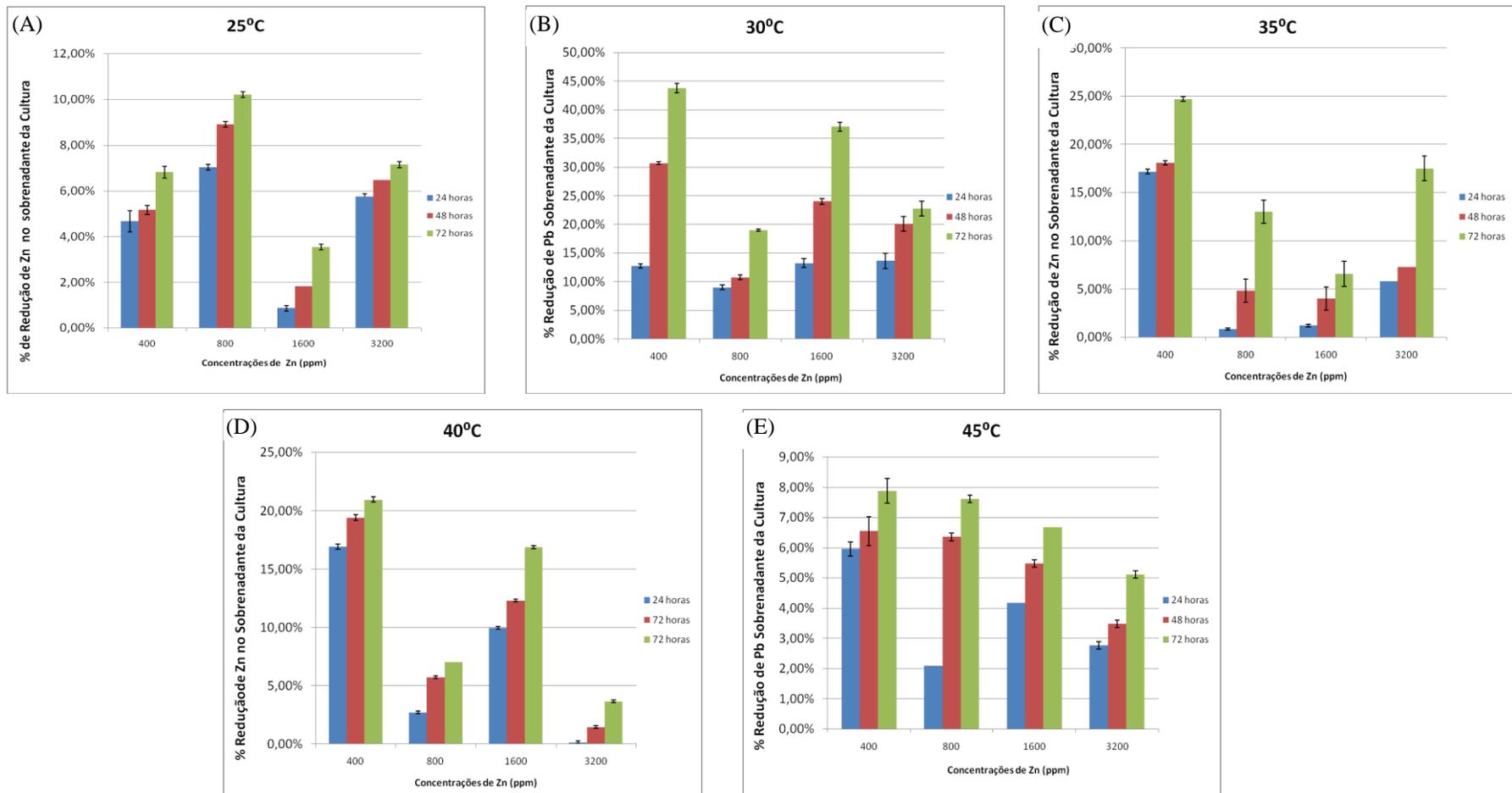


Figura 15: Efeito da temperatura na remoção de Zinco no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutricional complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm, na temperatura de 30°C e 150 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Foi verificado a adsorção de Zn pelo Isolado D nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C. Podemos observar que a maior adsorção ocorreram nas maiores concentrações de Zn. O mesmo foi observado por Huang *et al.*, (1991), quando estudaram a adsorção de Níquel e Zinco por *Aspergillus oryzae*.

A quantidade de Zinco absorvida pelo Isolado D nas temperaturas de 30 e 35°C (Figuras 15B e 15C) foram de 314,032 e 274,975 ppm respectivamente na concentração inicial de 3200 ppm, sendo que para a concentração inicial de 1600 ppm houve uma adsorção de 445,603 ppm na temperatura de 30°C, sendo essa temperatura com a maior capacidade de adsorção de Zinco observada neste estudo.

Segundo Gadd (2004), mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com os metais pesados englobam aqueles independentes e os dependentes do metabolismo celular. Os independentes ocorrem através da interação físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e outros materiais associados à face externa da membrana. Esta independência ocorre pelo fato de não ser necessário o gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja absorção dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas.

Ainda conforme Gadd (2004), o transporte de íons metálicos através da membrana celular e seu acúmulo intracelular são dependentes do metabolismo, ocorrendo somente em células vivas, capazes de gerar energia. A remoção desses íons por esse tipo de mecanismo é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físico-químico. Em contrapartida maiores quantidades de metais podem ser acumuladas, como relatado para as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus metallidurans* e *Bacillus sphaericus* (RAMIREZ *et al.*, 2008; VELASQUEZ; DUSSAN, 2009).

Após 72 horas de incubação em meio caldo nutritivo suplementado com diferentes concentrações de zinco, foi verificado que a menor adsorção de zinco (22,646 ppm) ocorreu para a temperatura 25°C (Figura 15 A) na concentração de 400 ppm, fato este, que pode estar relacionado ao crescimento bacteriano, que também foi pequeno, conseqüentemente disponibilizando menos sítios ativos para a captação de Zinco.

Segundo Kuyucak e Volesky, (1989) e Aksu e Kutsal, (1991), a temperatura não tem sido estudada como variável relevante em experiências de adsorção. Os ensaios são geralmente realizada a cerca de 25°C - 30°C. Apenas muito poucos relatos foram dada no intervalo 4°C - 55°C.

Segundo Horsfall (2004) em estudo com adsorção de Chumbo e Zinco a intensidade de adsorção foi maior nas temperaturas de 30°C e 40°C, indicando que ocorre na dessorção acima 40°C, implicando que a adsorção mais significativa se deu nas temperaturas mais baixas, tornando-se menos significativas temperaturas mais altas. Esses resultados vão de encontro aos resultados observados neste trabalho, onde nas temperaturas mais altas, 35°C, 40°C e 45°C, pode-se observar o decaimento nos valores de adsorção do Zinco.

Ao analisar a Figura 15, pode-se observar a maior adsorção de zinco no Isolado D na temperatura de 30°C nas concentrações de 1600 e 3200 ppm, deve-se destacar que nas temperaturas de 35°C, 40°C e 45°C (99,980; 126,662; 120,508 respectivamente) na concentração inicial de 800 ppm a adsorção foi superior a observada na temperatura de 30°C (87,638).

Podemos observar que a maior parte dos íons de Zinco foram adsorvidos entre as temperaturas de 30°C a 35°C, tendo a adsorção mais baixa na temperatura de 25°C. Horsfall (2004) observou em seu trabalho, que para a adsorção de Zn e Pb, que a maior parte de íons dos metais analisados foram removidos entre as temperaturas de 30°C a 50°C, decaindo conforme aumentava-se a temperatura, assim como ocorreu neste trabalho, tanto para Zn quanto para Pb.

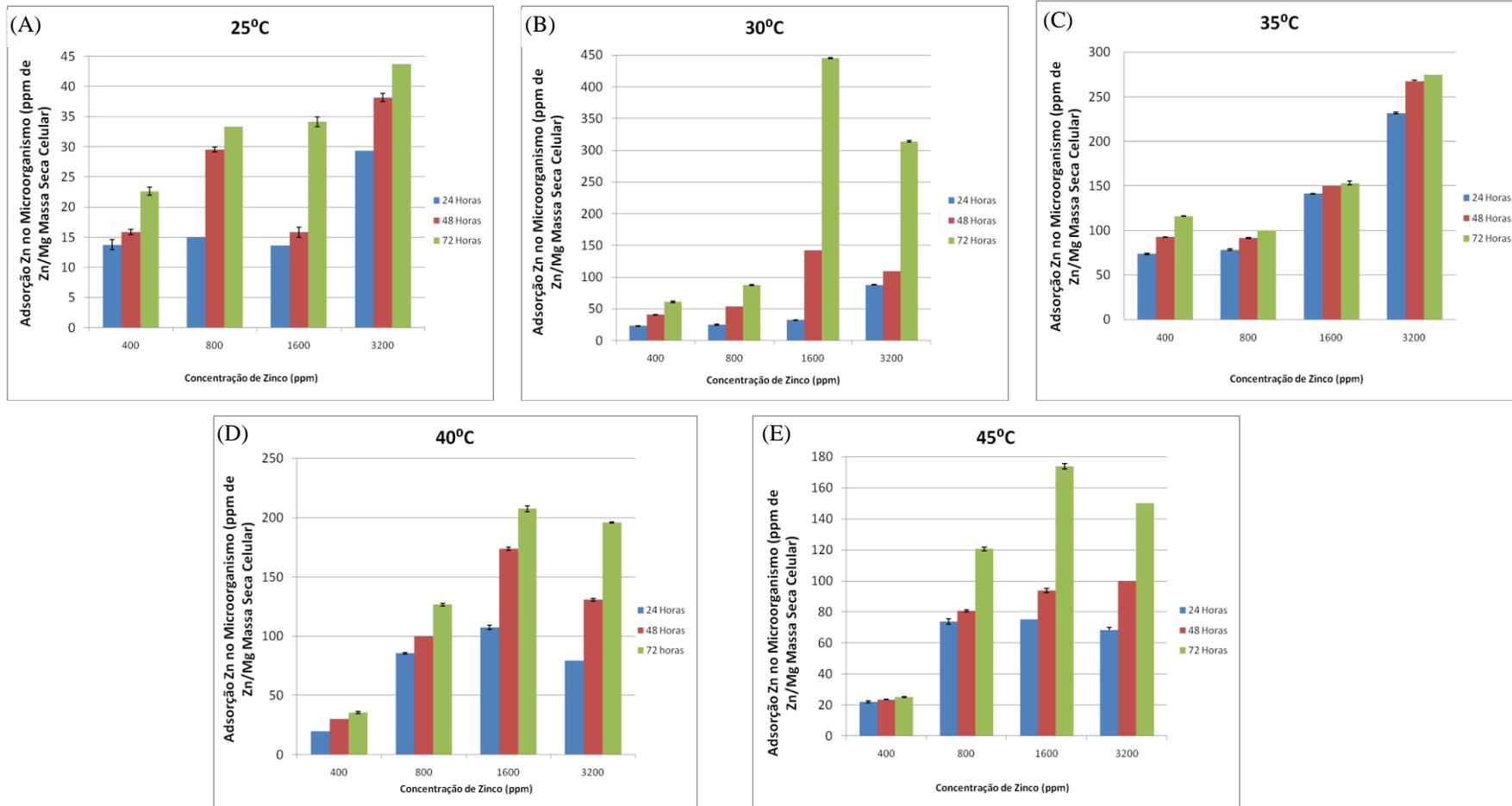


Figura 16: Efeito da temperatura na adsorção de Zinco pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco nas concentrações 0, 400, 800, 1600 e 3200 ppm em 150 rpm no pH 5,5. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

5.5.3 Efeito da fonte de carbono no crescimento, na redução de Zn no sobrenadante da cultura e adsorção de Zn pelo Isolado D

Para analisar o crescimento bacteriano em diferentes fontes de carbono foi utilizado de meio caldo nutriente complementado com 3200 ppm de Zinco, concentração esta, a de maior valor analisada. Como fontes de carbono foram utilizadas a Glicose, Frutose, Sacarose e Lactose, Controle 1 sem a adição de fonte de carbono com Zinco e 0 sem a adição de Zinco e Fonte de Carbono.

De acordo com Lee *et al.*, (2003), a adição de uma fonte de carbono mais acessível pode aumentar a biorremediação *in situ* por estimular o crescimento dos microrganismos capazes de degradar contaminantes. Desta forma, foi avaliado o crescimento do Isolado D em meio com diferentes fontes de carbono.

A Figura 16, apresenta os resultados do crescimento do Isolado D. A concentração das fontes de carbono utilizadas foi 1%, e do zinco de 3200 ppm. O crescimento foi realizado a 30°C, pH 5.5 e 150 rpm.

Observando a Figura 16, nota-se que o isolado D no Controle (Sem Zn e sem fonte de carbono/Figura 16A) apresentou crescimento constante nas 72 horas de incubação. O mesmo resultado se deu para o Isolado D quando o meio foi complementado com Sacarose e Lactose (Figuras 16E e 16F). Para Controle + Zinco (Figura 16B), glicose + Zinco (Figura 16C) e frutose + (Zinco Figura 16D) foi observado que o Isolado D apresentou crescimento 48 horas de incubação.

É possível observar na Figura 16, como já seria esperado, que o crescimento do Isolado D na presença das fontes de carbono é bem mais acentuado do que no meio contendo apenas zinco, uma vez que essas fontes de carbono possam implementar o metabolismo microbiano. Entretanto, no meio complementado com zinco (3200 ppm), o crescimento celular foi reduzido, quando comparado ao meio sem nenhum complemento (controle), provavelmente devido a algum efeito inibitório causado pelo zinco sobre o metabolismo microbiano. Marçano (2004) observou um aumento da fase lag do crescimento celular para *Pseudomonas putida* em meio contendo fonte complementar de carbono, quando foi adicionada determinada concentração de cádmio, confirmando o efeito inibitório desse metal sobre o metabolismo da bactéria.

Após o crescimento no experimento contendo as fontes de carbono e zinco, é possível observar um pequeno crescimento celular, indicando que Isolado D encontra-se adaptado à presença do metal pesados no meio. Díaz-Raviña e Bååth (1996) realizaram experimentos com adição de zinco a solos, e observaram um aumento na tolerância a esse metal após dois dias de exposição, e a variação nas concentrações de zinco adicionadas não afetou significativamente essa tolerância.

Independente da fonte de carbono analisada, o crescimento foi favorecido ao compararmos com o Controle + Zinco 3200 ppm (Figura 16B), uma vez que o Isolado D foi isolado de solo contaminado com zinco, é possível que ele (Isolado D) estivesse adaptado ao crescimento com o metal, o que justificaria tal comportamento no crescimento.

A presença de Zn (3200 ppm) complementado com as fontes de carbono usada nesse experimento, causou uma pequena mudança no crescimento celular em comparação ao controle (Figura 16A), o acúmulo da massa celular seca foi maior nas primeiras 24 horas para o meio complementado com as fontes de carbono, exceto para sacarose (Figura 16E), do que para o Controle, provavelmente devido a um período de adaptação dos microrganismos aos metais em relação. Porém após 48 horas de inoculação, podemos observar que o crescimento do Isolado D no controle já foi maior do que em qualquer outro ensaio. Riis *et al.*, (2002) reportam, em seus experimentos, que o aumento do tempo de crescimento deve-se à adaptação e seleção de processos pela comunidade microbiana.

Segundo Malik (2004), várias bactérias isoladas de efluentes exibiram resistência a condições extremas, como picos de pH ou altas concentrações de metais pesados. Hassen *et al.* (1998) reportam que, a concentrações relativamente baixas, alguns metais como Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} são essenciais ao metabolismo microbiano, uma vez que eles provêm co-fatores vitais para metalo-proteínas e enzimas. Em ambientes poluídos, a resposta de comunidades microbianas a metais pesados depende da concentração e disponibilidade desses metais, e é dependente também de processos complexos, controlados por múltiplos fatores, como tipo de metal, natureza do meio e espécies microbianas. De acordo com Congeevaram *et al.*, (2007), populações microbianas em ambientes poluídos com metais se adaptam às concentrações tóxicas destes, e se tornam resistentes.

Podemos observar na Figura 16, que o crescimento da massa celular seca decresceu na seguinte ordem: Controle > Frutose > Lactose > Glicose > Sacarose > Zinco sem fonte de carbono. Ao compararmos esse resultado para Zinco com o resultado no crescimento do

Isolado D em Chumbo, podemos observar que a Frutose e a Lactose se encontram na mesma colocação quanto ao crescimento no meio complementado com metal fonte de carbono.

Outro dado a ser observado é o efeito inibitório do Zinco sobre o crescimento do isolado D, podemos observar que no controle (Figura 16A) o crescimento de do isolado D foi superior aos demais que continham Zinco, mesmo quando complementados com fonte de carbono. Quando analisamos o crescimento para chumbo observamos que o mesmo acontece para o controle (sem metal e sem fonte de carbono/Figura 7A) e Controle + Pb 300ppm (Figura 7B), Glicose (Figura 7C) e Sacarose (Figura 7E), porém o crescimento do Isolado D na Frutose (Figura 7D) e Lactose (Figura 7F) parecem ter sido estimuladas, sendo superiores ao crescimento do controle (sem metal e sem fonte de carbono). Quando comparamos o crescimento entre Pb e Zn complementados com as fontes de carbono, podemos observar que o Isolado D teve um melhor crescimento em Pb.

Ainda Costa *et al.*, (2007), trabalharam na obtenção de um consórcio microbiano em meio de cultivos bioestimulados com glicose, o qual acelerou a reprodução celular das bactérias, em comparação com o mesmo meio na ausência desta fonte de carbono nas primeiras 24 horas, porém neste estudo podemos observar que a Frutose (Figura 16D) apresentou um maior crescimento nas primeiras 24 horas, até mesmo quando comparada ao controle (sem metal e sem fonte de carbono/Figura 16A). Este mesmo resultado foi verificado para a análise com Pb, onde a frutose (Figura 7D) apresentou um maior crescimento nas 24 horas iniciais, também superior ao o controle (Figura 7A)

Conforme SAMUELOV *et al.*, (1991), o meio de cultivo é importante para o crescimento dos microrganismos. Fatores como pH e temperatura são mencionados como os fatores mais críticos que podem afetar o crescimento microbiano.

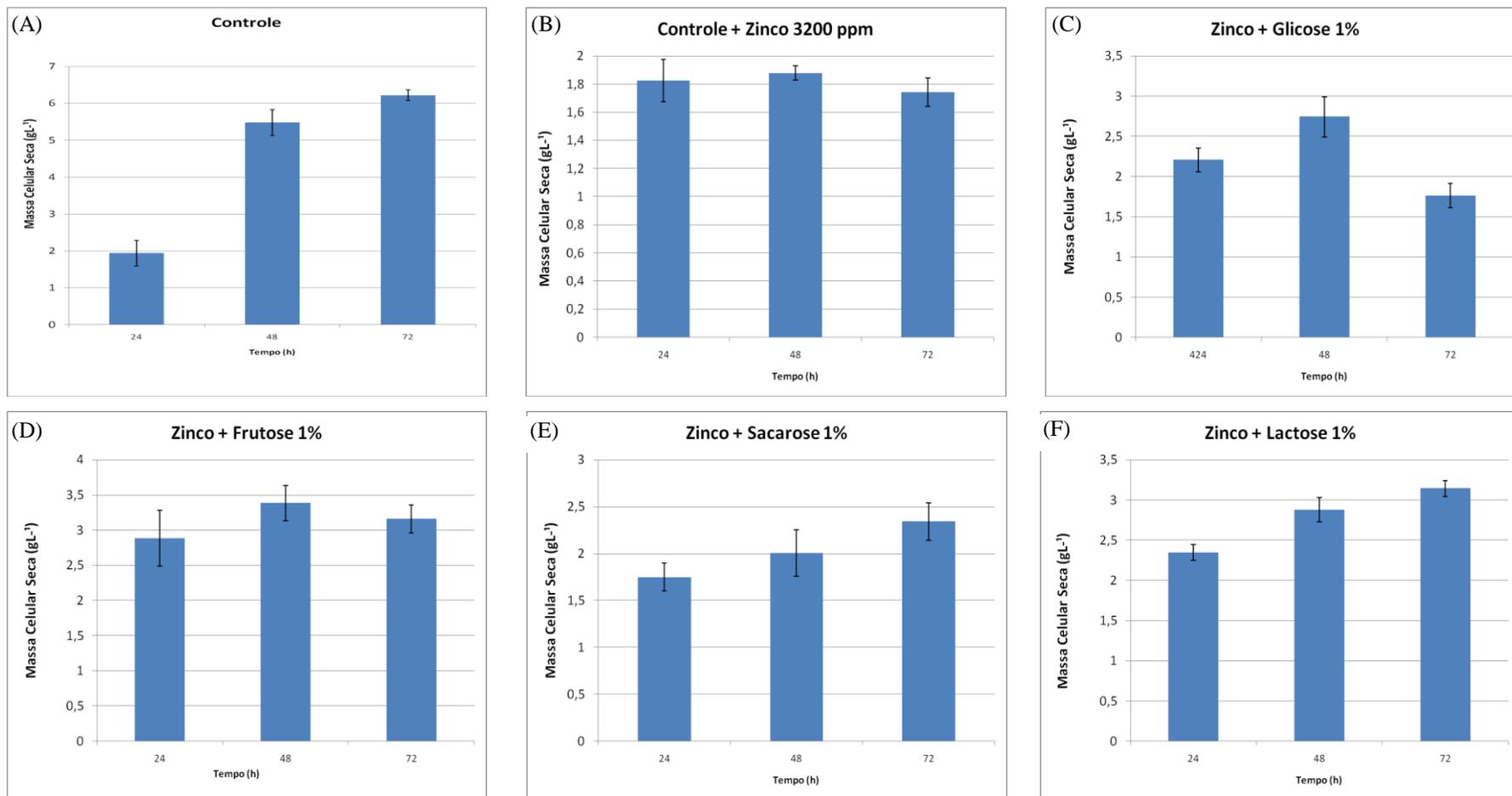


Figura 17: Efeito da fonte de carbono no crescimento do Isolado D após 72 horas de incubação, em meio caldo nutriente complementado com Zinco 3200 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): Controle; (B): 3200 ppm Zinco sem fonte de carbono; (C): Glicose (D): Frutose; (E): Sacarose; (F): Lactose Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Haq *et al.*, (1999) descreveram que três espécies isoladas de efluentes industriais (uma de *Enterobacter cloacae* e duas de *Klebsiella* spp.) mostraram resistência a altas concentrações de Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cr^{3+} , e foram capazes de remover aproximadamente 85 % de zinco do meio complementado com sacarose, porém o percentual de redução Zn no sobrenadante das amostras deste estudo mostrou-se mais eficaz com o complemento Controle + zinco (Figura 17A), tendo uma redução observada de 34,14% após o período de 72 horas, tendo este ensaio também o maior percentual de redução nas primeiras 24 horas de incubação (28,88%), enquanto o meio complementado com sacarose teve o percentual de remoção de 32,73%.

Diferentemente do que aconteceu com as amostras complementadas com chumbo (300 ppm), neste estudo com zinco (3200 ppm) o percentual de redução foi maior para o controle (34,14%) (Figura 17A), seguidas dos meios complementados com glicose, sacarose, frutose e lactose, tendo 32,85%, 32,73%, 30,59% e 29,82% respectivamente.

Outro dado a ser considerado, é que no percentual de redução de zinco no sobrenadante em meio com glicose foi superior as outras fontes de carbono, diferentemente no estudo com chumbo, onde observou-se que o meio com glicose obteve o menor percentual de adsorção de Pb do sobrenadante.

Quando comparamos a maior taxa redução de Zinco no sobrenadante (Figura 17) com o maior taxa de adsorção de Zinco pelo Isolado D (Figura 18), podemos destacar o resultado para o Controle e para a glicose, onde os valores se encontram proporcionais.

Quando analisamos os resultados do crescimento e capacidade percentual de redução do sobrenadante, podemos observar que as fontes de nutrientes disponíveis no meio onde se obtém o maior crescimento de biomassa não produzem necessariamente o melhor resultado em relação à capacidade de adsorção. Esse dado pode ser observado no meio Zinco + frutose (Figura 16D) que teve o melhor crescimento, ou seja, maior concentração de massa celular seca, porém o percentual de remoção de zinco no sobrenadante (Figura 17A), assim como na adsorção pelo Isolado D (Figura 18A), foi para o meio Controle (Zinco sem adição de fontes de carbono).

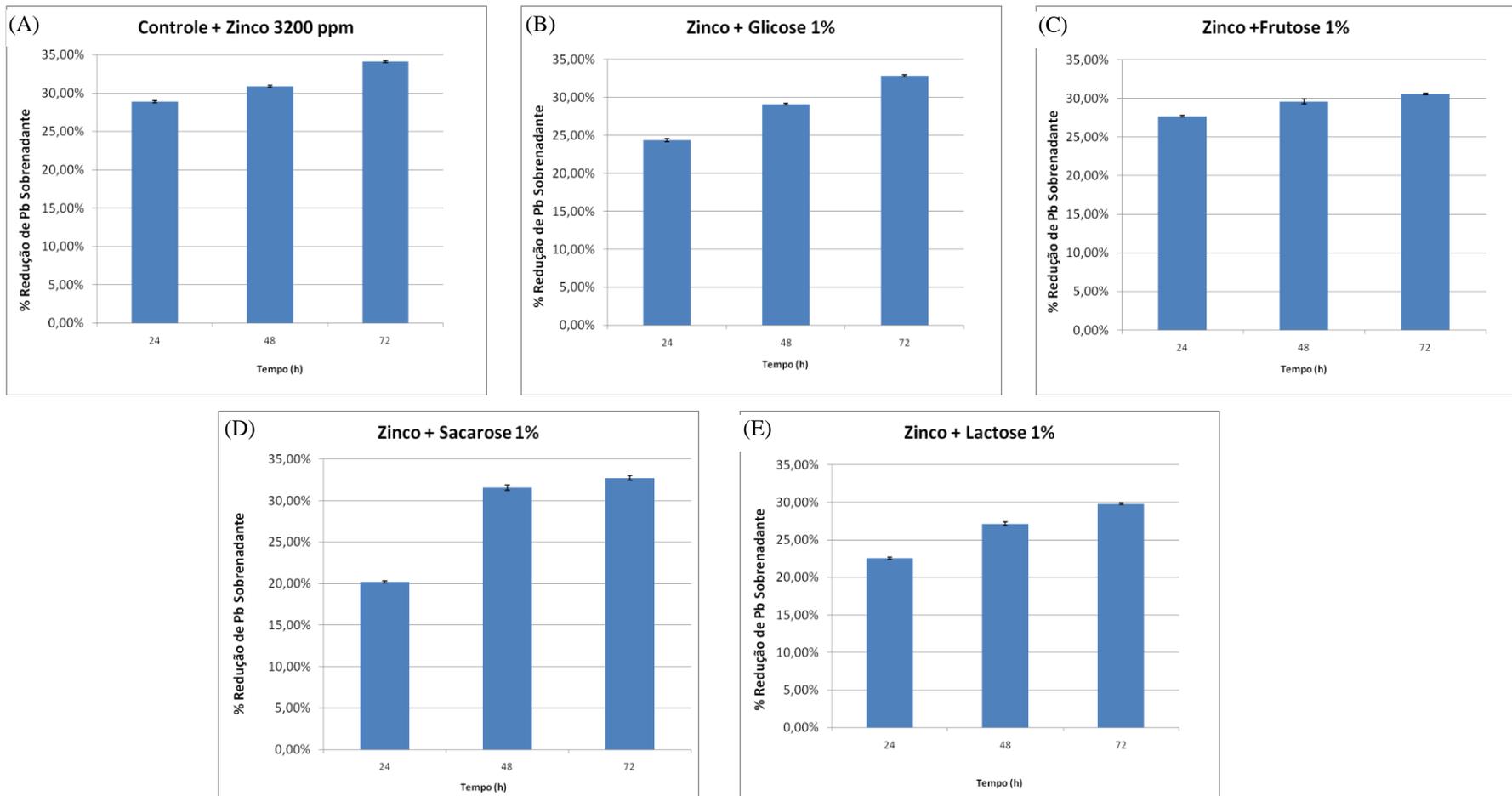


Figura 18: Efeito da fonte de carbono na redução de Zinco no sobrenadante da cultura após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco 3200 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 3200 ppm Zinco sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

Loaëc *et al.*, (1997) estudaram a capacidade de captação de metais por *Alteromonas macleodii* subsp. *Fijiensis* no meio. Para uma concentração igual a 1,0 g/L e concentrações iniciais de chumbo, cádmio e zinco iguais a 50 ppm adicionados de 1% de glicose, eles obtiveram 100 % de eficiência de remoção em todos os metais, diferentemente, neste estudo foi observado que após 72 horas de incubação foi removido aproximadamente 32% de Zinco do sobrenadante no meio complementado com glicose (Figura 17A), para chumbo a redução do percentual do metal no meio complementado com Glicose foi ainda menor que para Zn, apresentando 12,08% de remoção do chumbo (Figura 8B).

Roane e Pepper (2000) reportaram que uma redução significativa de cádmio solúvel foi observado durante o crescimento de *Bacillus* H9 e *Pseudomonas* H1. De acordo com Saxena *et al.* (2001), *Pseudomonas putida* S4, isolada de drenagens minas de cobre, foram capazes de acumular metais de meios de crescimento suplementados com metais, e também de remover Cu^{2+} e Zn^{2+} de efluentes de minas e outros efluentes. Autores reportam que diferentes espécies de *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Sporophyticus*, *Bacillus* e *Phanerochaete* são redutores eficientes de Zn^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} . Para verificar a quantidade de zinco encontrado no isolado D após o período de 72 horas de incubação foi realizada digestão e análise de espectrofotometria atômica da massa seca (pellet) nas amostras com diferentes fontes de carbono. Em seu trabalho, Salehizadeh e Shojaosadati (2003), obtiveram valores de adsorção no microrganismo em torno de 400 mg Zn^{2+} /g, 700 mg Pb^{2+} /g e 400 mg Cu^{2+} /g, usando 0,25 g/L de um polissacarídeo produzido por *Bacillus firmus*, e eficiências de remoção no sobrenadante de 98,3 %, 74,9 % e 61,8 % de chumbo, cobre e zinco, respectivamente.

A maior concentração de zinco na massa celular seca do Isolado D foi encontrada no Controle (Zinco sem adição de fonte de carbono/Figura 18A), com o valor de 202,119 ppm/Mg massa seca, sendo esse resultado condizente com o encontrado a adsorção no sobrenadante, que também foi a maior para o controle (Figura 17A). A mesma observação se dá para a Glicose, que teve o valor de 202,029 ppm de zinco/ mg massa celular seca no Isolado D (Fig. 18B) e a redução no sobrenadante de 32,85% (Figura 17B).

A menor concentração de zinco encontrada no Isolado D foi para o meio complementado com Frutose (81,958 ppm/mg massa seca/ Fig. 18C). Este resultado (Frutose) também foi encontrado ao avaliarmos esse mesmo dado para chumbo (3,401 ppm/mg massa celular seca).

Tanto para o percentual de redução de zinco do sobrenadante quanto para a adsorção de zinco pelo microrganismo, pode-se observar que o Controle (sem complementação de Fontes de Carbono) foi mais eficiente que os meios complementados com a glicose, sacarose, frutose e lactose. Esse dado pode significar que as fontes de carbono utilizadas neste experimento podem inibir a adsorção do metal pelos microrganismos.

Ao analisar o efeito do tempo de inoculação na adsorção de zinco, podemos destacar a adsorção no meio Controle, onde as primeiras 48 horas os valores de adsorção pelo Isolado D foram próximas (24 horas: 120,422 ppm e 48 horas: 131,306 ppm/mg Massa celular seca), tendo um acréscimo elevado nas últimas 24 horas (72 horas: 202,119 ppm/mg Massa celular seca).

Rodrigues *et al.*, (2012), avaliaram a ação de *Aspergillus niger* em tratamento de Zn, Cr, Pb e outros metais. O cultivo foi realizado durante de sete dias em meio complemento com glicose, e após 4 dias de cultivo não foram mais detectados os metais. Neste estudo não foi verificada a adsorção total de Zinco em nenhum meio complementado com as fontes de carbono, mas a adsorção no meio Glicose (Figura 18 B) foi a mais eficiente comparada as outras fontes estudadas.

Em estudos anteriores, Sary (2009) também fez uso de glicose como co-substrato para biorremediação de solo contendo metais e óleo diesel por consórcio microbiano acrescido de *Pleurotus sajor caju*. Foram realizados testes de bioestimulação, bioaugmentação e atenuação natural com presença e ausência de co-substrato. Os resultados apresentaram uma eficiência de mais de 99% de remediação dos metais em presença de co-substrato, enquanto na ausência deste a eficiência não ultrapassou 60% para o mesmo período de cultivo.

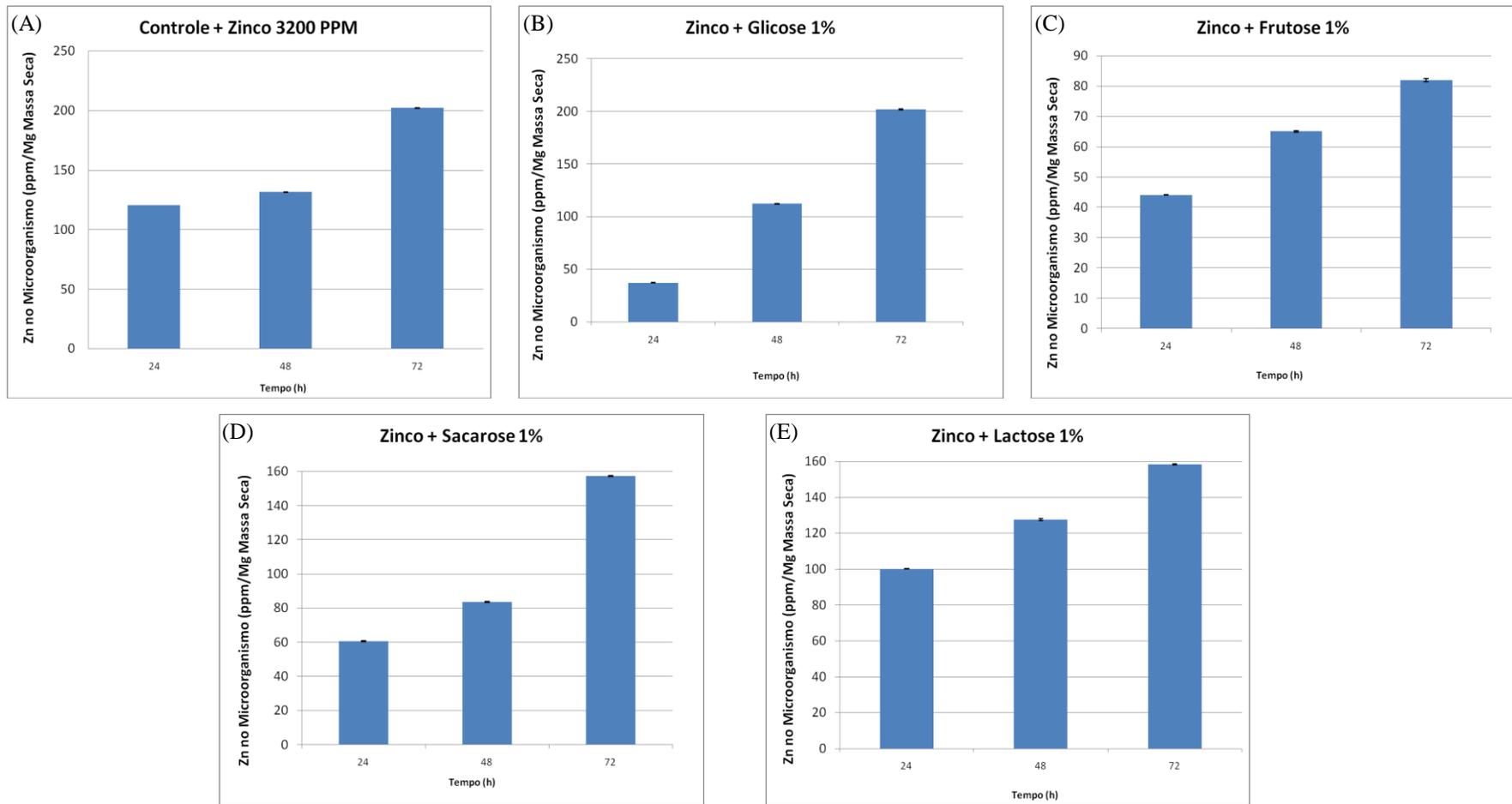


Figura 19: Efeito da fonte de carbono na adsorção de Zinco pelo Isolado D após 72 horas de incubação em meio caldo nutriente complementado de Zinco 3200 ppm na temperatura de 30°C, 150 rpm em pH 5,5. (A): 3200 ppm Zinco sem fonte de carbono; (B): Glicose; (C): Frutose; (D): Sacarose; (E): Lactose. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em valores médios \pm .

6. CONCLUSÃO

O Isolado D, pertencente à Família Enterobactereaceae conforme análise molecular, apresenta eficiência de remoção de Chumbo e Zinco do sobrenadante, mesmo nas concentrações mais elevadas estudadas neste trabalho (300 ppm Pb e 3200 pp Zn), mostrando-se potencialmente eficaz em processos de biorremediação.

Foi possível observar o crescimento do Isolado D utilizando meio Caldo Nutriente em todas as diferentes concentrações de Zn e Pb empregadas neste estudo. Ficou demonstrada a resistência do isolado D ao Zn e Pb com base nos resultados obtidos.

De todos os valores de pH e temperatura analisados os melhores valores para o crescimento do Isolado D, para a remoção de Pb e Zn no sobrenadante, e adsorção ocorreu no pH 5.5 e temperatura de 30°C, podendo-se concluir que a eficiência do Isolado D para a biorremediação de chumbo e zinco, esta diretamente ligada a esses valores de pH e temperatura do meio.

Na remoção de Pb e Zn do sobrenadante obteve-se uma remoção de até 72% de chumbo na concentração 65 ppm e 44% de Zinco na concentração 400 ppm para no pH 5,5.

Foi observado a maior eficiência na adsorção de Zn e Pb pelo Isolado D na pH 5.5 e temperatura 30°C, obtendo-se a adsorção de até 32 ppm de Pb/mg massa celular seca na concentração inicial de 300 ppm de Pb e 449 ppm Zn/mg massa celular seca na concentração inicial de 3200 ppm de Zinco . Para as análises das fontes de carbono verificou-se para Pb que o maior crescimento do Isolado foi no meio complementado com frutose, porém na remoção do sobrenadante e na adsorção de Pb pelo Isolado a maior eficiência foi para o meio complementado com sacarose.

Nas análises das fontes de carbono com Zn, assim como para Pb, observamos o maior crescimento no meio complementado com frutose, porém na remoção de Zn do sobrenadante e da adsorção de Zn pelo Isolado D, foi observado a maior eficiência para o meio complementado glicose.

De maneira geral, essa pesquisa mostrou que apesar de muitos estudos referentes à biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados, ainda se faz necessário estudos mais elaborados relacionados à seleção de bactérias tolerantes a

Chumbo e Zinco, visando à otimização dos processos de tratamento de solos contaminados com esses metais.

Conclui-se com os resultados obtidos neste trabalho o Isolado D mostrou-se eficiente para futuros processo de biorremediação de Zn e Pb, porém são necessárias novas análises para a identificação deste Isolado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; ANDRADE, J. C. *Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando a solução de DTPA em pH7,3*. In: RAIJ B. van et al. (Ed.). *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agronomico, 2001, p. 240 – 250.

AGUILAR USCANGA, B.; FRANÇOIS, J. M. *A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 268 - 274, 2003.

AGUSTIONO, T, KURNIAWAN, GILBERT Y.S. CHAN, WAI-HUNG , BABEL, *Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals* *Chemical Engineering Journal* (2006) pp 83–98.

AKSU, Z. e KUTSAL, T. A. *Um processo para a remoção de bioseparação (II) dos íons Pb de águas residuais utilizando C. vulgaris*. *Jornal Tecnologia Química e Biotecnologia* , 1991, vol. 52, no. 1 p.108-118.

ALLEONI L. R. F., CAMARGO O. A. 1995. *Solos ácidos: atributos e manejo*. *B. inf. Soc. Bras. Ci. Solo*, 20:9-17.

ARTAXO, P. et al. *Large scale mercury and trace elements measurements in the Amazon basin*. *Atmospheric Environment*, Oxford, v. 34, n. 24, p. 4085-4096, 2000.

ATLAS, R. M. *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. *Microbiology*, v. 45, p. 180-209, 1981.

AZEVEDO, F. A.; MELLO, A. A. M. *Metais: gerenciamento e toxicidade*. São Paulo: Atheneu, 2008. 554 p.

BAE, J. T. et al. *Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of Paecilomyces japonica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, p. 522-524, 2001.

BAIG, S.; LIECHTI, P. A. *Ozone treatment for biorefractory COD removal*. *Water Science and Technology*, v. 43, p. 197-204, 2001

BAMFORTH, S. SINGLETON, I. *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, London, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BANERJEE, A. and NAYAK, D. *Biosorption of no-carrier-added radionuclides by calcium alginate beads using “tracer pocket” technique*. *Bioresource Technology*, v. 98 p. 2771-1774, 2007.

BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. *Nutrição*. In: BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. (Eds). *Microbiologia básica*. São Paulo: Atheneu, 1998. p.89-101.

- BARKAT, T.; SCHAEFER, J. *Metal and radionuclide bioremediation: issue, considerations and potentials*. Current Opinion in Biotechnology, London, v. 4, n. 3, p. 318-323, 2001.
- BARRETO, M. L. *Mineração e desenvolvimento sustentável, desafios para o Brasil*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001. 215 p.
- BEDENDO, I. P. *Ambiente e doença*. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.331-341
- BENGUELLA, B., BENAÏSSA, H. *Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies*. Water Res. 36 (10), 2463–2474. 2002.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. E MACHADO, B. C. X. *Sideróforos: “uma resposta dos microrganismos”*. Quim. Nova, vol. 25, nº 6b, 1155-1164. 2002.
- BEVERIDGE, T.J. *Role of cellular design in bacteria-metal accumulation and mineralization*. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.43, p.147-171, 1989.
- BEVERIDGE, T.J., MURRAY, R.G.E. *Uptake and retention of metals by cell walls of Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, New York, v.127, n.3, p.1508-1518, 1976.
- BIONDO, R. *Engenharias genética de Cupriavidus metallidurans CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados*. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia EP / FMVZ / IPT / IB/ ICB. Butantan da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, 2008.
- BISINOTI, M. C. YABE, M. J. S. GIMENEZ, S. M. N. *Avaliação da influencia de metais pesados no sistema aquatico da bacia hidrografica da cidade de Londrina, PR*. Revista Analytica. Rio de Janeiro, v. B, n 28. p. 22-27, jan. 2004.
- BOECHAT . C. L. *Biorremediação de solos contaminados por metais pesados em áreas de beneficiamento de minério de ouro*. Tese de doutorado 2014 UFRS Porto Alegre.
- BORREMANS, B., HOBMAN, J. L., PROVOOST, A., BROWN, N. L. & VAN DER LELIE, D. *Cloning and functional analysis of the pbr Lead resistance determinant of Ralstonia metallidurans CH34*. J Bacteriol 183, 5651–5658.
- BRITO, L. F. F. *Estudo de gases em aterros de resíduos sólidos urbanos*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- BROADLEY MR, WHITE PJ, HAMMOND JP, ZELKO I, LUX A (2007) *Zinc in plants*. New Phytologist 173: 677-702

BRUINS, M.; KAPIL, S. E. OEHME, F. *Microbial resistance to metal in the environment*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 45, n. 3, p. 198-207. 2000.

CAMARGO, F. A. O. et al. *Uso de microrganismos para remediação de metais*. Tópicos em Ciências do Solo, Viçosa, v. 5, p. 468-496, 2007.

CAMERON, R. E. *Guide to site and soil description for hazardous waste site characterization*. Washington: Metals, Environmental Protection Agency, 288 p, 1992.

CAO X. MA L.Q., CHEN M, SINGH S.P., HARRIS H.G. *Impacts of phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminated site*. Environ. Sci. Technol., 36:5296–5304. 2002.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAL, S. M.; NEVES, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. 360 p.

CARRASCO, J. A. et al. *Isolation and a characterization of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollaspyrete mine*. Soil Biology na Biochemistry, Elmsford, v. 37, n. 6, p. 1131-1140, June 2005.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. *Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, maio/ago. 1990.

CHATTERJEE, A.; LALITAGAURI, R. *Biosorption of Cu(II) by immobilized biomass of Bacillus cereus from aqueous solution..* Journal of Scientific and Industrial Research (JSIR), v.67, p. 629-634, 2008.

CHAVES, E. V. *Absorção de metais pesados de solos contaminados do aterro sanitário e pólo industrial de Manaus pelas espécies de plantas Senna multijuga, Schizolobium amazonicum e Caesalpinia echinata*. (Tese de Doutorado)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 2008.

CHEN S.B., ZHU Y.G., MA Y.B. 2007. *The effect of grain size of rock phosphate amendment on metal immobilization in contaminated soils*. J. Hazard. Mater.,134:74–79. 2007.

CHENG, Y., YAN, F.; HUANG, F.; CHU, W.; PAN, D.; CHEN, Z.; ZHENG, J.; YU, M.; LIN, Z.; WU, Z. *Bioremediation of Cr (IV) and Immobilization as Cr (III) by Ochrobactrum anthropi*. Environ. Sci. Technology, n. 44, p. 6357-6363, 2010.

CHEW, I.; OBBARD, J. P.; STANFORTH, R. R. *Microbial cellulose decompositions in soil from a rifle range contaminated with heavy metals*. Environmental Pollution, Barking, v. 111, n. 3, p. 367-375, Feb. 2001.

CLARKE, H. T. and KIRNER, W. R. "*Methyl Red*", *Org. Synth.*; 1941, *Coll. Vol. 1*: 374

CLARISSE, M.D.; AMORIM, M.C.V.; LUCAS, E.F. *Despoluição ambiental: uso de polímeros na remoção de metais pesados*. *Revista de Química Industrial*, v. 67, n. 715, p. 16-24, 1999.

CLEMENS R., CARITAT P. *Chemical elements in the environment: factsheets for the geochemist and environmental scientist*. Nova Iorque: Springer. p. 249-251. 1998.

COELHO, M. F. *Estudo do uso de fertilizante NPK imobilizado na Biorremediação de derrames de petróleo no mar Simulação em laboratório*. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo) – Macaé/RJ, Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 36p, 2005.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. *Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.32, n.3, p.809-813, maio-junho, 2008.

COLLINS C. H. *Métodos Microbiológicos*. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha. 238p. 1969.

COLLINS, Y.E., STOTZKY, G. *Heavy metal alter the electrokinetic properties of bacteria, yeast and clay minerals*. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.58, n.5, p.1592-1600, 1992.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. 2009 Variáveis de qualidade das águas. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 15 de Junho de 2015.

CONCEIÇÃO, D.; JACQUES, R.; BENTO, F.; SIMONETTI, A.; SELBACH, P.; CAMARGO, F. *Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.6. p.1661-1667, nov-dez., 2007.

CORONA-GONZALEZ, R. I., BORIES A., GONZALEZ-ALVAREZ, V., PELAYO-ORTIZ, C., 2008. *Kinetic study of succinic acid production by Actinobacillus succinogenes ZT-130*. *Process Biochem*; 43:1047–53.

CORUMBATAÍ NEWS. *Projeto Corumbataí Cerâmicas*. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 4f, 1999^a.

COSSICH, E. S. *Biossorção de Cromo (III) pela biomassa da alga marinha Sargassum sp.* Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

COSTA, A. C. A.; DUTRA, F. P. *Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by Bacillus cereus, Bacillus sphaericus and Bacillus subtilis*. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 1-5, Marc. 2001.

COSTA, A. F. S.; SILVA, J. R. R.; SANTOS, R. C. M. M.; FARIAS, C. B.; SARRUBO, L. A.; JORDÃO, R. C. C.; SALGUEIRO, A. A. *Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo*. Revista Ciência e Tecnologia. n.º 1, 2007.

DAVIS, G.H. *The classification of lactobacilli from the human mouth*. J. General Microb.,13:481-493. 1955.

DIELS, L. AND MERGEAY, M. *DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals*. Appl Environ Microbiol 56:454–456. 1990.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. *Bioaccumulation of Cooper (II) and Nickel (II) by the non-adapted and adapted growing Candida sp*. Water Research, v. 35, p.1425 – 1434, 2001.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. *The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts*. Process Biochemistry, Watford, v.35, p.135–142, 1999.

ELLIS, R. J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. *Cultivation dependant and independent approached for determining bacterial diversity in heavy metal contaminated soil*. Applied Environmental Microbiology. v. 69, p. 3223- 3230, 2003.

EVANS, J.R; DAVIDS, W.G.; MACRAE, J.D.; AMIRBAHMAN, A. *Kinetics of cadmium uptake by chitosan-based crab shells*. Water Research, v. 36, n.13, p. 3219-3226, 2002.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. *Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide*. International Endodontic Journal, v.35, p.221-228, 2002.

EWAN KB, PAMPHLETT R. *Increased inorganic mercury in spinal motor neurons following chelating agents*. Neurotoxicology; 17: 343– 9, 1996.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products*. Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties, v.25, p.541-554, 2006.

FÖRSTNER, U.; CALMANO, W. *Characterisation of dredged materials*. Water Science and Technology, v. 38, n. 11, p. 149-157, 1998.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; TAKAKI, G. M. C. *Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from Cunnighamella elegans (IFM 46109)*. Brazilian Journal of Microbiology. v. 35, p. 243-247, 2004.

FRAZIER & WESTHOFF. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In: MURRAY, R.P. et al. Manual of Clinical Microbiology, 6. ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 446-447, 1993.

GADD GM. *Accumulation of metal by microorganisms and algae*. In: Rehm H, editor. Biotechnology: a complete treatise, vol. 6B, special microbial processes vol. 4. Verlagsgesellschaft, Weinheim: VCH. p. 401– 30, 1992b.

GADD, G. M. *Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization*. Current Opinion in Biotechnology. London, v. 11, n. 3, p. 271-279, June 2004.

GAST, R. K. *Salmonella infections*. In. CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. (Ed.). Diseases of poultry. 11th ed. Ames: Iowa University Press, cap. 16, p.567-613, 2003.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. *Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. n.34, p.36-43, janeiro-junho, 2005.

GLUETTLER M. V.; RUMLER, D & JAIN M. K. *Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic acid producing strain from the bovine rumen*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 207-216.

GÖKSUNGUR, Y.; ÜREN, S.; GÜVENÇ, U. *Biosorption of copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass*. Turk. J. Biol., 27 (1), 23-29, 2003.

GONG, R.; DING, Y.; LIU, H.; CHEN, Q.; LIU, Z. *Lead biosorption and desorption by intact and pretreated spirulina maxima biomass*. Chemosphere, v.58, p. 125-130 , 2005.

GONZALES, T. A.; UBEDA, B. T., SANTOS, L. O.; MONTE ALEGRE, R. *Produção de ácido succínico: uso da ferramenta de planejamento experimental fatorial para otimização do processo*. XVII Congresso nacional de engenharia química. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química , 2008.

GRIMONT, F., e GRIMONT, P.A.D., *The Genus Enterobacter*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. e STACKEBRANDT, E. (Editores). The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3a. ed. New York, NY: Springer Science business Media, Llc; v. 6, p. 197-214, 2006.

GUNTHER, W. M. R. *Poluição dos solos*. In: PHILIPPI JÚNIOR, A.; PELICIONI, M. C. (Org.). *Educação ambiental e sustentabilidade*. São Paulo: Manole, p. 195-215. 2005.

GUPTA R. A.; TAN J.; KRAUSE W. F.; GERACI M. W.; WILLSON T. M.; DEY S. K.; DUBOIS R. N. *Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-*

activated receptor δ in colorectal cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. p. 97:13275–13280, 2000.

HAJNA, A. A. *Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria*. J. Bacteriol. 49:516-517, 1945.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. *Effects of heavy metals on Pseudomonas aeruginosa and Bacillus thuringiensis*. Bioresource Technology, n. 68, p. 73-82, 1998.

HEBERT, Jr.; R. B. *MiMi – sulfide oxidation in mine waste deposits: a review with emphasis on dysoxic weathering*. Stockholm: department of Geology and Geochemistry, Stockholm University, 1999.

HOGAN, M.E.; SWIFT, I.E.; DONE, J. *Urease assay and ammonia release from leaf tissues*. Phytochemistry, 22, 663-667, 1983.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATHM, P. H. A.; STALEY, J. T. and WILLIAMS, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn. Baltimore, D: Williams and Williams. 1994.

HU, T. L. *Sorption of reactive dyes by Aeromonas biomass*. Water Science Technology, v. 26, p. 357-366, 1992.

HUANG, W.; C. ZHU, et al.. *"The interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF8) represses PTPN13 gene transcription in differentiating myeloid cells."* Journal of Biological Chemistry 283 (12): 7921-7935. 2000.

HUGHES, M. N. e POOLE, R. K. (1989). *Metals and microorganisms*. Chapman and Hall Ltd., Londres. 1989.

JALALI, R.; GHAFOURIAN, H.; ASEF, Y.; DAVARPANAH, S.J.; SEPEHR, S. *Removal and recovery of lead using nonliving biomass of marine algae*. J. Hazard. Mater., B92, p. 253-262, 2002.

JAYARAM K.; PRASAD M. N. V. *Rapid in vitro multiplication of Drosera burmanii Vahl. vulnerable medicinally important insectivorous plant*. Indian Journal of Biotechnology 7: 260-265. ISSN: 0972-5849; Impact Factor: 0.477. 2008.

JORDÃO, C. P. et al. *Adsorção de Cu^{2+} em latossolo vermelho-amarelo humico*. Quimica Nova, São Paulo, v. 23, n. 1 p. 5-11, jan. 2001.

JORDÃO, C.P.; BRUNE, W.; SIQUEIRA, M.O.; PEREIRA, J.L.; CECON, P.R. *Heavy metal concentrations in soils and river sediments from an industrial area in Brazil*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 71, n. 3-I, p. 361-369, 1999.

LARPENT, J. P.; GOURGAUD, M. L. *Microbiologia Prática*. São Paulo. Ed. da Universidade de São Paulo, 1975.

LESTER, J. N. *Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes*. Flórida: CRC Press. 195 p. 1987.

LINDSTROM, J. E.; PRINCE, R. C.; CLARK, R. C.; GROSSMAN, J. C.; YEAGER, T. R.; BRADDOCK, J. F.; BROWN, E. J. *Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill*. Appl. Env. Micro, v. 57, p. 2514-2522, 1991.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. 3nd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 413 p.

KADUKOVA, J.; VIRCIKOVA, E. *Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption*. Environment International, v. 31, p. 227-232, 2005.

KHATTRI S, SINGH M. *Colour removal from synthetic dye wastewater using a bioadsorbent*. Water, Air, and Soil Pollution. 2000; (120 Pt 3-4): p.283-294.

KIM, S.U.; CHEONG, Y. H.; SEO, D. C.; HUR, J. S. HEO, J. S.; CHO, J. S. *Characterization of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (Bacillus ssp)*. Water Science and Technology, v.55, p.105-111, 2007.

KIRAN, I. et al. *Biosorption of Pb(II) and Cu(II) from aqueous solutions by pretreated biomass of Neurospora crassa*. Process Biochem. v. 40, p. 3550-3558, 2005.

KORNGOLD, N.; BELAYEV, L.; ARONOV, *Removal of chromates from drinking water by anion exchangers*. Sep. Purif. Technol. 33 (2) (2003) 179–187. Eng. 127 (3) (2001) pp 196–202.(2002).

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. *Microbial genetic resources and biodescovery*. London: WFCC, 2004. 400P.

KUYUCAK, N. e VOLESKY, B. *Acumulação de cobalto por alga marinha*. Biotecnologia e Bioengenharia , vol. 33, n. 7, p. 809-814. 1988.

LEE, P. C., LEE, W. G., LEE, S. Y., CHANG, H. N.,. *Effects of medium components on the growth of Anaerobiospirillum succinici producens and succinic acid production*. Proc. Biochem. v. 35, p. 49-55. 1999a.

LEMOS, J. L. S. et al. *Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados – Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 65p.*

LEONEL, L.V. et al. *Biorremediação do solo*. Revista Terra e Cultura. n° 51 - ano 26 - Julho a Dezembro de 2010.

LEVINSON, H. S. and MAHLER, I. *Phosphatase activity and lead resistance in Citrobacter freundii and Staphylo-coccus aureus*.EMS Microbiol Lett 61: 135–138. 1998.

LEVINSON, H. S.; MAHLER, I.; BLACKWELDER, P.; AND HOOD, T. *Lead resistance and sensitivity in Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 145: 421–425, 1996.

LI, X.,; CHEN B.; FENG G.; CHRISTIE P. *Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of Zn phytotoxicity and mineral nutrition of host plants*. In 17th WCSS, Thailand. 2002.

LIAO et al. (2009). *High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies*. J. Virol. Methods. 158:171–179. doi:10.1016/j.jviromet. Feb. 2009.

LLOYD, J. J. *Microbial reduction of metals and radionuclides*. FEMS Microbiology Reviews, Blackwell, v. 27, n. 2/3, p. 411-425, June 2003.

LO, W.; NG, L. M.; CHUA, H.; YU, P. H. F.; SIN, S. N.; WONG, K. *Biosorption and desorption of copper (II) ions by Bacillus sp.* Applied Biochemistry and Biotechnology, v.107, p.581-591, 2003.

LOWER, S. K.; HOCELLA JÚNIOR, M.F.; BEVERIDGE, T. J. *Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between Shewanella and FeOOH*. Science, New York, v. 292, n. 5520, p. 1360-1363, May 2001.

LU, W. B.; WANG, C. H.; CHANG, J. S. *Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance*. Journal of Hazardous Materials, v. 134, p. 80-86, 2006.

LUO, F.; LIU, Y.,; LI, X.; XUAN, Z.; MA, J. *Biosorption of lead ion by chemically modified biomass of marine brown algae Laminaria japonica*. Chemosphere, v.64, p.1122-1127, 2006.

MAMERI, N.; YEDDOU, A.R.,; LOUNICI, H.,; BELHOCINE, D.,; GRIB, H. & BARIOU, B. *Defluoridation of septentrional Sahara water of north Africa by electrocoagulation process using bipolar aluminium electrodes*. Water Res. 32(5), 1604–1612. 1998.

MARDER, A. M.; BERNARDES, J. Z. *Cadmium electroplating wastewater treatment using a laboratory-scale electrodialysis system*. Sep. Purif. Technol. pp 247–255. 2003.

MARENCO R. A.; LOPES N. F. *Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. UFV, p.267-297. 2009.

MARKERT, B. *Presence and significance of naturally occurring chemical elements of periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems*. Vegetatio, v. 103, p. 1-30, 1992.

- MARSHALL, M. J. et al. *C-type cytochrome-dependent formation of U (IV) nanoparticles by Shewanella oneidensis*. Plos Biology, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1324-1333, Aug. 2006.
- MARTINS, R. J. E. *Acumulação e liberação de metais pesados por Briofitas aquáticas*. (Dissertação de Mestrado) Universidade do Porto: Faculdade de Engenharia, 2004.
- MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. *Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 16, p. 415-421, 2000.
- MATOS, R. Q.; FERREIRA, O. M. “*Recuperação de chumbo de bactérias automotivas, análise de risco dos resíduos resultantes*”. Universidade Católica de Goiás, 2007.
- MATSCHULLAT, J. et al. *Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil*. Applied Geochemistry, Oxford, v. 15, n. 2, p. 181-191, Feb. 2000.
- MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. *Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.37, p.343-355, 2002.
- MATTUSCHKA, B. and STRAUBE, G. (1993). *Biosorption of Metals by a Waste Biomass*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 58, 57-63. 1993.
- MOBERLY J.G., STAVEN A.; SANI R.K. and PEYTON B.M. *Influence of pH and inorganic phosphate on toxicity of zinc to Arthrobacter sp. isolated from heavy – metal contaminated sediments*. Environ Sci Technol, 44, 7302 - 7308. 2010.
- MOORE J. W. *Inorganic contaminants of surface water residuals and monitoring priorities*. New York: Springer-Verlag; 1990. p. 178– 210.
- MOORE, J.W., RAMAMOORTHY, S. *Heavy metals in natural waters*. New York: Springer-Verlag, 328p., 1984.
- MOREIRA F. R., MOREIRA J. C. 2004. *Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde*. Rev. Panam. Salud Publica., 15:119–29.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Xenobióticos do solo*. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Cap. 6. p. 263-311, 2006.
- MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFPA, 2002. 623 p.
- MORTON, L. *Environmental toxicants: human exposures and their health effect*. 2. ed 1999. 987 p.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. *Natural Attenuation of contaminated soil*. Environmental International, Oxford, v. 30, n.4, p. 587-601, Apr. 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 4^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 776p.

MURRAY, P. R. et al. (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington D.C.: ASM, 2007.

NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. A.; BIONDI, C. M. *Fitoextração de metais pesados em solos contaminados: avanço e perspectivas*. In: RIBEIRO, M. R. et al (Ed.). Tópicos em ciências do solo. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. P. 461-497.

NEDER, R. N. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo: Ed. Nobel, 1992. 138 p.

NGHIEM, N. P.; DAVISON, B. H.; SUTTLE, B. E.; RICHARDSON, G. R. *Production of succinic acid by Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Appl. Biochem. Biotechnol, 1997. 565–576.

NIEBOER, E.; FLETCHER, G. G. *Determinants of reactivity in metal toxicology*. In: CHANG, L.W. (Ed.). Toxicology of Metals. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 113-132.

OFOMAJA, A.E. and HO, Y.S.*. *Effect of pH on cadmium biosorption by coconut copra meal*. Journal of Hazardous Materials, 139 (2), 356-362. 2007.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A.; LEITE, S. G. F. *Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte*. Série Tecnologia Ambiental. Disponível em:
<http://www.cetem.gov.br/publicacao/cetem_sta_45.pdf>.Acessado em 15/05/2015.

OZDEMIR, D.; SOYPACACI, Z.; SAHIN, I.; BICIK, Z.; SENCAN, I. *Ochrobactrum anthropi Endocarditis and Septic Shock in a Patient in no Prosthetic Valve or Rheumatic Heasrt Disease: Case Report and Review of the literature*. Jpn. J. Infect. Dis., n. 59, p. 254-265, 2006.

OZDEMIR, G.; OZTURK, T., CEYTHAN, N.; ISLER, R.; COSAR, T. *Heavy mett biosorption by biomas of Ochrobactrum anthropi producing exoplysaccharie in activated sludge*. Bioresource Techonology, n. 90, p. 71-74, 2003.

PADRON, A. P. and DOCKSTADER , W. B. *Selective medium for hydrogen sulfide production*. 1972, Appl. Microbiol. 23:1107.

PAGANINI, S. W.; SOUZA, A.; BOCCHIGLIERI, A. *Avaliação do comportamento de metais pesados ao tratamento de esgotos por disposição ao solo*. Engenharia Sanitaria e Ambiental, Rio de Janeirto, v. 9. N. 1. P. 225-239, 2004.

PAGNANELLI, F.; MAINELLI, S.; VEGLIO, F. and TORO, L. "Heavy metal removal by olive pomace: Biosorbent characterization and equilibrium modeling," Chem. Engineering Sci. 58, 4709-4717. 2003.

PARDO, P. G.; RAURET and J. F. LOPEZ-SANCHEZ. *Analytical approaches to the determination of phosphorus partitioning patterns in sediments*. J. Environ. Monitor. 2003. 5:312-318.

PEGORARO, R. F.; SILVA, I. R.; NOVAIS, R. F.; MENDONCA, E. S.; GEBRIM, F. O.; MOREIRA, F. F. R. *Fluxo difusivo e biodisponibilidade de zinco, cobre, ferro e manganês no solo: influência da calagem, textura do solo e resíduos vegetais*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.30, p.859-868, 2006.

PEREIRA, R. S. *Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos*. Revista Eletrônica de Recursos Hídricos. IPH UFRGS. v. 1. P. 20-36. 2004.

PEREIRA, S. I. A.; LIMA, A. I. G.; FIGUEIRA, E. M. A. *Heavy metal toxicity em Ryzobium leguminosarum biovar viciae Isalated from soils subjacted to different sources of heavy-metal contamination: effects on protein expression*. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 33, n. 33, p. 286-293, Oct. 2006.

PÉREZ, O. C. *Atenuación natural de suelos contaminados com resíduos tóxicos de origen minero. Aislamento y caracterización microbiana*. Relatório interno de atividades da Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Habana, Cuba. 2006.

PIANA, M. G. *Biorremediación y tratamiento de efluentes*. (Monografia encontrada no site <http://www.monografias.com/trabajos7/eflu/eflu2.shtml> com acesso em 26/06/2015).

PONS MP, FUSTÉ MC. *Uranium uptake by immobilized cells of Pseudomonas strains EPS- 5028*. Appl Microbiol Biotech 1993;39:661-5.

PRIETO, G. *Geochemistry of heavy metals derived from goldbearing sulphide minerals in the Mamato District, Colombia*. Journal of Geochemical Exploration. Amsterdam. V. 64, n. 1/3, p. 215-222. Nov. 1998.

PULIMI, et al. *Enhancing the Hexavalent Chromium Bioremediation Potential of Acinetobacter junii VITSUKMW2 Using Statistical Design Experiments*. J. microbiol. Biotechnol. (2012), 22(12), 1767-1775.

RAO, S. R. Biotechnological Processes. In: *Resource recovery and Recycling from Metallurgical Wastes*. Amsterdam: Elsevier Waste Management series, v. 7, 2006, cap. 5, p.109-125. 557p.

RODRIGUES, K.; OLIVEIRA, P. C. C.; AMARAL, F. W.; SIQUEIRA, J. P. S.; ARAÚJO, R. S.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G. *Tratamento de água com hidrocarbonetos aromáticos por uso de reator em bateladas seqüenciais com inóculo*

fúngico. Engenharia Sanitária e Ambiental. Volume nº17 – nº 2. Rio de Janeiro, Apr. a Jun. de 2012.

RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. *Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas*. In: CASTRO, A.; DUARTE, A.; SANTOS, T. (Ed.). O ambiente e a saúde. Lisboa: Instituto Piaget, 2003. p. 136-176.

RODRIGUES, M. S. *Determinação dos teores de metais-traço: cobre, chumbo e zinco nos sedimentos superficiais de uma bacia de pequeno porte do cerrado piauiense*. 2012. 35 F. Dissertação – Graduação em Ciências Biológicas Universidade Federal do Piauí, Piauí.

ROZYCKI, T. V.; NIES, D. H., *Cupriavidus metallidurans: evolution of a metal-resistant bacterium*. Antonie van Leeuwenhoek, v. 96, p.115139, 2009.

RULKENS, W. H.; TICHY, R.; GROTENHUIS, J. T. C. *Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures*. Water Science and Technology, v. 37, n. 8, p. 27- 35, 1998.

SAEED, S. and P. TARIQ. *Antibacterial activities of Mentha piperitas, Pisum sativum and Momordica charantia*. 2005. Pak. J. Botany, 37(4): 997-1001.

SAĞ, Y.; TATAR, B. e KUTSAL, T. *Biosorption of Pb(II) and Cu(II) by activated sludge in batch and continuous-flow stirred reactors*. Bioresource technology, 2003, v. 87 (1), pp. 27-33.

SALOMONS, W. *Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention*. Journal of Geochemical Exploration. Amsterdam. V. 52, n. 1, p. 5-23. Mar. 1995.

SAMPAIO, A. C. S. *Metais pesados na água e sedimentos dos Rios da Bacia do Alto Paraguai*. 2003. 57 f. (Dissertação Mestrado) Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

SAMUELOV, N. S.; LAMED, R.; LOWE S.; ZEIKUS J. G. *Influence of CO₂ HCO₃⁻ level and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of Anaerobiospirillum succiniciproducens*. 1991, Appl Environ Microbiol; 57:3013–9.

SÁNCHEZ, A.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, J.; HAMMAINI, A. *Biosorption of copper and zinc by Cymodocea nodosa*. FEMS Microbiology Reviews, v. 23, p. 527-536, 1999.

SANTOS, G. C. G. D. *Comportamento de B, Zn, Mn, e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico*. (Tese de Doutorado) Curso de Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP. 2005.

SARY, P. H. M. *Utilização de Pleurotus sajós caju na Biorremediação de Solo Contaminado com Óleo Diesel*. 2009. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

SAVVAIDIS I.; KARAMUSHKA V.I.; LEE H.; TREVORS J. T. *Micro-organism-gold interactions*. 2008. *BioMetals* 11: 69–78.

SCHEID, D.; STUBNER, S.; CONRAD, R. *Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition*. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 101-110, 2004.

SCHIEWER, S. and VOLESKY, B. *Biosorption of Heavy Metals*. In: *Encyclopedia of Bioprocess Engineering*, Flickinger, M.C. and Drew, S.W., eds. Wiley, NY, 1999, pp. 433-453.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; et al. *Biotechnologia Industrial Engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgar Blucher. v. 2, 2001.

SEKHAR, K. C.; KAMALA, C. T.; CHARY, N. S.; SASTRY, A. R. K.; NAGESWARA, R.; VAIRAMANI, M. *Removal of lead from aqueous solutions using an immobilized biomaterial derived from a plant biomass*. *J. Hazard Mater.*, B108, p.111-117. 2004.

SENTHILKUMAR, R., VIJAYARAGHAVAN, K., THILAKAVATHI, M., IYER, P. V. R., VELAN M. *Seaweeds for the remediation of wastewaters contaminated with zinc(II) ions*. *J. Hazardous Materials*, v. 136, n. 3, p. 791-799, 2006.

SHARMA, J.; FULEKAR, M. H. *Potential of Citrobacter freundii for bioaccumulation of heavy metal – copper*. *Biology and Medicine*, v. 1, p. 7-14, 2009.

SHENG, P. X.; TING, Y. P.; CHEN, J. P.; HONG, L. *Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanism*. *J. Colloid Interf. Sci.*, v. 275, p. 131- 141, 2004.

SHOKOHIFARD, G.; HAMADA, R.; SAKAGAMI, K. *Ion-(Na)-holding capacity of microbial biomass under saline conditions*. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v. 22, n. 7, p. 993-994, 1990.

SILVA, L. M. *Remoção de Cu e Co contido em soluções aquosas por biossorção* (Dissertação Mestrado) – PUC Rio, Rio de Janeiro, 2010.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. *A bacterial view of the Periodic Table: Genes and proteins for toxic inorganic ions*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, New York, v. 32, n. 11-12, p. 587-605, 2005.

SING, C.; YU, J. *Copper adsorption and removal from water by living mycelium of White-rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. *Elsevier Science*, v.9, 2746-2752. 1998.

SINGH P.; CAMEOTRA S. S. *Potentail applications of microbial surfactants in biomedical sciences*. Trends in Biotechnology 2004; 22: 142-46.

SINHA, S.; MUKHERJEE, S. K. *Pseudomonas aeruginosa KUCD1, a possible candidate for cadmium bioremediation*. Brazilian Journal of Microbiology. n. 40, p. 655-662, 2009.

SKERMAN, V.B.D. *A guide to the identification of the general of bacteria*. The Willians and Wilkins Co. Baltimore. 217p. 1959.

SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. C.; ALBUQUERQUE, L. M. B. *Microbiologia Básica*. Fortaleza. Edições UFC. 1987.

SOUZA, J. I. de; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A SCHOENLEIN, N. C. *Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de Saprolegnia subterranea (Dissmann) R.L. Seym. e Pythium torulosum Coker & P. Patt. (Oomycetes)*. Acta Botânica. Brasília. [online], v.22, p. 217-223, 2008.

SPECK, M.L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 2.ed., Washington, DC. p. 409, 1984.

TAKAMATSU A. A. *Avaliação da biolixiviação de metais por bactérias do gênero Thiobacillus e lodos para utilização agrícola como fertilizantes*. (Tese de mestrado) Universidade federal do Paraná, 1995, Curitiba.

TANGAROMSUK, J.; POKETHITIYOOK, P.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, U.S. *Cadmium biosorption by Sphingomonas paucimobilis biomass*. Bioresource Technology, v.85, 103-105, 2002.

TAYLOR, J. P.; WILSON, M. S.; BURNS, R. G. *Comparacion of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various tschniques*. Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, v. 34, n. 3, p. 387/401, Mar. 2002.

TEODÓSIO. T. K. C. *Estudo do potencial biotecnológico de enterococcus faecalis ATCC 51299, Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre Enterococcus faecalis ATCC 51299 e Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 na remoção de cobre*. (Dissertação de mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS, Dourados, 2011.

TORTORA, G. J. et al. *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. 827 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiology: an introduction*. E. Pearson, 8 ed. p.83, 2004.

UEKI, T.; SAKAMOTO, Y.; YAMAGUCHI, N.; MICHIBATA, H. *Bioaccumulation of Copper Ions by Escherichia coli Expressing Vanabin Genes from the Vanadium-Rich Ascidian Ascidia sydneiensis samea*. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, p. 6442-6446, 2003.

URE, A.; QUEVAUVILLER, P. H.; MUNTAU, H. & GRIEPINK, B, *Speciation of heavy metals in soils and sediments, an account of improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the Communities*. Intern. J. Environ Anal. Chem., v.51. p.135-151. 1993.

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

VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F. *Biosorption of Cd, Zn and Cu by Sargassum sp. Waste biomass*. Bioprocess Engineer, v. 22, p. 171-73, 2000.

VAN HULLEBUSCH E. D.; ZANDVOORT M. H.; LENS P. N. L. *Metal immobilization by biofilms: Mechanisms and analytical tools*. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, v.2, p. 9-33, 2003.

VEGLIO F. and BEOLCHINI F. *Removal of metals by biosorption: A review*. Hydrometall. 1997, 44 (3) 301-316.

VEGLIO F. BEOLCHINI *Removal of metals by biosorption: a review* Hydrometallurgy, 1997, pp 301-316.

VEGLIO F.; BEOLCHINI F.; GASBARRO A. *Biosorption of toxic heavy metals: an equilibrium study using free cells of Arthrobacter spp*. Process Biochem; 1997; 32:99–105.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, C. F.; SÁ, M. H. B. *Bacteriologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 604 p.

VIJAYARAGHAVAN K.; YUN Y. S. *Chemical modification and immobilization of Corynebacterium glutamicum for biosorption of Reactive black 5 from aqueous solution*. Ind Eng Chem Res (2007); pp 608–17.

VIJAYARAGHAVAN, T. V. N.; PADMESH, K.; PALANIVELU, M. *Biosorption of nickel(II) ions onto Sargassum wightii: application of two-parameter and three-parameter isotherm models*. Journal of Hazardous Materials (2006) pp 304–308.

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

VOLESKY B.; HOLAN ZR. *Biosorption of heavy metals*. Biotechnol Prog. 1995; 11:235– 50.

VOLESKY, B.; WEBER, J.; VIEIRA, R. H. S. F. *Biosorption of Cd and Cu by different types of Sargassum biomass*. Process Metallurgy, v. 9, p. 473-482, 1999.

VOSS, M.; THOMAS, R. W. S. P. *Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo*. *Ciência Rural* [online], v.31, p. 947-951, 2001.

WARREN L. A. and HAACK E. A.. *Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments*. 2001, *Earth-Science Rev* 54: 261-320.

WHO - *WORLD HEALTH ORGANIZATION*. *Guidelines for drinking-water quality*. (3. ed.). Geneva, v. 1, 2006. 536p.

WORDEN, A. Z.; LEE, J. H.; MOCK T.; ROUZE P.; SIMMONS, M. P.; AERTS, A. L. et al. *Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes Micromonas*. 2009, *Science* 324: 268–272.

XIANG, L.; CHAN, L. C.; WONG, J. W. C. *Removal of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge by isolated indigenous iron-oxidizing bacteria*. *Chemosphere*, Amsterdam, v. 41, n. ½, p. 283-287, July 2000.

XU et al. *Variance component estimation in linear inverse ill-posed models*. 2006, *J Geod* 80 (1): 69–81.

YALÇINCAYA, Y.; SOYSAL, L.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y.; BECTAS, S.; GENÇÖ. *Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor**. *Hydrometallurgy*, v. 63, p. 21-40, 2002.

YILMAZ , M.; TAY, T.; KIVANC, M.; TURK, H. *Removal of copper(ii) ions from aqueous solution by a lactic acid bacterium*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27, p. 309-314, 2010.

ZASOUSK, R. J. e BURAU, R. G. *A rapid nitric-perchloric acid digestion method for multi-element tissue analysis*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 8, p. 425-436, 1977.

ZHOU, U. G. & KIFF, A., *Application of low-pressure reverse osmosis membrane for Zn^{2+} and Cu^{2+} removal from wastewater*, *Water Sci. Technol*, 1996, pp 247–253.

ZOBELL, C. E. *Action of microorganisms on hydrocarbons*, *Bacteriol. Review*, v.10, p. 53-67, 1946.