

II-442 - ADAPTAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS AO CAMPO MAGNÉTICO PARA REMOÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE

Marcelo Melo Pirete⁽¹⁾

Graduando de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU)

Diego Andrade Lemos⁽¹⁾

Graduando de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU)

Ernane J. C. Xavier⁽²⁾

Físico pela UFV em 1992. Mestre em Física pela USP em 1994. Doutor em Engenharia Eletrônica, pela USP em 2000. Em 2006 obteve o título de Livre Docência pela Universidade de São Paulo onde atua como professor coordenando o Laboratório de Física Aplicada e Computacional (LAFAC) na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Vicelma Luiz Cardoso⁽¹⁾

Possui graduação em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia (1983), mestrado em Engenharia Química pela FEQ/UNICAMP (1988) e doutorado em Engenharia Química pela FEQ/UNICAMP (1994). Atualmente é professora Associado II da Universidade Federal de Uberlândia. Tem experiência na área de Engenharia Química, com ênfase em Processos Bioquímicos.

Miriam Maria de Resende⁽¹⁾

Engenheira Química pela Universidade Federal de Uberlândia. Mestre e Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar). Professor Adjunto III da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU).

Endereço⁽¹⁾: Av. João Naves de Ávila, 2121 – Santa Mônica - Uberlândia - MG - CEP: 38408-100 - Brasil - Tel: +55 (34) 3239-4291 - Fax: +55 (34) 3239-4188 - e-mail: mresende@feq.ufu.br

Endereço⁽²⁾: Av. Duque de Caxias Norte, 225 - Campus da USP - CEP 13635-900 – Pirassununga-SP –Brasil - Tel: +55 19 - 3565.4272.

RESUMO

A estimulação ou inibição de processos celulares por campos eletromagnéticos é de interesse considerável na biologia celular e na biotecnologia, não só por estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas também por suas aplicações potenciais práticas. Diferentes alvos incluindo proliferação celular, reações enzimáticas, síntese de biopolímeros e transporte de membrana têm sido investigados com respeito às alterações induzidas por energia eletromagnética. Esse trabalho propõe-se a adaptar uma cultura de micro-organismos à presença do campo magnético para remoção de cromo hexavalente. Os micro-organismos resistentes ao campo permitirão estudos posteriores de remoção biológica do Cr(VI). Esse metal pesado apresenta elevada periculosidade quando na forma hexavalente, representando um grave problema ambiental, enquanto a forma trivalente apresenta uma toxicidade muito menor. Os resultados indicaram que o campo magnético influenciou negativamente no crescimento celular, porém ainda garantiu um crescimento dos micro-organismos mesmo na presença de cromo.

PALAVRAS-CHAVE: resistência da cultura mista ao campo magnético, remoção de Cr(VI), tratamento de efluentes, crescimento microbiano.

INTRODUÇÃO

A poluição da água por cromo hexavalente representa um grave problema ambiental devido à ação acumulativa e carcinogênica desse íon. O cromo pode existir na forma trivalente e hexavalente, porém somente a segunda é tóxica. A forma trivalente apresenta toxicidade à flora apenas em elevadas concentrações e é pouco tóxico ou até mesmo não tóxico a fauna, (Anderson,1997).

A descarga de Cr(VI) em águas é regulada abaixo de 0,05 mg/L pela USEPA e a União Européia, EC. (1998), enquanto Cr total, incluindo Cr(III), Cr(VI) e suas outras formas, é regulada inferior a 2 mg/L (Baral e Engelken, 2002). No Brasil, segundo a resolução nº397 CONAMA (2008), os limites máximos de lançamento de Cr(VI) e Cr(III) em rios é 0,1 mg/L e 1 mg/L, respectivamente.

Existem várias técnicas de tratamento de efluentes contaminados por cromo, no entanto as que são eficientes são onerosas, como as resinas de troca iônica. (Chirwa e Wang, 1997; Patterson 1985; Chen e Hao 1998)

Algumas bactérias quando expostas a meios ricos em cromo hexavalente possuem mecanismos enzimáticos de defesa que reduzem essa forma à trivalente. Utilizando esse mecanismo é possível fazer o tratamento biológico de efluentes contaminados por esse metal pesado (Badar et al., 2000; Camargo et al., 2005, Çetin et al., 2008; Congeevaram et al., 2007; Dalcin et al., 2011; Dermou et al., 2005; Dermou and Vayenas 2008; Desai et al., 2008; Fein et al., 2002; Garavaglia et al., 2010; Ilias et al., 2011; Koçberber and Dönmez, 2007; Kong et al. 2009; Lee et al. 2008; Megharaj et al., 2003; Molokwane et al., 2008; Orozco et al., 2010; Pal and Paul, 2005; Pogaku and Kulkarni, 2006; Saxena et al., 2000; Shakoori et al., 2000; Srinath et al. 2002; Velásquez and Dussan, 2009, Zahoor and Rehman 2009; Zouboulis et al., 2004).

O campo magnético altera atividades enzimáticas, assim, provavelmente, também influencia nas atividades das bactérias, tornando-as mais eficientes na remoção de metais pesados como o cromo. No entanto, dependendo da frequência aplicada podem-se ter influências negativas ou positivas, demandando um estudo acerca desse promissor assunto.

Atualmente, um problema encontrado nos estudos da influência do campo magnético é a adaptação dos micro-organismos, de forma a encontrar variáveis que contribuam para a sua resistência ao campo. Dessa forma, pode-se observar um decréscimo da população mesmo a baixa frequência o que torna a faixa de estudo da aplicação do campo magnético muito restrita.

Conseqüentemente, variáveis que pudessem aumentar a resistência da cultura ampliaria a faixa de possível aplicação de campo magnético e possibilitaria estudos mais aprofundados acerca desse assunto.

O campo magnético altera atividade enzimática, sendo um forte indício de que também altera a atividade microbiana. Dessa forma, este estudo se propõe a encontrar uma solução econômica e eficiente para remoção de cromo hexavalente através da redução biológica do cromo hexavalente sob ação do campo magnético.

METODOLOGIA

Utilizou-se uma cultura mista de micro-organismos adaptada à presença de cromo proveniente de um projeto de mestrado de Leles (2010). O meio de cultura e a quantidade utilizada estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Meio de cultura utilizado no projeto.

NH ₄ Cl	1 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
CaCl ₂	0,001 g/L
CH ₃ COONa.3H ₂ O	2,5 g/L
Levedura residual cervejeira	0,5 g/L
Glicose	10 g/L

Inicialmente, os micro-organismos coletados foram cultivados em dois erlenmeyers com 100 mL de meio de cultura cada, e deixados sob agitação por dois dias. Repetiu-se esse procedimento três vezes, mantendo a quantidade de meio em cada repique.

Posteriormente, um erlenmeyer foi armazenado como estoque a aproximadamente 7°C, enquanto o outro foi utilizado na adaptação ao campo magnético.

O equipamento gerador do campo magnético trata-se de uma bobina ligada a um controlador de frequência. O sinal do campo magnético gerado é do tipo onda quadrada. A bobina é refrigerada por água proveniente de um refrigerador. A água passa em uma serpentina sobre a fiação da bobina. O equipamento pode ser visualizado na Figura 1.



Figura 1: Equipamento gerador da onda de campo magnético.

Através de uma sonda Hall e um osciloscópio, antes dos ensaios foi feita uma análise do sinal do campo magnético para 0,5 Hz, frequência que seria utilizada para adaptar os micro-organismos.

Inicialmente, a cultura foi adaptada à presença apenas do campo magnético, sendo posteriormente adaptada à ação conjunta do campo magnético e da presença de cromo hexavalente.

A cultura a ser adaptada, inicialmente foi centrifugada e transferida para um meio com os nutrientes da Tabela 1, porém sem a presença da glicose. Posteriormente essa cultura foi exposta, por 30 minutos, ao campo magnético sob a frequência de 0,5 Hz. Uma análise de sólidos voláteis em suspensão foi realizada antes e depois do ensaio a fim de avaliar o crescimento dos micro-organismos na presença do sinal magnético. Depois da aplicação do campo, o meio de cultura foi novamente repicado para o meio da Tabela 1. Dessa maneira, a cultura foi deixada sob agitação por três dias. Posteriormente, repetiu-se o procedimento anterior aumentando a frequência para 1, 2 e 5 Hz respectivamente.

A fim de avaliar a capacidade de crescimento da cultura sob ação conjunta do campo magnético e da presença do cromo hexavalente foram realizados dois ensaios, utilizando quantidade de micro-organismos diferentes.

O meio adaptado foi inicialmente cultivado para 600 mL, dos quais 200 mL foram centrifugados e transferidos para dois erlenmeyers com 100 mL de meio cada contendo 120 mg/L de cromo. Um dos meios de cultura foi deixado no campo magnético por 30 minutos, enquanto o outro, para finalidade de comparação, ficou o mesmo período fora da ação do campo magnético. Análises de sólidos voláteis em suspensão foram realizadas antes e depois dos ensaios.

Posteriormente, repetiu-se o procedimento anterior centrifugando 300 mL do meio de cultura e dividindo-o em dois erlenmeyers de 150 mL cada, na mesma concentração de cromo hexavalente do ensaio anterior (120mg/L).

As análises de sólidos voláteis solúveis foram realizadas segundo metodologia de definida em APHA (1989).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 indica os resultados do crescimento celular sob ação apenas do campo magnético.

Tabela 2: Crescimento da cultura sob a influência do campo magnético.

Frequência do campo (Hz)	Concentração inicial de micro-organismos (g/L)	Concentração final de micro-organismos (g/L)	Porcentagem de crescimento (%)
0,5	4,2	5,1	21,43%
1	3,84	4,42	15,10%
2	3,48	3,58	2,87%
5	3,24	2,89	-10,80%

Nota-se que o campo magnético dificultou o crescimento celular levando até mesmo à morte da cultura na frequência de 5 Hz. Assim, optou-se por realizar os ensaios preliminares na frequência de 2 Hz, já que se trata da maior frequência em que os micro-organismos não morreram.

O sinal gerado pelo campo magnético a 0,5 Hz captado pela sonda Hall está apresentado na Figura 2.

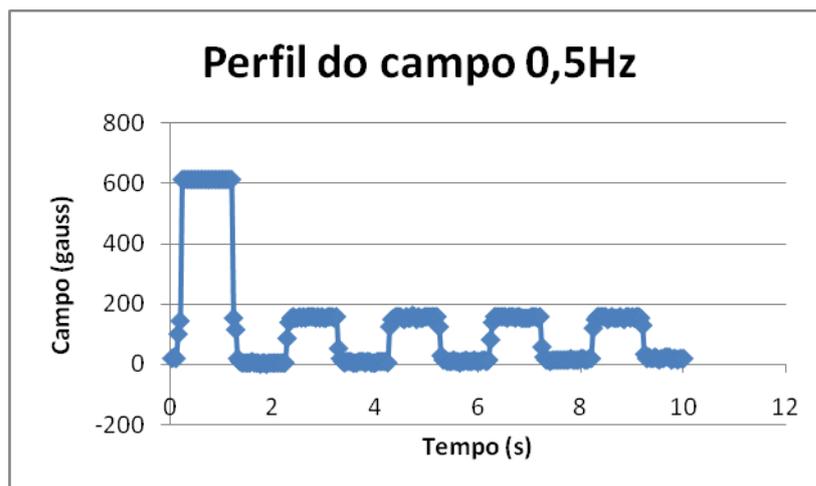


Figura 2: Onda gerada pelo campo magnético.

Observa-se que o campo gerado é uma onda quadrada, como se esperava, que alcança aproximadamente 200 gauss de campo magnético. Os primeiros dois segundos se caracterizam por apresentar uma intensidade maior de campo magnético (600 gauss), por isso a cultura é introduzida no sistema após esse período.

Os resultados do crescimento celular sob ação do campo magnético e do íon cromo estão apresentados na Tabela 3 enquanto na Tabela 4 estão apresentados os resultados de crescimento celular apenas sob ação do íon cromo hexavalente.

Tabela 3: Crescimento celular nos ensaios preliminares sob ação do campo.

Concentração inicial de micro-organismos (g/L)	Concentração de micro-organismos após o ensaio	Porcentagem de crescimento (%)
2,65	2,755	3,96

Como se pode observar, o campo magnético influi negativamente no crescimento celular, porém ainda se garante crescimento mesmo na presença de cromo. Dessa forma, pode-se garantir que sob essa frequência utilizada os micro-organismos não morrem podendo ser utilizados em estudos futuros de remoção biológica de cromo hexavalente.

Tabela 4: Crescimento celular nos ensaios preliminares sem a ação do campo.

Concentração inicial de micro-organismos (g/L)	Concentração de micro-organismo após o ensaio	Porcentagem de crescimento (%)
2,48	2,855	15,12

CONCLUSÃO

O campo magnético gerado na forma de onda quadrada de baixa frequência influencia significativamente no crescimento celular, no entanto em 2 Hz a cultura não decresce, mesmo na presença de cromo, o que possibilita futuros estudos acerca da influência do campo magnético na redução biológica de cromo hexavalente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio Financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e do CNPq - Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, R. A. Chromium as an essential nutrient for humans, Regul. Toxicol. Pharmacol. 26 (1), S35–S41, 1997.
2. APHA, AWWA and WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC, 1989.
3. BADAR U., AHMED N., BESWICK A. J., Pattanapitpaisal P., Macaskie L. E. Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. Biotechnol Lett 22: 829–36, 2000.
4. BARAL, A. and ENGELKEN, R. D. Chromium-based regulations and greening in metal finishing industries in the USA, Environ. Sci. Policy 5 (2) 121–133, 2002.
5. CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., BENTO, F. M., FRANKENBERGER, W. T. Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate, Appl. Soil Ecol. 29, 193–202, 2005.
6. ÇETIN, D., DÖNMEZ, S., DÖNMEZ, G. The treatment of textile wastewater including chromium(VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment, J. of Environ. Manag. 88 76–82, 2008.
7. CHEN, J. M., HAO, O. J. Microbial Cr(VI) reduction, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 28 (3), 219–251, 1998.
8. CHIRWA, E. M. N., WANG, Y. Hexavalent chromium reduction by *Bacillus* sp. in a packed-bed bioreactor, Environ. Sci. Technol. 31 1446–1451, 1997.
9. CONAMA n° 397 - Resolução, de 3 de abril de 2008; acessado em 06/03/2010 <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=563>.
10. CONGEEVARAM S, DHANARANI S, PARK J, DEXILIN M, THAMARAISELVI K.. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. J Hazard Mater 146:270–277, 2007.
11. DALCIN, M. G., PIRETE, M. M., LEMOS, D. A., RIBEIRO, E. J., CARDOSO, V. L., RESENDE, M. M. DE. Evaluation of hexavalent chromium removal in a continuous biological filter with the use of central composite design (CCD), J. of Environ. Manag. 92, 1165e1173, 2011.
12. DERMOU, E. AND VAYENAS D. V., Biological Cr(VI) reduction in a trickling filter under continuous operation with recirculation, J. Chem Technol Biotechnol 83:871–877, (2008).
13. DERMOU, E., Velissariou, A., Xenos, D. Vayenas, D.V., Biological chromium(VI) reduction using a trickling filter, Journal of Hazardous Materials B126, 78–85, 2005.
14. DESAI C, JAIN K, MADAMWAR D. Hexavalent chromate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp. G1DM21 isolated from Cr(VI) contaminated industrial landfill. Process Biochem 43:713–721, 2008.
15. EC-Official Journal of the European Communities, L330/32, December 12, 1998.
16. FEIN, J. B., FOWLE, D.A., CAHILL, J., KEMNER, K., BOYANOV, M., BUNKER, B. Nonmetabolic reduction of Cr(VI) by bacterial surfaces under nutrient-absent conditions, Geomicrobiol. J. 19, 369–382, 2002.
17. GARAVAGLIA, L., CERDEIRA, S. B., VULLO, D. L., Chromium (VI) biotransformation by β - and γ -Proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes, J. Hazard. Mater. 175 104–110, 2010.
18. ILIAS, M., RAFIQULLAH, I. MD., DEBNATH, B. C., MANNAN, K. S. B., HOQ, MD. MOZAMMEL, Isolation and Characterization of Chromium(VI)-Reducing Bacteria from Tannery Effluents, Indian J Microbiol, Published Online, 2011.

19. KOÇBERBER, N. DÖNMEZ, G., Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters, *Bioresource Technology* 98 2178–2183, 2007.
20. KONG, B., ZENG, X., LIU, X., LI, X., LI, J., LUO, S., WEI, W. Kinetic Study and Mathematical Modeling of Chromium(VI) Reduction and Microorganism Growth Under Mixed Culture, *Curr. Microbiol.*, 59:565–571, 2009.
21. LEE, S.-E., LEE, J.-U., CHON, H.-T., LEE, J. S., Microbiological reduction of hexavalent chromium by indigenous chromium-resistant bacteria in sand column experiments, *Environ Geochem Health* 30:141–145, 2008.
22. LELES, D., M, A., Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
23. MEGHARAJ, M., AVUDAINAYAGAM, S., NAIDU, R., Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste, *Curr. Microbiol.* 47, 51–54, 2003.
24. MOLOKWANE, P. E., MELI, K. C., NKHALAMBAYAUSI-CHIRWA, E. M., Chromium (VI) reduction in activated sludge bacteria exposed to high chromium loading: Brits culture (South Africa), *Water research* 42 4538 – 4548, 2008.
25. OROZCO, A. M. F., CONTRERAS, E. M., ZARITZKY, N. E., Cr(VI) reduction capacity of activated sludge as affected by nitrogen and carbon sources, microbial acclimation and cell multiplication, *J. Hazard. Mater.* 176 657–665, 2010.
26. PAL, A., PAUL, A. K., Aerobic chromate reduction by chromate-resistant bacteria isolated from serpentine soil, *Microbiol. Res.*, 159, 347–354, 2005.
27. PATTERSON, J. W., *Industrial Wastewater Treatment Technology*. Butterworth Publishers, Stoneham, MA, pp., 53–393, 1985.
28. POGAKU R, KULKARNI S. Biosorption of combined industrial effluents using phanerochaete chrysosporium. *Int J Chem React Eng* 4:1–12, 2006.
29. SAXENA D., LEVIN R., FIRER M. A., Removal of chromate from industrial effluent by a new isolate of *Staphylococcus cohnii*. *Water Sci Technol* 42:93–8, 2000.
30. SHAKOORI, A. R., MAKHDOOM, M., HAQ, R. U., Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 348–351, 2000.
31. SRINATH, T., VERMA, T., RAMTEKE, P. W., GARG, S. K., Cr(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria, *Chemosphere* 48 427–435, 2002.
32. VELÁSQUEZ L, DUSSAN J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus Sphaericus*. *J Hazard Mater* 167:713–716, 2009.
33. ZAHOOR A, REHMAN A. Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *J Environ Sci* 21:814–820, 2009.
34. ZOUBOULIS AI, LOUKIDOU MX, MATIS K.A. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem* 39:909–916, 2004.