



VI-060 – BACTÉRIAS REDUTORAS DE CROMO HEXAVALENTE ISOLADAS DE SOLOS DE ATERRO SANITÁRIO

Francielly Inagaki Caciano⁽¹⁾

Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Eduardo Antonio Amancio da Silva

Graduando em Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Rossean Fernandes Golin

Técnica do Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Zoraidy Marques de Lima

Bióloga do Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental e Professora do Programa de Pós-graduação em Recursos Hídricos da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Eduardo Beraldo de Moraes

Biólogo pela Universidade Estadual Paulista. Professor Adjunto do Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, 2367, Bloco F, FAET, Cuiabá – MT, CEP 78060-900 - Brasil. e-mail: francielly_inagaki@hotmail.com

RESUMO

Os aterros sanitários são fontes de metais tóxicos podendo contaminar o ambiente. Uma vez presentes nos solos, estes metais podem gerar condições inóspitas de sobrevivência aos seres vivos especialmente organismos superiores. Os micro-organismos, entretanto, podem sobreviver a estes ambientes devido a sua capacidade de tolerar e diminuir os efeitos tóxicos dos metais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias de solo de aterro sanitário e verificar a capacidade das mesmas em tolerar e reduzir o cromo hexavalente. Sete linhagens bacterianas foram obtidas, com destaque para quatro que tiveram a capacidade de crescer em meio caldo nutritivo que continham até 200 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ (equivalente a 70,7 mg/L de Cr^{6+}). Estas tiveram verificada a sua capacidade de redução do Cr^{6+} e valores de redução entre 24 a 33% foram encontrados. Estes resultados, entretanto, são inferiores àqueles relatados na literatura para bactérias que foram isoladas de ambientes contaminados por cromo hexavalente.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias, Solo de Aterro Sanitário, Cromo Hexavalente, Redução.

INTRODUÇÃO

Os metais tóxicos presentes nos resíduos sólidos têm se destacado em diversos estudos devido a sua capacidade de contaminação não somente dos solos adjacentes aos aterros sanitários como também das águas superficiais e subterrâneas (CELERE et al. 2007; MOREIRA, et al. 2009; ALCÂNTARA et al. 2011; SANTOS e MEDEIROS, 2011). A origem destes metais geralmente são lâmpadas, pilhas, baterias, tintas, produtos de limpeza, óleos lubrificantes, solventes, aerossóis, materiais fotográficos e radiográficos, embalagens de produtos químicos, pesticidas, componentes eletrônicos, produtos farmacêuticos, latarias de alimentos, aditivos alimentares e plásticos (MUNÔZ 2002).

Oliveira e Jucá (2004) e Korf et al. (2008) verificaram que em solos de áreas de disposição de resíduos sólidos urbanos é significativo o potencial de retenção destes metais. Esta retenção ocorre principalmente em solos argilosos (Oliveira et al. 2002) e Lange et al. (2002) confirmaram a retenção em especial do cromo.

O cromo é um metal pesado tóxico amplamente usado no curtimento do couro, galvanoplastia, produção de pigmentos e indústria de processamento de metais (FULLADOSA et al. 2006). Este metal existe em diversas estados de oxidação desde Cr(II) até o Cr(VI). Na natureza o cromo geralmente é encontrado como Cr^{3+} ou Cr^{6+} (REHMAN et al. 2008). Na forma trivalente o cromo possui atividade biológica atuando como oligoelemento no metabolismo humano ao contrário da forma hexavalente que é uma espécie altamente tóxica,

podendo causar ulceração nasal, dermatites, lesões mutagênicas e carcinogênicas e leucemia (KOTAS e STASICKA, 2000).

Diversos micro-organismos possuem excepcional habilidade de se adaptar e colonizar ambientes poluídos por metais tóxicos que normalmente são inabitáveis por organismos superiores. Esses micro-organismos têm desenvolvidos vários mecanismos de proteção ao efeito tóxico dos metais tais como adsorção, absorção, metilação, oxidação e redução (REHMAN et al. 2008). A redução intracelular do cromo(VI) para cromo(III) tem sido relatada como sendo um dos principais mecanismos de detoxicação realizado por uma ampla variedade de micro-organismos (FULLADOSA et al. 2006) . Dessa forma, a biorremediação do cromo(VI) é de especial interesse devido a grande aplicação industrial desse metal.

Aplicação de micro-organismos em processos biorremediativos do cromo, entretanto, requer o isolamento de linhagens tolerantes aos efeitos tóxicos deste metal e posterior avaliação da habilidade de sobrevivência, multiplicação e redução do Cr⁶⁺. Uma vez que solos de aterro sanitário possam conter altas concentrações de metais, dentre eles o cromo, a capacidade de bactérias isoladas deste ambiente em tolerar e reduzir o Cr⁶⁺ para Cr³⁺ foi verificada neste trabalho, visando futuras aplicações em processos biorremediativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Amostras de solo do aterro sanitário de Cuiabá, MT, foram coletadas a 10 cm de profundidade em cinco pontos diferentes. Em laboratório essas foram misturadas obtendo assim uma amostra composta. Para o isolamento das bactérias optou-se pela técnica da diluição em série utilizando solução de pirofosfato de sódio / Tween 80 como meio diluente para melhor recuperação das bactérias. A partir das diluições (10⁻¹ a 10⁻⁴) procedeu-se a inoculação de 0,1 mL em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Padrão para Contagem e o material foi espalhado com auxílio da alça de Drigalski (técnica de spread plate). Após o período de incubação (72h - 35°C) foram selecionadas aquelas colônias que visualmente possuíam características diferentes. A técnica de esgotamento em estrias foi utilizada para obtenção das culturas puras que posteriormente foram caracterizadas quanto à morfologia celular e resposta à coloração diferencial de Gram.

TESTES DE TOLERÂNCIA AO CROMO HEXAVALENTE

As bactérias isoladas foram testadas em uma etapa preliminar quanto à capacidade de tolerar diferentes concentrações de K₂Cr₂O₇ (50; 100; 150 e 200 mg/L) por meio do desenvolvimento das curvas de crescimento de cada linhagem em caldo nutritivo que continha tal substância. Tais concentrações de K₂Cr₂O₇ equivalem a 17,7; 35,4; 53,0 e 70,7 mg/L de Cr⁶⁺ respectivamente. Suspensões de cada linhagem bacteriana foram preparadas e padronizadas a 0,8 de absorbância ($\lambda = 600$ nm) e 0,1 mL destas foram adicionadas a 8 mL de caldo nutritivo contendo o dicromato de potássio. Foram realizadas triplicatas para cada concentração e o período de incubação foi de 72h - 35°C sem agitação. As leituras de absorbância ($\lambda = 600$ nm) de cada amostra para verificar o crescimento bacteriano foram feitas a cada 12 horas.

REDUÇÃO DO CROMO HEXAVALENTE PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS

Após a seleção daquelas bactérias que toleraram as concentrações de K₂Cr₂O₇ utilizadas na etapa preliminar, os testes para verificar a capacidade de redução do cromo hexavalente pelas mesmas foram feitos de acordo com Conceição et al. (2007) com modificações, inoculando 1,0 mL da suspensão bacteriana padronizada a 0,8 de absorbância ($\lambda = 600$ nm) em 50,0 mL de caldo nutritivo com concentração inicial de K₂Cr₂O₇ igual a 100 mg/L (35,4 mg/L de Cr⁶⁺). Após o período de incubação (72h - 35°C, sem agitação) o Cr⁶⁺ residual foi determinado de acordo com a Norma Técnica da ABNT 13738 - Água - Determinação de cromo hexavalente - Método colorimétrico da difenilcarbazida (ABNT, 1996). Nesta etapa os testes foram feitos em duplícata.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a caracterização das células bacterianas quanto à morfologia e resposta à coloração diferencial de Gram. Foram encontradas duas linhagens na forma cocos gram negativas e cinco linhagens na forma bastonetes, três gram positivas e duas negativas.

Tabela 1: Caracterização das células bacterianas isoladas do solo de aterro sanitário quanto à morfologia e coloração de Gram.

Bactéria	Forma	Gram
3	Cocos	Negativa
5	Bastonetes	Positiva
7	Bastonetes	Negativa
9	Bastonetes	Positiva
12	Cocos	Negativa
13	Bastonetes	Negativa
16	Bastonetes	Positiva

Na Figura 1 que apresenta as curvas de crescimento das linhagens bacterianas em diferentes concentrações de $K_2Cr_2O_7$, é possível verificar que a bactéria 3 não apresentou crescimento na concentração de 200 mg/L e mesmo nas demais concentrações houve pequeno crescimento em 60h quando comparado às demais linhagens, mas que regrediu após 72h. Da mesma forma, a bactéria 16 não teve crescimento na maior concentração e pouco crescimento nas demais.

As linhagens 5 e 12 apresentaram crescimento exponencial em todas as concentrações de $K_2Cr_2O_7$, sendo que a bactéria 5 apresentou os maiores valores de absorbância após 72h nos meios que continham cromo. Crescimento exponencial também foram verificados nas linhagens 7, com exceção para concentração 200 mg/L, 9 e 13, com exceções para as concentrações 150 e 200 mg/L.

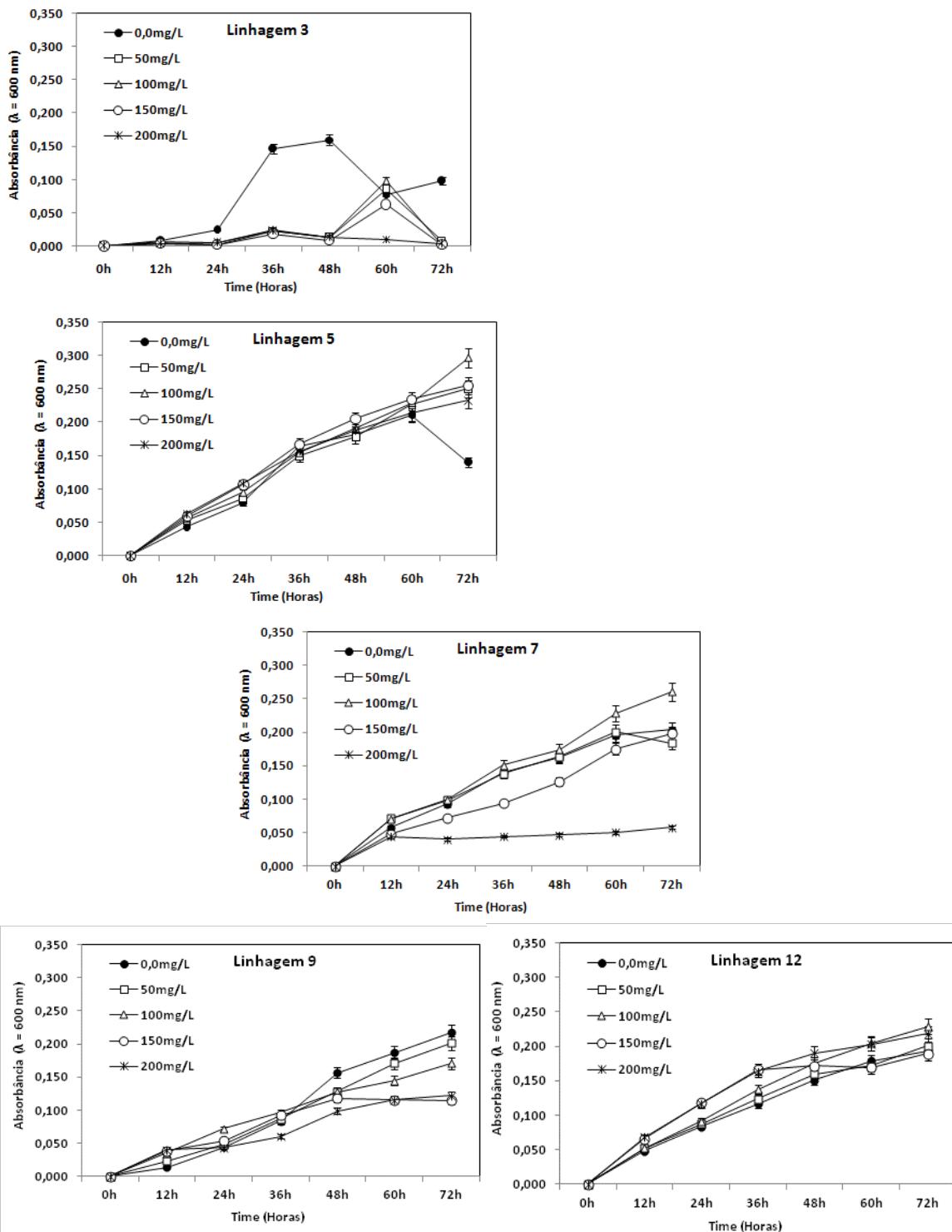
A partir das curvas de crescimento das bactérias isoladas do solo do aterro sanitário, foram selecionadas as linhagens que melhor toleraram a presença do cromo, ou seja, bactérias 5, 7, 9 e 12 para que os testes de redução do cromo hexavalente fosse efetuado. A Figura 2 apresenta a porcentagem de cromo hexavalente que foi reduzido por estas bactérias.

As quantidades de cromo hexavalente reduzido pelas bactérias 5, 7, 9 e 12 foram, respectivamente, 24%, 33%, 32% e 30% em 72h. Isto comprova a capacidade de bactérias de solo de aterro sanitário em reduzir este metal. Entretanto, quando comparado estes resultados com aqueles da literatura científica em que bactérias isoladas de ambientes que continham este metal foram estudadas quanto à capacidade de reduzir Cr^{6+} verifica-se que os valores encontrados nestes estudos são maiores.

Conceição et al. (2007) verificou a redução de cromo hexavalente de bactérias isoladas de solo contaminado por este metal. De 20 isolados, seis tiveram a capacidade de reduzir o cromo(VI) em um período de 24h em taxas que variaram de 54 a 64%. A concentração inicial do cromo hexavalente foi de 250 mg/L. Tais linhagens foram identificadas como sendo do gênero *Aeromonas*, *Aureobacterium*, *Xanthobacter*, *Agrobacterium* e *Bacillus*.

A bactéria *Bacillus* sp.ev3 foi isolada por Rehman et al. (2008) de águas residuárias contaminadas por metais pesados e apresentou capacidade de tolerar até 4800 $\mu g/mL$ de cromo hexavalente e reduzir 91% do Cr^{6+} presente em meio de cultura em 96h e 84% do cromo presente em efluentes industriais.

Outra bactéria do gênero *Bacillus* isolada por Masood e Malik (2011) de solos irrigados com efluentes de curtumes contaminados com metais pesados também apresentou habilidade de tolerar altas concentrações de cromo hexavalente (1000 mg/L) e reduzir na totalidade 100 mg/L de Cr^{6+} em 48h.



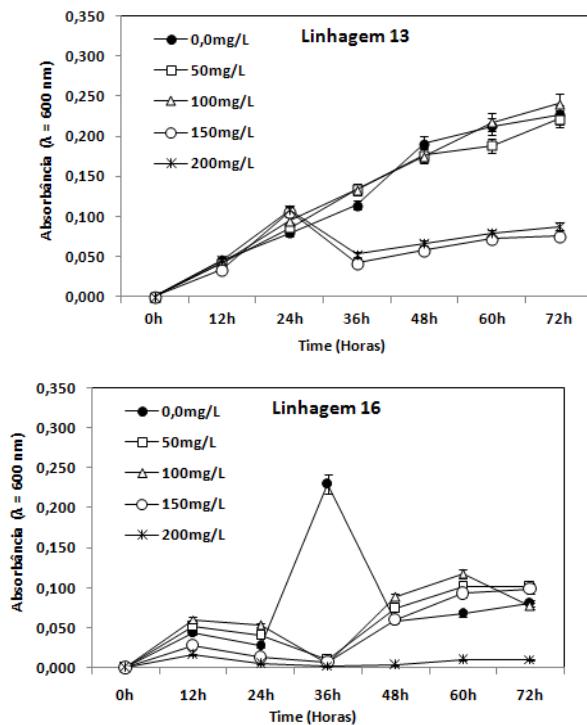


Figura 1: Curva de crescimento dos isolados bacterianos frente às diferentes concentrações de $K_2Cr_7O_4$ (os dados são médias de três repetições e as barras representam o erro padrão).

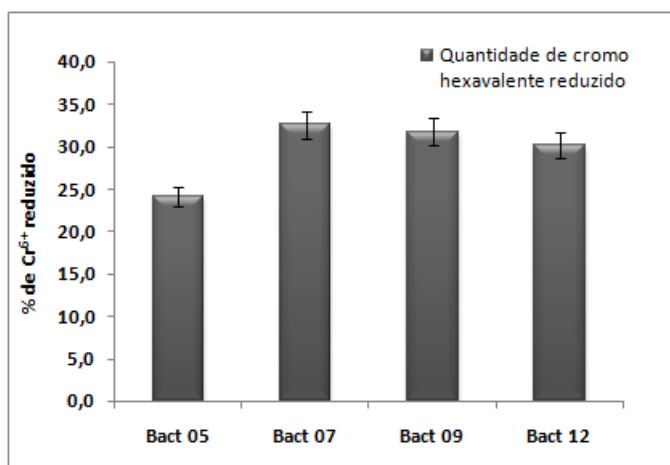


Figura 2: Porcentagem de Cr^{6+} reduzido pelos isolados bacterianos. Concentração inicial de Cr^{6+} : 35,4 mg/L (os dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

CONCLUSÕES

As bactérias isoladas do solo de aterro sanitário apresentaram a capacidade de tolerar até 200 mg/L de $K_2Cr_7O_4$ (equivalente a 70,7 mg/L de Cr^{6+}) e quatro linhagens apresentaram a capacidade de reduzir o Cr(VI) a Cr(III). Entretanto, os valores encontrados neste estudo ficaram abaixo daqueles relatados na literatura científica de tal forma que estas linhagens não possuem potencial para serem exploradas em processos biorremediativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13738 - Água - Determinação de cromo hexavalente - Método colorimétrico da difenilcarbazida.** 1996, 2p.
2. ALCÂNTARA, A. J. O.; PIERANGELI, M. A. P.; SOUZA, C. A.; SOUZA, J. B. Teores de As, Cd, Pb, Cr e Ni e atributos de fertilidade de Argissolo Amarelo distrófico usado como lixão no município de Cáceres, estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Geociências.** v.41, n.3, p.539-548, 2011.
3. CELERE, M. S.; OLIVEIRA, A. S.; TREVILATO, T. M. B.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública,** v.23, n.4, p.939-947, 2007.
4. 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, 2007.
5. FULLADOSA, E.; DESJARDIN, V.; MURAT, J. C.; GOURDON, R.; VILLAESCUSA, I. Cr(VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution. **Chemosphere.** v.65, p.644-650, 2006.
6. KORF, E. P.; MELO, E. F. R. Q.; THOMÉ, A.; ESCOSTEGUY, P. A. V. Retenção de metais em solo da antiga área de disposição de resíduos sólidos urbanos de Passo Fundo – RS. **Revista de Ciências Ambientais.** v.2, n.2, p.43-60, 2008.
7. KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution,** v.107, p.263-283, 2000.
8. LANGE, L. C.; SIMÕES, G. F.; FERREIRA, C. F. A.; SANTANA, D. W. E. A.; GARCIA L. N. Estudo do transporte de contaminantes em meios porosos aplicado a aterros de disposição de resíduos sólidos urbanos. In: Junior, A. B. C. et al. (Org.). **Alternativas para disposição de resíduos sólidos urbanos para pequenas comunidades:** coletânea de trabalhos técnicos. Florianópolis: PROSAB, p. 13-17. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/prosab/livros/livrocompletodifinal.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2008.
9. MASOOD, F.; MALIK, A. Hexavalent Chromium Reduction by *Bacillus* sp. Strain FM1 Isolated from Heavy-Metal Contaminated Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** v.86, p.114-119, 2011.
10. MOREIRA, D. A.; MARTINEZ, M. A.; SOUZA, J. A. R.; MATOS, A. T.; BATISTA, R. O. Parâmetros de transporte de metais pesados em resíduos sólidos urbanos. **Engenharia na Agricultura.** v.17, n.14, p.317-322, 2009.
11. MUÑOZ, S. I. S. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto-SP: avaliação dos níveis de metais pesados.** 2002. 159f. Tese de Doutorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
12. OLIVEIRA, F. J. S.; JUCÁ, J. F. T. Acúmulo de metais pesados e capacidade de impermeabilização do solo imediatamente abaixo de uma célula de um aterro de resíduos sólidos. **Engenharia Sanitária e Ambiental.** v.9, n.3, p.211-217, 2004.
13. OLIVEIRA, J. C.; PRIM, E. C. C.; JUNIOR, A. B. C. 2002. Estudo da retenção de poluentes veiculados por lixiviados de aterros sanitários em solos argilosos. In: JUNIOR, A. B. C. et al. (Org.). **Alternativas para disposição de resíduos sólidos urbanos para pequenas comunidades: coletânea de trabalhos técnicos.** Florianópolis: PROSAB, p. 13-17. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/prosab/livros/livrocompletodifinal.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2008.
14. REHMAN, A.; ZAHOOR, A.; MUNEER, B.; HASNAIN, S. Chromium tolerance and reduction potential of a *Bacillus* sp.ev3 isolated from metal contaminated wastewater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** v.81, p.25-29, 2008.
15. SANTOS, G. O.; MEDEIROS, P. A. Estudo preliminar da qualidade das águas subterrâneas na área de influência do aterro sanitário de Caucaia. **Conexão - Ciência e Tecnologia.** v.5, n.3, p.61-70, 2011.