

III-154 - TOLERÂNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO DE ATERRO SANITÁRIO À METAIS PESADOS VISANDO SUA APLICAÇÃO EM PROCESSOS BIORREMEDIATIVOS

Eduardo Antonio Amancio da Silva⁽¹⁾

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

Franielly Inagaki Caciano

Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental pela 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). Professor do Programa de Mestrado em Recursos Hídricos/UFMT

Rossean Fernandes Golin

Técnica do Laboratório de Microbiologia Sanitária e Ambiental 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)

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: eduardo.amancio.silva@gmail.com

RESUMO

Solos de aterros sanitários geralmente contêm elevadas concentrações de metais pesados criando condições ambientais inóspitas para os diversos seres vivos. A microbiota nativa, entretanto, para superar tais condições, pode ter sua estrutura alterada destacando aqueles micro-organismos que em muitas das vezes contribuem para a detoxificação do ambiente. Neste sentido, o presente trabalho objetivou estudar a capacidade de bactérias isoladas de solo de aterro sanitário, em tolerar os metais chumbo (Pb^{2+}), níquel (Ni^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}) e cromo (Cr^{6+}) para avaliar suas potencialidades biorremediativas. Sete linhagens bacterianas foram isoladas do solo contaminado por chorume e a avaliação da tolerância frente aos metais pesados ocorreu por meio das curvas de crescimento de cada linhagem em diferentes concentrações destes metais. Cinco linhagens foram capazes de crescer no meio de cultura contendo 10,0 mg/L de $HgCl_2$ (o equivalente a 7,39 mg/L de Hg^{2+}). Em relação ao Pb^{2+} verificou-se que o mesmo teve efeito benéfico no crescimento das bactérias nas concentrações estudadas (10,0; 50,0 e 100,0 mg/L de $PbCl_2$), pois em alguns casos houve maior crescimento no meio contendo este metal do que aquele observado no controle, ou seja, no meio de cultura sem metal. Para o Cr^{6+} verificou-se que algumas das bactérias (linhagens 5, 9 e 12) toleraram até 200 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ (o equivalente a 70,70 mg/L de Cr^{6+}). As bactérias 5, 7, 12 e 13 apresentaram algum crescimento na menor concentração de Ni^{2+} utilizada (10,0 mg/L de $NiSO_4$ o equivalente a 3,79 mg/L de Ni^{2+}). Há potencialidade biorremediativa destas bactérias para os metais Pb^{2+} e Cr^{6+} , entretanto, novos estudos são necessários para se determinar a concentração mínima inibitória destas bactérias frente a estes metais e a avaliação da capacidade das linhagens 5 e 12 em reduzir o Cr^{6+} para Cr^{3+} .

PALAVRAS-CHAVE: Aterro sanitário, Bactérias, Metais pesados, Biorremediação.

INTRODUÇÃO

O solo é habitado por uma enorme variedade de micro-organismos e suas atividades estão interligadas entre si e com as condições do ambiente prevalecentes a cada momento. Verifica-se que a população microbiana se ajusta rapidamente às variações dessas condições ambientais e que são estas que fundamentalmente determinam o sentido em que a atividade dessas populações se desenvolve mais do que a espécie ou o número de micro-organismos presentes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Em solos de aterro sanitário, diversos poluentes ambientais estão presentes tendo destaque o chorume que apesar da composição físico-química extremamente variável, geralmente possui matéria orgânica em

decomposição, amônia, compostos fenólicos, cloretos, metais pesados entre outros (BRITO-PELEGRINI et al. 2009). Desta forma, a microbiota presente pode estar adaptada às condições extremas representadas pelo potencial tóxico destes contaminantes, especialmente metais pesados. A origem destes metais nos aterros sanitários 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).

Em condições normais de operação do aterro sanitário, os metais pesados são fortemente retidos devido à sua ligação com a matéria orgânica e precipitação. No entanto, baixos níveis de metais podem ser lixiviados principalmente durante as perturbações no sistema que permitem a entrada de oxigênio (ØYGARD et al. 2004; ØYGARD et al. 2005). Assim as concentrações destes elementos no lixiviado podem variar amplamente de micrograma a miligrama por litro (CHRISTENSEN et al. 2001).

A biorremediação é uma tecnologia de baixo custo para a remediação de ambientes impactados por substâncias perigosas que utiliza a capacidade biodegradativa dos micro-organismos para remover os poluentes do ambiente. Esta técnica vem sendo aplicada principalmente em ambientes poluídos por hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas e metais pesados (GAYLARDE et al. 2005, MANCERA-LÓPEZ et al. 2008; GUO, et al. 2010). O sucesso desta tecnologia depende em parte do isolamento de linhagens microbianas que além de ter a capacidade de degradar o poluente, possua a capacidade de resistir à toxicidade dos agentes contaminantes. Micro-organismos presentes em ambientes impactados previamente, provavelmente estão adaptados às condições inóspitas oferecidas pelos poluentes e podem até mesmo contribuir para a detoxificação destes locais. Dessa forma, estes são seres com grande potencialidade em processos biorremediativos. Neste estudo, bactérias de solo de aterro sanitário contaminado por chorume foram isoladas e caracterizadas macro e microscopicamente. Testes quanto as suas tolerâncias ao chumbo (Pb^{2+}), níquel (Ni^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}) e cromo (Cr^{6+}), foram efetuados para avaliar o potencial destes micro-organismos serem aplicados em processos biorremediativos que contenham tais metais.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Amostras de solo contaminado por chorume foram coletadas a 10 cm de profundidade em cinco pontos diferentes no aterro sanitário de Cuiabá, MT. Em laboratório estas foram misturadas obtendo assim uma amostra composta mais representativa do solo contaminado. Para o isolamento das bactérias optou-se pela técnica da diluição em série utilizando solução de pirofosfato de sódio / Tween 80 para melhor recuperação dos micro-organismos. 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 a 35°C) foram selecionadas aquelas colônias que visualmente possuíam características diferentes. A técnica de esgotamento em estrias foi utilizada para obtenção das culturas puras.

TESTES DE TOLERÂNCIA À METAIS PESADOS

Os testes de tolerância aos metais pesados Pb^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} e Cr^{6+} foram efetuados por meio das curvas de crescimento de cada linhagem em caldo nutriente com diferentes concentrações destes metais (Tabela 1). A partir de suspensões bacterianas de cada linhagem padronizadas a 0,8 de absorbância ($\lambda = 600$ nm), 0,1 mL foi adicionado em 8 mL de caldo nutriente/metal pesado. Duplicatas foram efetuadas para cada concentração do metal. As leituras de absorbância ($\lambda = 600$ nm) de cada amostra para verificar o crescimento ocorreram a cada 12 horas durante 72h.

Tabela 1: Concentrações dos metais pesados utilizados nos testes de tolerância pelas bactérias.

Composto metálico utilizado	Concentrações estudadas do composto metálico (mg/L)	Concentração equivalente do íon metálico (mg/L)
PbCl₂	10,0	7,45
	50,0	37,25
	100,0	74,50
NiSO₄	10,0	3,79
	50,0	18,96
	100,0	37,93
HgCl₂	10,0	7,39
	50,0	36,94
	100,0	73,88
K₂Cr₂O₇	50,0	17,68
	100,0	35,35
	200,0	70,70

RESULTADOS

A Tabela 2 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 2: Caracterização das células bacterianas isoladas do solo do aterro sanitário de Cuiabá, MT, 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

A Figura 1 apresenta os resultados do crescimento dos isolados bacterianos em caldo nutriente contendo HgCl₂. Verifica-se que nas concentrações 50,0 e 100,0 mg/L de HgCl₂, equivalentes a 36,94 e 73,88 mg/L de Hg²⁺, não houve crescimento das bactérias estudadas ou este foi irrisório. Já na concentração 10,0 mg/L de HgCl₂ (7,39 mg/L de Hg²⁺) verificaram-se crescimentos para as linhagens 5, 7, 12, 13 e 16 semelhantes aos crescimentos dos respectivos controles, ou seja, no caldo nutriente que não recebeu o metal. As linhagens 3 e 9 não apresentou crescimento significativo na concentração 10,0 mg/L de HgCl₂.

Em aterros sanitários a contaminação por mercúrio é principalmente devido a produtos utilizados nos domicílios, como lâmpadas fluorescentes, baterias e termômetros (XIAOLI et al. 2012). Dessa forma, a microbiota local pode estar adaptada a tal condição e contribuir para a detoxificação deste metal.

Alguns trabalhos têm destacado a importância do grau de contaminação de vários ambientes por mercúrio para a resistência dos micro-organismos a este metal. Nakamura et al. (1986) isolaram bactérias de sedimentos de duas localidades na Baía de Minamata, Japão, contaminados por mercúrio sendo uma com concentração média deste metal de 1,0 mg/kg de sedimento e outra com concentrações que variaram de 27,4 a 45,8 mg/kg. Os autores verificaram neste estudo que quanto maior a concentração de mercúrio no sedimento maior a porcentagem de bactérias isoladas resistentes ao Hg²⁺. Setenta e cinco por cento das 147 linhagens resistentes ao mercúrio isoladas da localidade que apresentou maior grau de contaminação apresentaram valores de

concentração mínima inibitória (MIC) para o mercúrio entre 50,0 e 100,0 mg/L, enquanto que, somente 5% das 82 linhagens isoladas da localidade com menor concentração apresentaram as mesmas variações de MIC. A MIC é a menor concentração do metal responsável por inibir completamente o crescimento bacteriano.

Ranjard et al. (1997) estudaram o impacto do mercúrio na comunidade bacteriana de quatro tipos de solos por meio de uma contaminação simulada por Hg^{2+} (10,0 mg/kg de solo). Após 30 dias do início do experimento foi verificado que não houve alteração estatisticamente significativa na comunidade de bactérias heterotróficas viáveis mas o número de bactérias resistentes ao mercúrio aumentou significativamente revelando que ocorreu uma adaptação da comunidade bacteriana em um curto espaço de tempo. Zahoor e Rehman (2009) isolaram duas linhagens bacterianas, *Bacillus* sp. JDM-2-1 e *Staphylococcus capititis*, de efluentes industriais e estudaram suas capacidades de tolerar diferentes metais pesados dentre eles o Hg^{2+} . Ambas as linhagens resistiram a concentração de 50,0 mg/L de Hg^{2+} . Este valor foi superior àquele encontrado neste estudo, ou seja, apenas 7,39 mg/L de Hg^{2+} foram toleradas por cinco das sete linhagens bacterianas estudadas.

Em relação ao Pb^{2+} , os resultados das tolerâncias das linhagens bacterianas são apresentados na Figura 2. Todas as bactérias toleraram a concentração máxima estudada de $PbCl_2$ (100 mg/L), equivalente a 74,50 mg/L de Pb^{2+} , sendo observado ainda alguns casos em que o crescimento bacteriano foi superior no meio que continha o metal quando comparado ao meio que não o possuía. Tal efeito também foi verificado por Guo et al. (2010) durante o estudo da biorremediação de metais pesados pela bactéria endofítica *Bacillus* sp. L14, sendo verificado o estímulo do crescimento bacteriano em meios contendo Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Cr^{6+} nas concentrações 10 e 100 mg/L. Este efeito em que uma resposta biológica favorável ocorre decorrente da exposição a alguma substância perigosa, denominado hormese, foi verificado para todas as linhagens aqui estudadas que cresceram na presença do chumbo. Novos testes são necessários com estas bactérias para avaliar a MIC frente ao Pb^{2+} . Na literatura científica, bactérias que toleraram até 800 mg/L de Pb^{2+} tem sido relatadas (ZAHOOR e REHMAN, 2009).

A Figura 3 apresenta as curvas de crescimentos das bactérias nas diferentes concentrações estudadas de $K_2Cr_2O_7$. Verifica-se que a bactéria 3 não apresentou crescimento na concentração de 200 mg/L e mesmo nas demais concentrações houve pequeno crescimento somente no tempo 60h, mas que regrediu após 72h. Da mesma forma, a bactéria 16 não teve crescimento na maior concentração e houve pouco crescimento nas demais. As linhagens 5 e 12 apresentaram crescimento exponencial em todas as concentrações de $K_2Cr_2O_7$, que se assemelharam ao crescimento observado no meio sem metal, 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 e 13 com exceção para concentração 200 mg/L. A bactéria *Bacillus* sp.ev3 foi isolada por Rehman et al. (2008) de águas residuárias contaminadas por metais pesados e esta apresentou capacidade de tolerar até 4800 mg/L de cromo hexavalente. 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).

Na Figura 4 as curvas de crescimento das bactérias na presença de Ni^{2+} demonstraram que a linhagem 3 não tolerou a concentração mínima utilizada (10 mg/L de $NiSO_4$ o que corresponde a 3,79 mg/L de Ni^{2+}) e a linhagem 13 apresentou pouco crescimento após 72h nos meios contendo o Ni^{2+} . As bactérias 5, 7 e 12 tiveram o crescimento reduzido à medida que a concentração deste metal aumentou. A linhagem 16 apresentou crescimento somente no meio que continha a menor concentração de Ni^{2+} além do meio sem metal (controle). Destaca-se a linhagem 9 que teve maior crescimento na concentração 10,0 mg/L de $NiSO_4$, crescimento este maior inclusive do que aquele observado no meio sem o metal. Alguns estudos relataram tolerância bacteriana a maiores concentrações de Ni^{2+} quando comparadas àquelas utilizadas neste estudo: 880 mg/L (ABOU-SHANAB et al. 2007) e 4000 mg/L (ZAHOOR e REHMAN, 2009). Tais bactérias foram isoladas de ambiente poluído por níquel.

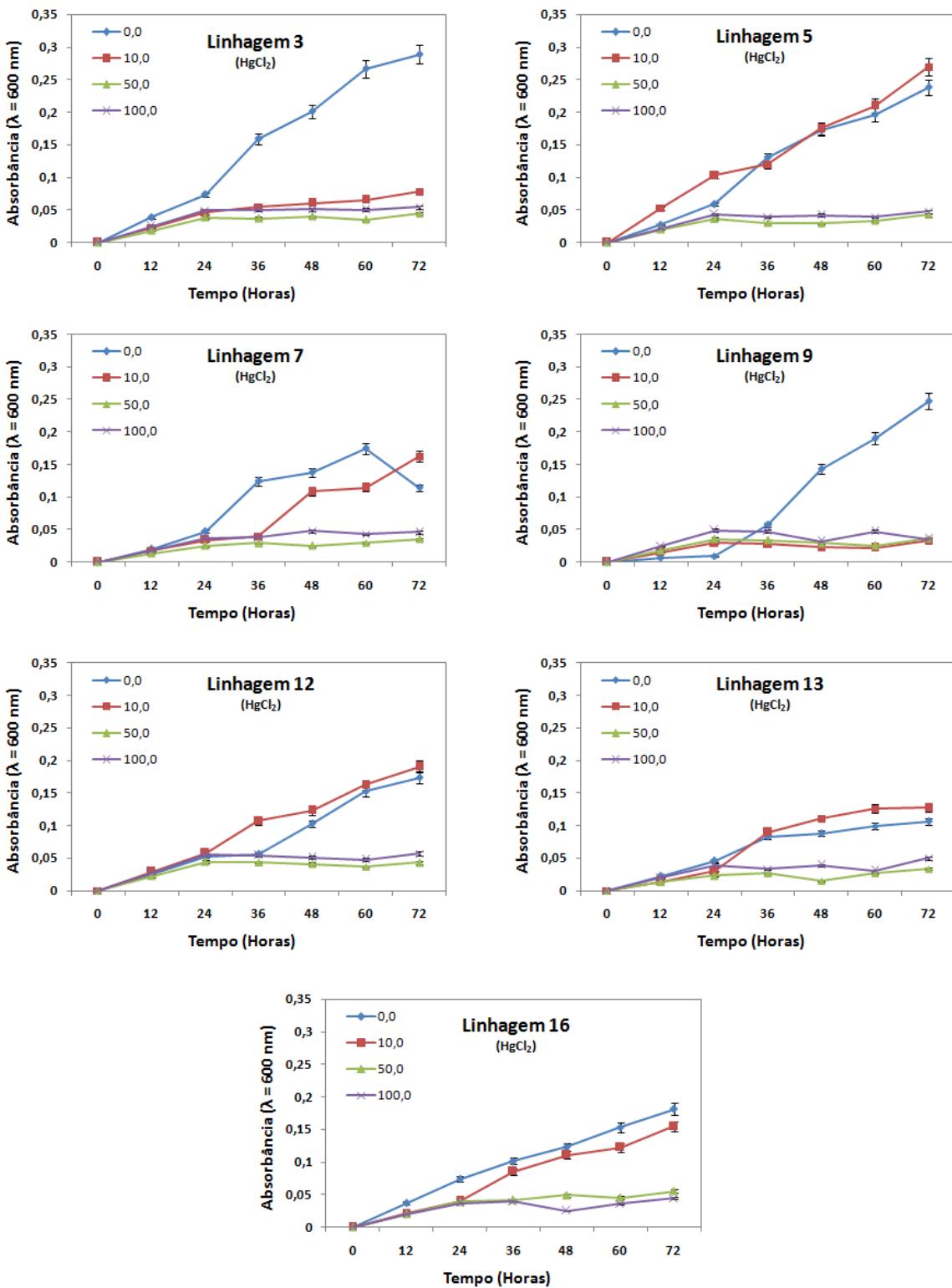


Figura 1: Curva de crescimento dos isolados bacterianos frente às diferentes concentrações (mg/L) de HgCl_2 (os dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

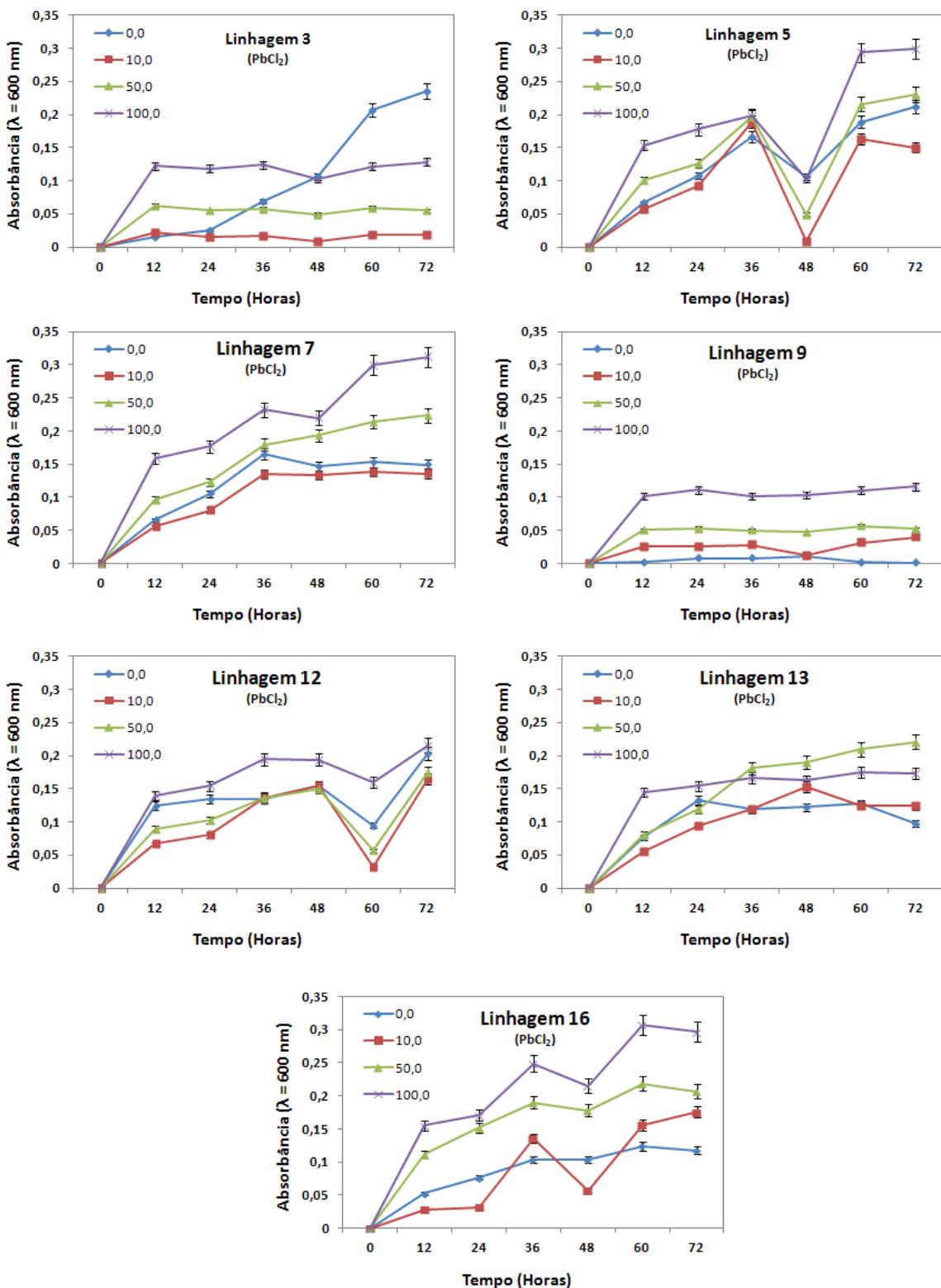


Figura 2: Curva de crescimento dos isolados bacterianos frente às diferentes concentrações (mg/L) de PbCl_2 (os dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

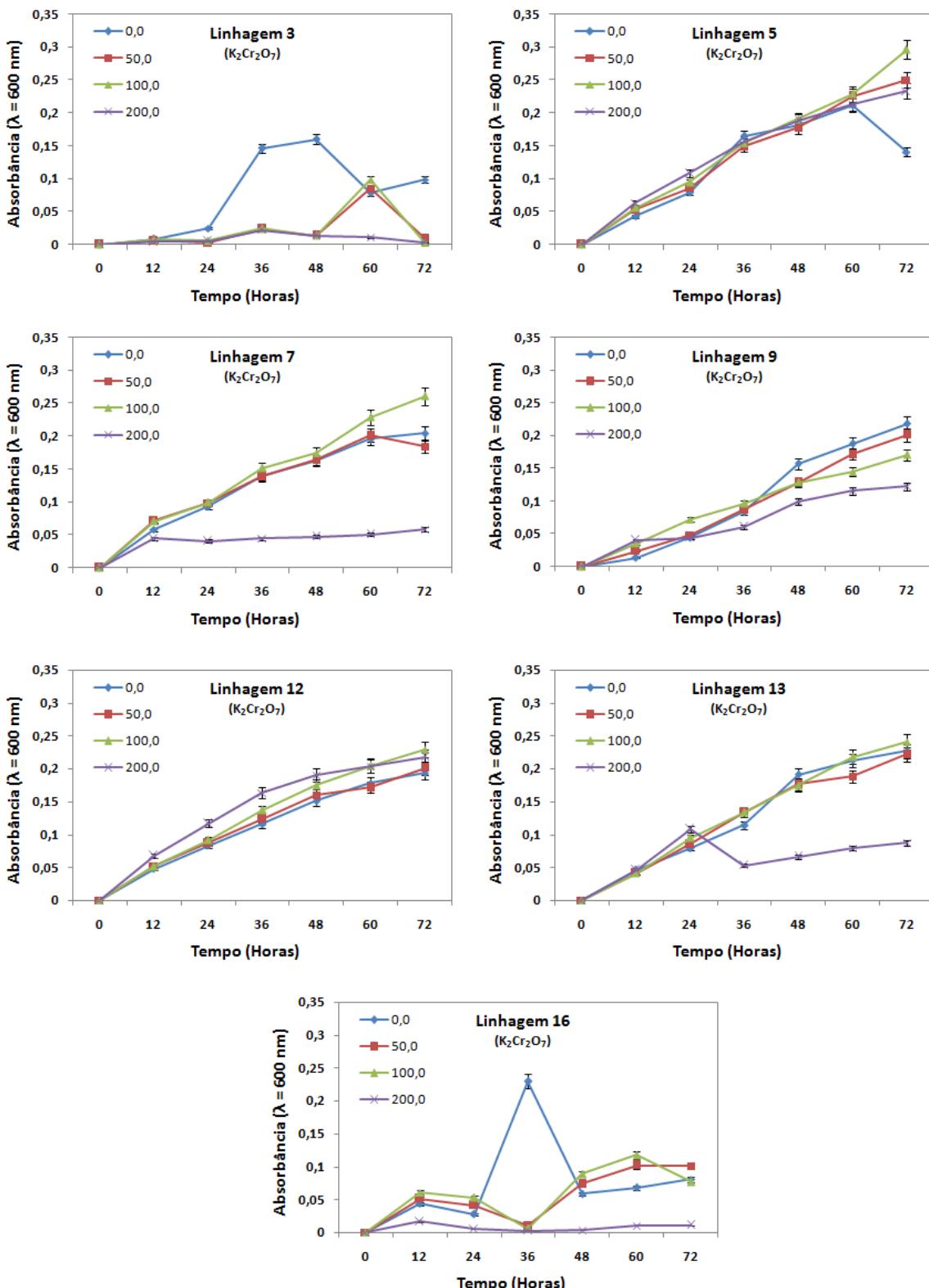


Figura 3: Curva de crescimento dos isolados bacterianos frente às diferentes concentrações (mg/L) de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (os dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

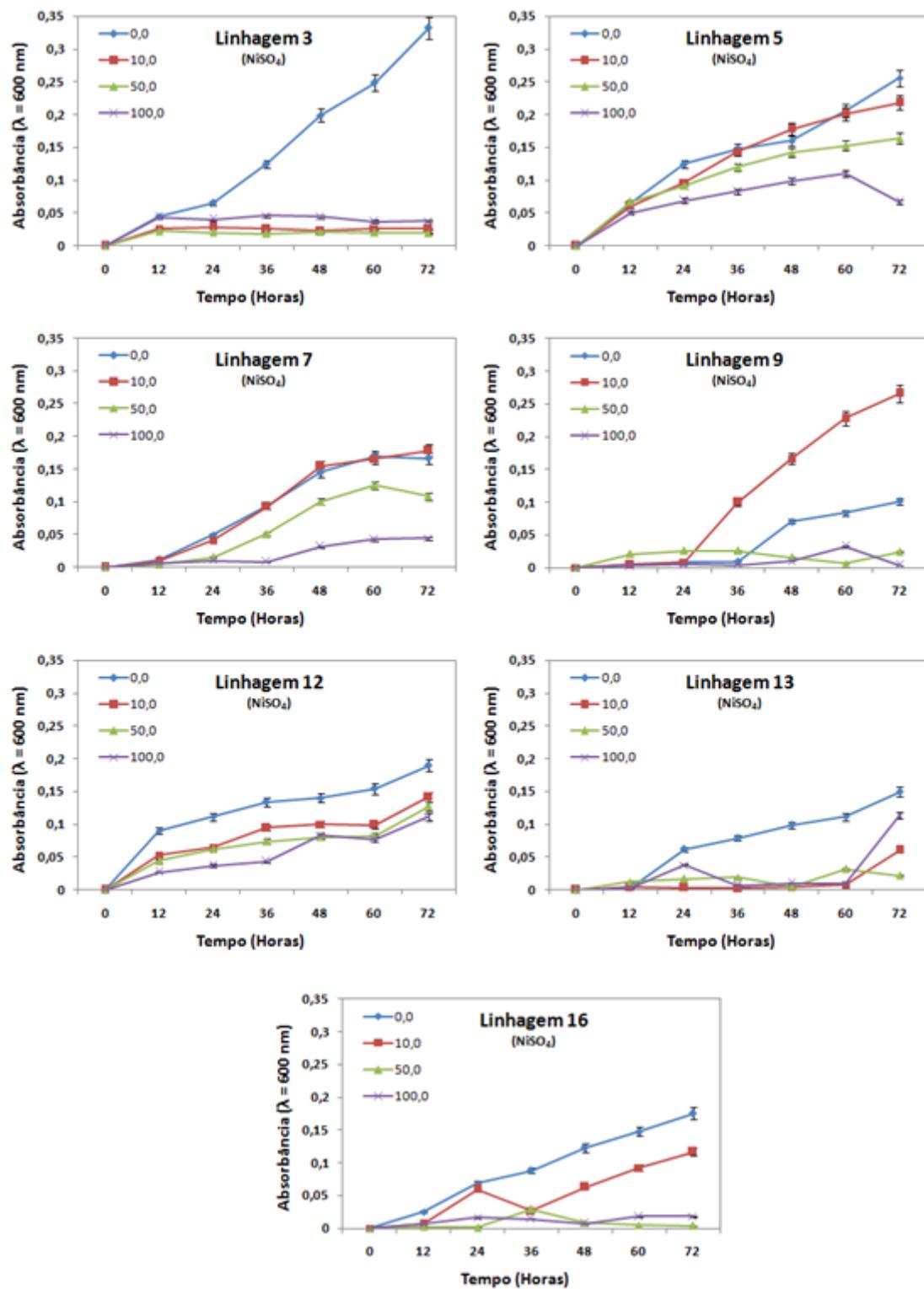


Figura 4: Curva de crescimento dos isolados bacterianos frente às diferentes concentrações (mg/L) de NiSO_4 (os dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo é possível indicar as seguintes conclusões: (i) o fenômeno hormese, apresentado pelas linhagens bacterianas, foi induzido pelo Pb^{2+} , e há a necessidade de novos estudos de tolerância em concentrações maiores deste metal do que aquelas aqui avaliadas; (ii) as concentrações toleradas de Hg^{2+} e Ni^{2+} pelas linhagens bacterianas são menores do que aquelas relatadas na literatura científica, dificultando sua aplicação em processos biorremediativos contendo estes metais; (iii) as linhagens 5 e 12 toleraram até 200 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ sendo necessários estudos em maiores concentrações e a verificação da capacidade das mesmas em reduzir o Cr^{6+} para Cr^{3+} para possíveis aplicações biorremediativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-SHANAB, R. A. I.; VAN BERKUM, P.; ANGLE J. S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v.68, p.360–367, 2007.
2. BRITO-PELEGRINI, N. N.; PATERNIANI, J. E. S.; BROTA, G. A.; SANTOS, E. M.; SILVA, N. B.; PELEGRINI, R. T. ensaios biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratado por processo fotoquímico. **Minerva**, v.6, n.3, p.219-228, 2009.
3. CHRISTENSEN, T. H.; KJELDSTEN, P.; BJERGE, P. L.; JENSEN, D. L.; CHRISTENSEN, J. B.; BAUN, A.; ALBRECHTSEN, H. J.; HERON, G. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**, v.16, p.659–718, 2001.
4. GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – aspectos biológicos e técnicas de biorremediação de xenobióticos. **Biologia, Ciências e Desenvolvimento**, n.34, p.36-43, 2005.
5. GUO, H.; LUO, S.; CHEN, L.; XIAO, X.; XI, Q.; WEI, W.; ZENG, G.; LIU, C.; WAN, Y.; CHEN, J.; HE, Y. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. **Bioresource Technology**, v.101, p8599–8605, 2010.
6. MANCERA-LÓPEZ, M. E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; BARRERA-CORTÉS, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.61, p.151–160, 2008
7. MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. atual. e ampl. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.
8. 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.
9. NAKAMURA, K.; FUJISAKI, T.; TAMASHIRO, H. Characteristics of Hg-Resistant Bacteria Isolated from Minamata Bay Sediment. **Environmental Research**, v.40, p.58-67, 1986.
10. 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.
11. RANJARD, L.; RICHAUME, A.; JOCTEUR-MONROZIER, L.; NAZARET, S. Response of soil bacteria to $Hg^{(II)}$ in relation to soil characteristics and cell location. **FEMS Microbiology Ecology**, v.24, p.321-331, 1997.
12. 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.
13. ØYGARD, J.K.; MAGE, A.; GJENGEDAL, E.; Estimation of the mass-balance of selected metals in four sanitary landfills in Western Norway, with emphasis on the heavy metal content of the deposited waste and the leachate. **Water Resoruce**, v.38, p.2851–2858, 2004.
14. ØYGARD, J. K.; MAGE, A.; GJENGEDAL, E.; SVANE, T. Effect of an uncontrolled fire and the subsequent fire fight on the chemical composition of landfill leachate. **Waste Management**, v.25, p.712–718, 2005.
15. XIAOLI, C.; GUIXIANG, L.; XIN, Z.; YONGXIA, H.; YOUCAI, H. Complexion between mercury and humic substances from different landfill stabilization processes and its implication for the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.209–210, p.59–66, 2012.
16. ZAHOOR, A.; REHMAN, A. Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.814–820, 2009.