

I-065 – REMOÇÃO DE NÍQUEL EM SOLUÇÃO AQUOSA PELA BIOMASSA DA BACTÉRIA *MUCILAGINIBACTER SP*

Ana Carolina Moreira Araújo⁽¹⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade Católica de Brasília (UCB). Mestranda em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

Paulo Henrique Oliveira Marinho⁽²⁾

Engenheiro Ambiental e Sanitarista pela Universidade Federal do Goiás (UFG). Mestrando em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

Nora Katia Saavedra del Aquila Hoffmann⁽³⁾

Bióloga pela UNALM. Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Doutora em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Professora Associada da Escola de Engenharia Civil e Ambiental da UFG.

Endereço⁽¹⁾: Av. Universitária, nº. 1488. Setor Universitário. CEP 74605-220 -Tel: (62) 32096541 - e-mail: carol.moreirax@gmail.com

RESUMO

Países em desenvolvimento fazem maior uso de metais pesados para os processos industriais de extração e produção de produtos primários para exportação. Estes metais pesados além de apresentar um risco ambiental à fauna e a flora, também podem acarretar uma série de patologias no ser humano. As tecnologias convencionais para o tratamento de metais pesados além de serem caras não apresentam eficácia quando em baixas concentrações deste resíduo. Assim, a busca por novas tecnologias para o tratamento de água contaminada com metais pesados vem sendo comumente estudado em diversas partes do mundo, fazendo uso da biotecnologia como aliada na utilização de microrganismos para realizar este tipo de tratamento. Assim, o presente trabalho tem por objetivo analisar a biomassa do isolado *Mucilaginibacter sp.*, para a remoção de níquel em solução aquosa através do mecanismo de bioissorção. Foi realizado o crescimento bacteriano em duas fontes solúveis de níquel NiSO_4 e NiCl_2 , a quantificação da fração celular e sobrenadante de cultura foi realizada utilizando a espectrometria de absorção atômica em chamas com lâmpada para níquel e realizada a análise das isotermas de bioissorção geradas através de cálculos das equações de Langmuir e Freundlich. O isolado apresentou um crescimento expressivo quando na presença das fontes de níquel, principalmente em NiSO_4 , o possível mecanismo de bioissorção foi atestado na quantificação, que obteve um limite detectável maior na fração extracelular (sobrenadante), corroborando para a afirmativa do seu potencial biotecnológico.

PALAVRAS-CHAVE: Bioissorção, Níquel, *Mucilaginibacter*, Adsorção.

INTRODUÇÃO

Segundo o relatório anuário mineral brasileiro do DNPM (BRASIL, 2016), o níquel está entre os oito minerais que se destacam no cenário da extração minerária por corresponder a 98,5% do valor da produção comercializada da classe dos metálicos, totalizando 67,5 bilhões de reais para a economia brasileira. Ainda sobre este relatório, no Estado do Goiás as reservas de níquel correspondem a 74,78% do total do País.

O níquel é uma das principais preocupações devido aos seus maiores usos em países em desenvolvimento (JOBBY; JHA; DESAI, 2015). Este, assim como outros metais pesados, não é biodegradável e é tóxico em níveis elevados. As águas residuais que contêm níquel são originárias das indústrias de mineração, indústria de metais, aeronaves e veículos automóveis, baterias recarregáveis, indústrias químicas, galvanoplastia, pigmentos para tintas ou cerâmicas, equipamentos eletrônicos ou informáticos e etc. (VOLESKY; HOLAN, 1990; CONGEEVARAM et al., 2007).

No Brasil, segundo a Resolução CONAMA (BRASIL, 2005) nº 357, de 17 de março de 2007, a tolerância máxima para o parâmetro de níquel em todas as classes de enquadramento das águas, é de 0,025 mg/l.

Os processos convencionais de tratamento de água não são capazes de tratar metais pesados. Porém, existem algumas tecnologias que possibilitam o tratamento desses compostos. São métodos clássicos baseados na precipitação química, oxidação e redução química, troca de íons e a redução eletroquímica, utilizados para remover íons de metais pesados (AKSU; KUTSAL, 1990). No entanto, esses processos podem ser ineficazes ou extremamente caros quando as concentrações iniciais de metais pesados estão na faixa de 1–100 mg/l (HANIF et al., 2007).

Na busca por tecnologias sustentáveis para o tratamento de metais pesados em água, o uso da biotecnologia tem se mostrado de muita valia, pois além de proporcionar eficiência e baixo custo operacional, se comparados aos métodos convencionais, não gera impactos negativos ao ecossistema. Neste cenário, a biossorção vem sendo comumente estudada para estes fins.

A biossorção pode ser definida como um processo onde se utiliza biomassa vegetal ou microrganismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido (VOLESKY, 2001). Sendo um processo passivo de sequestro e concentração de metal por sítios químicos (grupos funcionais de metal como carboxila, sulfonato, fosfato, hidroxila, resíduos amina ou imino) presentes naturalmente na superfície da biomassa microbiana viva ou morta. A sorção de metal pode ser mais ou menos seletiva dependendo dos organismos usados e das condições ambientais (por exemplo, pH, salinidade) (BRANDL, 2005).

As tecnologias baseadas no uso de microrganismos devem competir com ambos, os termos operacionais e econômicos na remoção de metal existente no sistema de tratamento de água (ÖZTÜRK, 2007). A capacidade das biomassas microbianas para remover íons metálicos tem recebido considerável atenção para o desenvolvimento de uma biotecnologia eficiente, limpa e barata para o tratamento de águas residuais em concentrações de metal tão baixas quanto 1 mg/l (AL-FAKIH, 2015).

Quadro 1 – Vantagens do processo de biossorção.

| | |
|--------------------------|--|
| Custo | Geralmente baixo. A maior parte dos biossorbentes usados é proveniente de resíduos industriais e agrícolas. |
| pH | O pH da solução tem forte influência na captura de metais. No entanto, a faixa de pH de interesse industrial é larga. |
| Temperatura | Como a biomassa é inativa, a temperatura possui pequena influência no processo. |
| Armazenamento | Fácil de manter. |
| Grau de remoção do metal | Tende a ser mais alto do que em células vivas. |
| Taxa de remoção | Geralmente rápida. |
| Regeneração e reuso | Possibilidade de regeneração da biomassa, com perspectivas de reuso em vários ciclos. |
| Recuperação do poluente | Utilizando-se um efluente apropriado, a recuperação é possível. Em muitos casos soluções ácidas ou básicas mostram-se eficientes na remoção. |

Fonte: Com adaptações (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

O processo simples de adsorção dos transportadores sólidos é o principal mecanismo de fixação de muitas espécies bacterianas. A carga matriz extracelular, a sua composição e a morfologia são os principais parâmetros que influenciam essa adesão bacteriana (SONCINI; FRANCHETTI; MARCONATO, 2003).

O isolado bacteriano do gênero *Mucilaginibacter* sp., apresenta potencial biotecnológico em realizar o processo de bioacumulação das fontes solúveis de níquel (ARAÚJO et al., 2016). Este isolado tem a capacidade de produzir ácido poliglutâmico (PGA) quando na presença de estresse causado por concentrações tóxicas de níquel. O PGA é um polímero feito de unidades de repetição do aminoácido glutamato conectado por ligações peptídicas, e tem massa molecular de 1-20kDa (BAJAJ; SINGHAL, 2009; OGUNLEYE et al.,

2015). Esta biomassa de PGA pode ser utilizado pela bactéria para sequestrar metais do lado de fora da célula, podendo estar envolvido no processo de resistência a níquel.

Desta maneira, o presente trabalho tem por objetivo determinar, a partir de soluções aquosas, o potencial de utilizar a biomassa do isolado *Mucilaginibacter* sp. SAP B3, em realizar a remoção dos íons de Ni^{2+} por meio da bioissorção, com o intuito de realizar o tratamento do íon metálico na fonte aquosa. Para tal, será monitorado e verificado a influência dos fatores ambientais, tais como pH, tempo de contato, concentração inicial de íons metálicos, temperatura, dose de biomassa e taxa de agitação.

MATERIAIS E MÉTODOS

LOCAL DE ISOLAMENTODA CULTURA BACTERIANA

O microrganismo escolhido afim de se avaliar a utilização da biomassa para realizar a bioissorção de níquel, foi a bactéria do gênero *Mucilaginibacter* sp., previamente isolada de solos serpentínicos (ou ultramáficos) de uma área de mineração de níquel na região de Barro Alto – GO.

MEIOS DE CULTURA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O isolado *Mucilaginibacter* sp., foi cultivado e mantido em caldo nutritivo R2A: Caseína Ácida Hidrolisada: 0,50 g/l; Extrato de Levedura: 0,50 g/l; Peptona Proteose: 0,50 g/l; Dextrose 0,50 g/l; Amido solúvel: 0,50 g/l; Fosfato Dipotássico: 0,30 g/l; Sulfato de Magnésio: 0,024 g/l; Piruvato de Sódio: 0,30 g/l; pH Final: $7,2 \pm 0,2$, acrescido de Ágar nutriente. As células bacterianas foram mantidas em placas de Petri por arranhões e foram deixadas durante uma semana a 30 °C.

REAGENTES

Todos os produtos químicos utilizados no presente estudo foram de grau analítico. Para experiências com várias concentrações de metal, a solução de reserva foi diluída adicionalmente com ddH_2O . Para as fontes de NiSO_4 e NiCl_2 , uma solução de 1mM foi preparada e esterilizada por filtração, essa solução foi adicionada ao meio de cultura depois de autoclavado. O valor do pH de cada solução de metal de teste foi ajustado para o valor desejável com HCl 0,1 M.

ENSAIOS DE BIOSSORÇÃO

Após o crescimento em placa Petri, a biomassa bacteriana foi colhida usando espátula previamente esterilizada. Foi realizado o inóculo de 0,04 g de biomassa em solução aquosa (água ultrapura) em frascos Erlenmeyers aletados de policarbonato, a fim de evitar que o metal se associe ao vidro, de 100 ml, contendo 20 ml de solução metálica com concentração de 50 mg/l e posteriormente, encubados em um agitador durante 120 minutos a 30 °C com rotação de 180 rpm.

O efeito do pH inicial, tempo de contato, concentração inicial de íons metálicos, temperatura, dose de biomassa e a taxa de agitação na bioissorção do metal foi estudada.

Após o final de cada experiência, a amostra foi centrifugada (durante 5 min a 1000 rpm) e as concentrações de íons metálicos no sobrenadante, fração celular (*pellet*) e branco foram determinadas.

A quantidade de íons metálicos adsorvidos foi estimada como a quantidade de metal (mg) por unidade de peso seco de biomassa (g) usando a seguinte equação:

$$q = \frac{V(C_i - C_f)}{M} \quad \text{equação (1)}$$

Onde,

V = volume da solução metálica (L);

C_i = é a concentração inicial de metal (mg/l);

C_f = é a concentração final/residual (mg/l);

M = é a quantidade de biomassa (g).

ANÁLISE DO ÍON METÁLICO

Para quantificação do íon metálico no sobrenadante do meio de bioadsorção, foi preparado soluções por diluição a partir do padrão 1000 ppm (Fluka) para concentrações entre 0,4 a 5 ppm utilizando-se solução de ácido nítrico 0,1 molL⁻¹ como solvente. As medidas de absorbância foram obtidas com o Flame Atomic Absorption Spectrometry - FAAS (Varian FS200) com lâmpada para níquel. As medidas foram feitas em triplicata.

A amostra foi centrifugada para separação das frações por 30 minutos a 11.000rpm. A seguir, a amostra de sobrenadante, foi filtrada em sistema de filtração com membrana de polietersulfona (PES) e poro de 0,2 µm. A todos os frascos foi adicionado ácido nítrico concentrado a proporção 1:1000 v/v, a fim de evitar associação do metal no frasco (de plástico) em que foi mantido a 4 °C até a quantificação.

Os volumes das amostras foram reduzidos até aproximadamente 5 mL em chapa aquecedora, controlando-se a temperatura para que o líquido não entrasse em ebulição. Cada solução foi cuidadosamente transferida para balões volumétricos de 5 mL e o volume foi ajustado com água ultrapura.

O conteúdo de cada balão volumétrico foi transferido para os vesels do micro-ondas analítico (Titan MPS Perkin Elmer) e foi adicionado 10 mL de água régia recém preparada (HCl:HNO₃ 1:1). Os ácidos utilizados foram previamente destilados em destilador apropriado (Destillacid).

A digestão no micro-ondas foi conduzida seguindo a seguinte rampa de aquecimento: 1º) 160 °C / 30 Bar / 5 min (hold); 2º) 190 °C / 30 Bar / 1 min / 10 min; 3º) 50 °C / 30 Bar / 1 min / 10 min; 4º) 50 °C / 0 Bar / 0 min / 0 min. Esperou-se 20 a 30 minutos para que o sistema se resfriasse.

Após a digestão por micro-ondas a amostra foi transferida para balões volumétricos 25 mL e o volume completado com água ultrapura. Finalmente cada solução foi armazenada em frasco plástico e levada para realização da leitura de absorbância no FAAS (Varian FS200).

ANÁLISE DAS ISOTERMS DE BIOSSORÇÃO

São vários os modelos matemáticos utilizados para expressar quantitativamente a relação entre a adsorção e a concentração de soluto. Os modelos mais utilizados são os modelos das isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich (RATHINAM et al., 2010), que descrevem adequadamente esse equilíbrio. A isoterma de Langmuir foi então obtida ao traçar os valores da capacidade de bioadsorção (q_e) em relação à concentração de metal residual (C_f) em solução. A equação de Langmuir é dada linearmente por (FOO; HAMEED, 2010):

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{q_{\max} b} \right) \left(\frac{1}{C_f} \right) + \left(\frac{1}{q_{\max}} \right) \quad \text{equação (2)}$$

Onde,

q_e = metal adsorvido no bioadsorvente (mg/g) no equilíbrio;

q_{\max} = quantidade máxima possível de metal adsorvido por unidade de peso de bioadsorvente;

C_f = concentração residual do metal (mg/l) na solução;

b = constante de equilíbrio relacionada à afinidade dos locais de ligação para os metais.

A equação linearizada de Freundlich é dada por (FOO; HAMEED, 2010):

$$\log q_e = \left(\frac{1}{n} \right) \log C_f + \log K_f \quad \text{equação (3)}$$

Onde,

q_e = metal adsorvido no bioadsorvente (mg/g) no equilíbrio;

C_f = concentração residual do metal (mg/l) na solução;

K_f = constante empírica que fornece uma indicação da intensidade da adsorção;

n = constante de adsorção de Freundlich.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os valores apresentados no estudo foram realizadas em triplicada e expressos como médias \pm desvio padrão. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o Microsoft Excel versão Office Plus 2013 (Microsoft Cooperation, EUA). Onde foi possível avaliar se o efeito e a interação dos fatores investigados foram significativos em relação ao desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado *Mucilaginibacter* sp., mostrou um desenvolvimento na produção de PGA maior em meios que continham a fonte NiSO_4 do que NiCl_2 . Na presença de NiSO_4 obteve-se um maior crescimento nas concentrações de 0,5 e 1 mmol/L do que a fonte sem níquel (0 mmol/L). Observou-se também um crescimento bacteriano gradual das concentrações de 2 e 4 mmol/L, apresentando uma fase Lag, fase em que a atividade bacteriana não é detectada, mais longa do que na presença do cloreto.

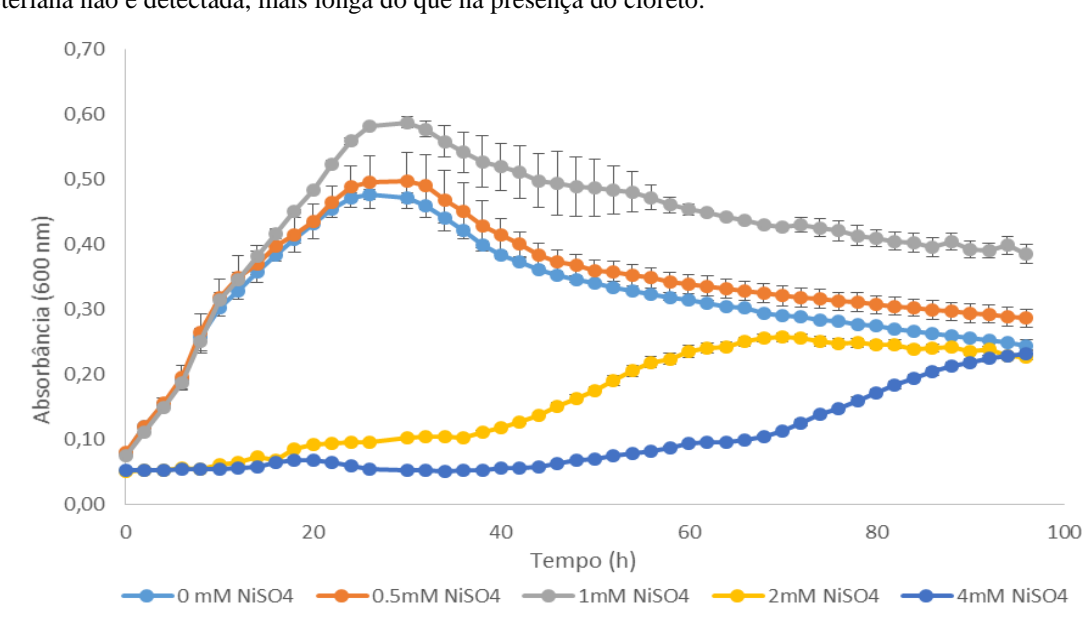


Figura 1 – Curva de crescimento em erlenmeyers aletados de policarbonato do isolado *Mucilaginibacter* sp., na fonte de níquel NiO_4 . As barras de erro mostram o desvio padrão das médias.

Na presença de NiCl_2 obteve-se um crescimento nas concentrações de 1 e 2 mmol/L, o que é igual ao crescimento sem a fonte de níquel (0 mmol/L). Observou-se um crescimento representativo nesta fonte apesar do cloreto ser mais tóxico em relação ao sulfato.

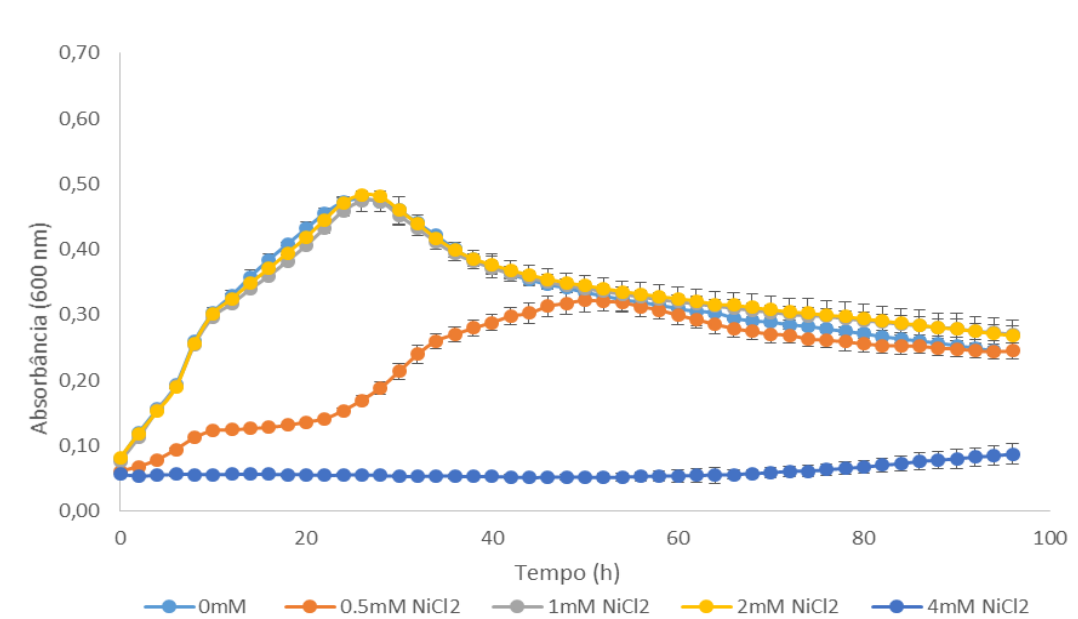


Figura 2 – Curva de crescimento em erlenmeyers aletados de policarbonato do isolado *Mucilaginibacter* sp., na fonte de níquel NiCl_2 . As barras de erro mostram o desvio padrão das médias.

Como resultado da quantificação para a fonte de NiSO_4 , temos para o isolado *Mucilaginibacter* sp., que nas frações celular (*pellet*), sobrenadante e lavagem nas concentrações de 1, 2 e 4 mmol/L, obtiveram uma quantidade detectável de níquel acima do limite de detecção, constatando que a biomassa produzida pelo isolado possui uma grande capacidade de aderir e/ou absorver a espécie metálica em solução.

Tabela 1- Quantificação de NiSO_4 nas frações *pellet*, sobrenadante e branco, crescidos nas concentrações de 0, 1, 2 e 4 mmol/L, para o isolado *Mucilaginibacter* sp.

| Concentração de níquel em (mmol/L) | | 0 | 1 | 2 | 4 |
|------------------------------------|---------------|------------------------------|------|------|----|
| Isolado | Fração | Concentração de níquel (ppm) | | | |
| | <i>Pellet</i> | <LD | 0,81 | 0,87 | 2 |
| <i>Mucilaginibacter</i> sp. | Sobrenadante | <LD | >5 | >5 | >5 |
| | Branco | <LD | >5 | >5 | >5 |

*LD: Limite de detecção.

O resultado da quantificação de NiCl_2 bem como os resultados das análises das isothermas de bioadsorção não foram concluídos à tempo para apresentação final deste trabalho.

CONCLUSÃO

Apesar das análises das isothermas de bioadsorção não terem sido concluídas, tudo indica que o isolado *Mucilaginibacter* sp., possui grande potencial para realizar o procedimento proposto do tratamento de uma solução aquosa pelo mecanismo de bioadsorção. O fato do seu metabolismo celular possuir mecanismo de resistência que tolera e se beneficia com a presença do níquel, faz com que este sobreviva a situações de estresse causado pelo metal. O possível mecanismo de bioadsorção é atestado na quantificação, que obteve um limite detectável maior na fração extracelular (sobrenadante), corroborando para a afirmativa do seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKSU, Z., KUTSAL, T. A comparative study for biosorption characteristics of heavy metals ions with *C. vulgaris*. *Environmental Technology*, v. 11, n. 10, p. 979-987, 1990.
2. AL-FAKIH, A. A. Biosorption of Ni^{2+} and Cd^{2+} from Aqueous Solutions Using NaOH-Treated Biomass of *Eupenicillium ludwigii*: Equilibrium and Mechanistic Studies. *Open journal of Applied Sciences*, 5:376-392, 2015.
3. ARAÚJO, A. C. M., COSTA, F. S., ALCANFOR, S. K. B., BARRETO, C. C. Avaliação do potencial para biomineração de bactérias isoladas de área de mineração. In: 22º Congresso de IC da UnB 13º do Distrito Federal, 2016, Brasília. Anais do 22º Congresso de IC da UnB e 13º do Distrito Federal. Brasília, 2016. v. 1.
4. BAJAJ, I. B., SINGHAL, R. S. Enhanced production of poly (gamma-glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 159, n. 1, p. 133-41, 2009.
5. BRANDL, H. Metal-Microbe-Interactions and their biotechnological applications for mineral waste treatment. Anais do 7th World Congress on Recovery, Recycling and Re-integration, versão digital, Beijin, China, 2005.
6. BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Anuário Mineral Brasileiro: Principais Substâncias Metálicas. Brasília, DF: DNPM, 2016.
7. BRASIL. Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional.
8. CONGEEVARAM, S., DHANARANI, S., PARK, J., DEXILIN, M. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials*, 146:270-277, 2007.
9. FOO, K. Y., HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*. 156:2-10, 2010.
10. HANIF, M. A., NADEEM, R., BHATTI, H. N., AHMAD, N. R., ANSARI, T. M. Nickel biosorption by *Cassia fistula* (Golden shower) biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 139:345-355, 2007.
11. JOBBY, R., JHA, P., DESAI, N. *Sinorhizobium*, a potential organism for bioremediation of nickel. *International Journal of Advanced Research*, vol. 3, p. 706-717, 2015.
12. OGUNLEYE, A., BHAT, A., IRORE, V. U., HILL, D., WILLIAMS, C., RADECKA, I. Poly-gamma-glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*, v. 161, n. pt 1, p. 1-17, 2015.
13. ÖZTÜRK, A. Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus Thuringiensis*. *Journal of Hazardous Materials*, 147:518-23, 2007.
14. RATHINAM, A., MAHARSHI, B., JANARDHANAN, S. K., JONNALAGADDA, R. R., NAIR, B. U. Biosorption of cadmium metal ion from simulated wastewaters using *Hypnea valentiae* biomass: A kinetic and thermodynamic study. *Bioresource Technology*, 101:1466-1470, 2010.
15. SONCINI JR., G., FRANCHETTI S. M. M., MARCONATO, J. C. Arquitetura e relevância de diversos biofilmes fortemente aderidos a uma superfície de poliéster úmida. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 105-107, 2003.
16. VIJAYARAGHAVAN, K., YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, v. 26, n. 3, p. 266-91, 2008.
17. VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, v. 59, p. 203-216, 2001.
18. VOLESKY, B., HOLAN, Z. R. Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnology Progress*, 1995, vol. 11, n. 3, p. 235-250, 1990.