



EFEITO DE SUBSTÂNCIA POLIMÉRICA EXTRACELULAR (EPS) NO CULTIVO DE CONSÓRCIO MICROBIANO EM SISTEMA CO-CONTAMINADO COM GASOLINA E METAIS PESADOS

Amanda Pereira Franco

João Marcelo Maia Melachus

Leonardo Gama dos Santos

Maristela de Freitas Vieira

Raquel Gama dos Santos da Costa

Projeto Final de Curso

Orientadoras:

Prof.^a Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.

Paula Salles de Oliveira Martins, M. Sc.

Outubro de 2006

**EFEITO DE SUBSTÂNCIA POLIMÉRICA
EXTRACELULAR (EPS) NO CULTIVO DE CONSÓRCIO
MICROBIANO EM SISTEMA CO-CONTAMINADO COM
GASOLINA E METAIS PESADOS**

Amanda Pereira Franco

João Marcelo Maia Melachus

Leonardo Gama dos Santos

Maristela de Freitas Vieira

Raquel Gama dos Santos da Costa

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado por:

Alexandre de Castro Leiras Gomes, D. Sc.

Andréa Medeiros Salgado, D. Sc.

Elioni Maria de A. Nicolaiewsky, D. Sc.

Orientado por:

Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.

Paula Salles de Oliveira Martins, M. Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Outubro de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

**Franco, Amanda P.; Melachus, João M.M.; Santos, Leonardo G.; Vieira, Maristela F.;
Costa, Raquel G.S.**

Efeito de substância polimérica extracelular (EPS) no cultivo de consórcio microbiano em sistema co-contaminado com gasolina e metais pesados/ Franco, Amanda P.; Melachus, João M.M.; Santos, Leonardo G.; Vieira, Maristela F.; Costa, Raquel G.S. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2006.

Projeto final (Graduação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2006. Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Paula Salles de Oliveira Martins.

1- Gasolina; 2- Biossurfactante; 3- Metais; 4- Biodegradação.

I- Título

II- Projeto final (Graduação) – UFRJ/EQ

*"Vivemos numa época perigosa
O homem domina a natureza antes que
tenha aprendido a dominar-se a si mesmo"*

AGRADECIMENTOS

À Professora Selma Gomes Ferreira Leite e Paula Salles de Oliveira Martins por terem colaborado nos orientando nesse trabalho.

Aos demais professores do curso pelos conhecimentos transmitidos durante toda graduação.

Aos nossos queridos e inseparáveis familiares que se privaram, em constantes momentos, da nossa companhia, mas que foram verdadeiros incentivadores de mais essa vitória em nossas vidas.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

EFEITO DE SUBSTÂNCIA POLIMÉRICA EXTRACELULAR (EPS) NO CULTIVO DE CONSÓRCIO MICROBIANO EM SISTEMA CO-CONTAMINADO COM GASOLINA E METAIS PESADOS

Amanda Pereira Franco

João Marcelo Maia Melachus

Leonardo Gama dos Santos

Maristela de Freitas Vieira

Raquel Gama dos Santos da Costa

Outubro, 2006

Orientadores: Prof.^a Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Paula Salles de Oliveira Martins, M. Sc.

As indústrias do petróleo lidam freqüentemente com problemas de poluição ambiental. Entre os combustíveis líquidos, o mais freqüente em derramamento é a gasolina, pois os postos de abastecimento de automóveis geralmente são as principais fontes de vazamento para o solo. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de tratamento das áreas contaminadas por gasolina e a biorremediação tem se mostrado uma das técnicas que apresentam melhor custo-benefício. Metais pesados geralmente estão presentes em derramamentos de combustíveis e vários estudos já comprovaram os efeitos danosos destas substâncias para processos microbiológicos e microrganismos do solo. Este trabalho discute a influência dos metais pesados na biodegradação da gasolina. Foi utilizada substância polimérica extracelular (EPS) capaz de adsorver metais pesados de modo a promover uma melhoria na biodegradação de sistema co-contaminado. O consórcio microbiano foi isolado do solo sem indícios de contaminação, para que se avaliasse a biodegradação na forma mais próxima possível de um caso real. Tanto glicose quanto gasolina foram utilizados na propagação dos mesmos. Foi realizada quantificação de proteína (Método LOWRY) e glicose (Método glicose-oxidase) dos diversos experimentos. Experimentos realizados demonstraram que sistemas contendo metais pesados influenciaram negativamente o crescimento microbiológico. Foi observado também que o uso de biossurfactantes facilitaram o crescimento do consórcio no sistema co-contaminado com metais pesados e gasolina.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| CAPÍTULO 2. OBJETIVOS | 3 |
| CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| CAPÍTULO 4. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 4.1. Inoculação | 17 |
| 4.1.1. <i>Preparo do Meio Mineral</i> | 17 |
| 4.1.2. <i>Propagação do Consórcio</i> | 17 |
| 4.1.3. <i>Preparo do Inóculo</i> | 18 |
| 4.1.4. <i>Experimentos</i> | 18 |
| 4.2. Amostragem | 19 |
| 4.3. Métodos Analíticos | 19 |
| 4.3.1. <i>Quantificação da proteína</i> | 19 |
| 4.3.2. <i>Quantificação da glicose</i> | 20 |
| CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 21 |
| 5.1. Curva Padrão de BSA | 21 |
| 5.2. Comportamento do Consórcio em Relação à Fonte de Carbono Disponível | 22 |
| 5.3. Experimentos com Glicose como Única Fonte de Carbono, na presença ou não de metais | 25 |
| 5.4. Experimentos com Glicose e Gasolina como Fonte de Carbono, na presença ou não de metais | 28 |
| 5.5. Experimentos com Gasolina como Única Fonte de Carbono | 30 |
| CAPÍTULO 6. CONCLUSÃO | 33 |
| CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A indústria do petróleo possui grande potencial de contaminação de solos, águas subterrâneas e corpos hídricos em suas operações de rotina. Atividades de extração, transporte e armazenamento de petróleo e combustíveis derivados são fontes críticas de acidentes ambientais. Derrame de óleo, vazamento de tanques e acidentes no transporte de combustíveis são freqüentes, apresentando um grande problema para a sociedade e o meio ambiente.

Entre os combustíveis líquidos, o mais freqüente em derramamentos é a gasolina, porque os postos de abastecimento de automóveis geralmente são as principais fontes de vazamento para o solo. A gasolina possui vários compostos tóxicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, benzeno, tolueno, xileno, etil-benzeno e metais pesados. Destes compostos, os mais tóxicos são do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno) que são altamente carcinogênicos (provocam câncer). Por serem solúveis na água, eles podem contaminar lençóis freáticos que abastecem poços artesianos ou atingir mananciais que são usados como suprimento de água para cidades ou comunidades.

Por esses motivos, a necessidade de tratamento das áreas contaminadas por gasolina torna-se evidente. Existem hoje várias técnicas de remediação de solo como barreiras reativas, extração de gases, incineração, lavagem de solos e biorremediação. A escolha das técnicas a serem utilizadas é um processo complexo que deve levar em conta as propriedades dos contaminantes, a extensão e gravidade da contaminação, as propriedades do local, ocupação e uso da área contaminada, e a legislação ambiental vigente.

Entre as alternativas de remediação, a biorremediação tem se mostrado uma das que apresentam melhor custo-benefício. A biorremediação consiste em um processo biológico em que microrganismos ou plantas utilizam os contaminantes orgânicos como substrato para reações metabólicas, para obtenção de energia e reprodução celular, reduzindo essas substâncias a substâncias menos tóxicas, no caso ideal, reduzindo-as a CO₂ e água. Entre as suas vantagens estão o fato de ela ser, na maioria dos casos, executada na própria área de contaminação; na maioria das vezes realizada pelos microrganismos nativos do solo, sendo, assim, pouco custosa e exigindo poucas modificações na localidade onde é gerado; e menor impacto no subsolo.

Por ser realizada por organismos vivos, a biorremediação apresenta algumas limitações. Depende de condições específicas bem controladas para que os microrganismos possam sobreviver, se reproduzir e degradar os contaminantes. Entre estas condições estão: pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e aceptores de elétrons, e ausência de efeitos inibidores de elementos tóxicos.

Entre esses elementos tóxicos, os que apresentam maiores efeitos inibidores são os metais pesados. Estes metais geralmente estão presentes em derramamentos de combustíveis e diversos estudos já comprovaram os efeitos danosos destas substâncias para processos microbiológicos e microrganismos do solo.

A intensidade destes efeitos inibidores depende de diversos fatores como concentração de metais, tempo de exposição, disponibilidade dos mesmos para serem assimilados, espécie de metal e sensibilidade relativa do microrganismo ao metal. Ainda não se conhece, ao certo, os mecanismos de inibição dos microrganismos por metais, mas se considera que a espécie que apresenta toxicidade é o íon de metal livre. Por isso, a precipitação desses metais em forma de sais insolúveis, a quelação por moléculas orgânicas, a formação de complexos e adsorção destes por moléculas adsorventes são mecanismos de atenuação dos efeitos tóxicos destas substâncias.

Uma tentativa, para diminuir os efeitos inibidores dos metais pesados na biorremediação da gasolina, é o uso de substâncias poliméricas extracelulares, produzidas por consórcios ou culturas puras de microrganismos, que tem capacidade de adsorver metais. Estes produtos consistem em várias substâncias orgânicas excretadas por bactérias como polissacarídeos, ácidos urônicos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos. Embora ainda não se conheça por completo seus mecanismos, a adsorção dos metais por estas substâncias é geralmente atribuída ao grande número de grupos funcionais, carregados negativamente, presentes nelas, tais como carboxilas, fosfatos e sulfatos.

Com base nas informações pesquisadas, neste estudo foi utilizado um consórcio microbiológico para degradar a gasolina e foi avaliada a influência de metais pesados nesta degradação. Também foi utilizada uma substância polimérica extracelular produzida por uma bactéria, que é capaz de adsorver metais pesados, para avaliar se esta seria uma boa alternativa para ser usada junto com o consórcio que degrada a gasolina para realizar a biodegradação em sítios contaminados com metais pesados. A adição de glicose em alguns casos foi realizada para se avaliar a utilidade de adição de substrato para melhorar a eficiência da degradação.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Portanto, os objetivos desse estudo foram:

- Avaliar o efeito de metais pesados na biodegradação da gasolina;
- Avaliar se a presença de uma substância polimérica extracelular produzida por uma bactéria poderia melhorar a degradação da gasolina no sistema co-contaminado com metais.

CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Poluição por indústrias de petróleo:

As indústrias de petróleo lidam diariamente com problemas de poluição no meio ambiente decorrentes de vazamentos de óleos, derrames e acidentes durante a exploração, refinamento, transporte, despejo de rejeitos e operações de armazenamento de petróleo e seus derivados (ADENIYI et al., 2001). Em maio de 2002 a CETESB divulgou pela primeira vez uma lista de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Essa lista vem sendo constantemente atualizada e, após 5 atualizações, o número de áreas contaminadas em maio de 2006 era de 1664 áreas. O Gráfico 3.1 mostra a evolução das atualizações dos números de áreas contaminadas (www.cetesb.gov.sp.br).

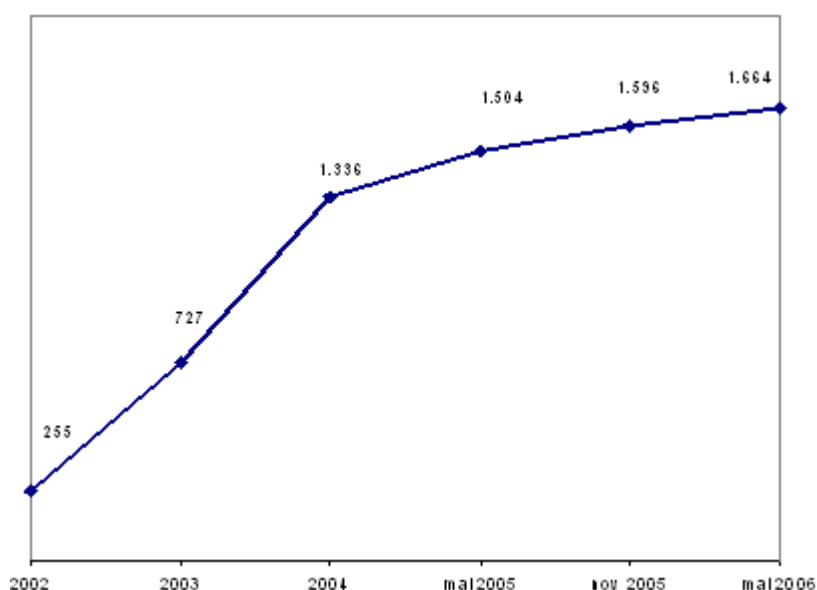


Gráfico 3.1 - Evolução das atualizações dos números de áreas contaminadas

Fonte: Adaptado do gráfico apresentado na CETESB

Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo de São Paulo (CETESB), destas áreas contaminadas, 73% foram contaminadas por postos de gasolina. O Gráfico 3.2 apresenta as principais fontes de contaminação do solo.

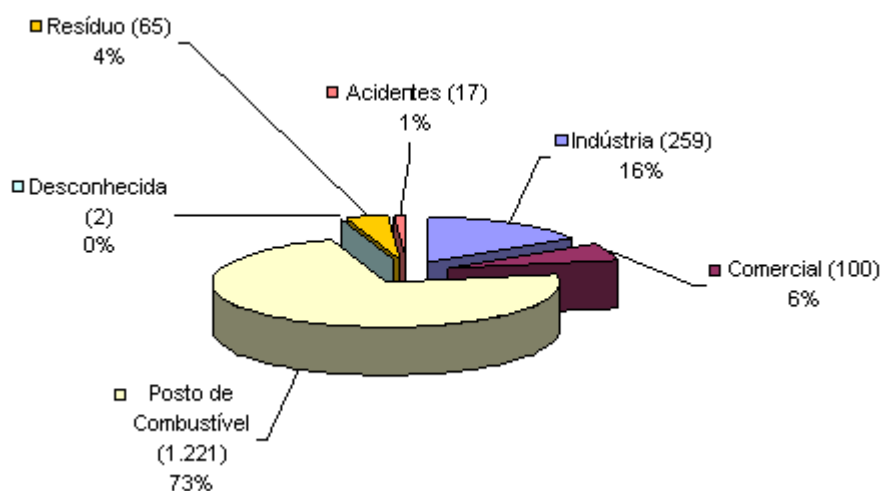


Gráfico 3.2 - Fontes de contaminação

Fonte: CETESB

Os principais contaminantes encontrados nas áreas contaminadas foram: combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais e solventes halogenados (www.cetesb.gov.sp.br).

Em um derramamento de gasolina, uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos que sejam usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. Por ser muito pouco solúvel em água, a gasolina derramada, contendo mais de uma centena de componentes, inicialmente estará presente no subsolo como líquido de fase não aquosa (NAPL). Em contato com a água subterrânea a gasolina se dissolverá parcialmente. Os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xilenos orto, meta e para, chamados compostos BTEX, são os constituintes da gasolina que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático. Estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por serem depressantes do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas. Dentre os BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico com padrão de potabilidade de 10 µg/L, segundo as normas do Ministério da Saúde, portaria ANA 518.

Remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos:

Portanto, a poluição de solos e de águas por produtos de petróleo vem merecendo cada vez mais atenção dos vários segmentos da sociedade, como daqueles responsáveis pela gestão ambiental. Estes poluentes no ambiente

representam riscos para os seres vivos, e por isso, é evidenciada a necessidade da remediação dessas substâncias para a proteção própria e dos diversos ecossistemas. (MORAIS et al., 2004)

O manuseio impróprio de produtos de petróleo é um aspecto potencial de contaminação, e estudos para tratamento dessas áreas contaminadas estão sendo cada vez mais aprofundados.

As alternativas que utilizam soluções mais naturais e com menores impactos no subsolo vêm ganhando maior destaque nos últimos anos. Porém, vale lembrar que essas soluções, devido ao maior tempo requerido na remediação, nem sempre são suficientes para atingir os objetivos do projeto e devem, na maioria dos casos, ser aplicadas em complemento a outras técnicas de remediação. As técnicas de remediação devem atender não somente às características físico-químicas dos contaminantes envolvidos como também à aplicabilidade dos mesmos nas condições hidrogeológicas específicas do sítio impactado. E isso dentro de objetivos que atendam a legislação ambiental e que sejam compatíveis com o risco que a contaminação representa. Algumas técnicas alternativas são (www.quimica.com.br):

- a) Extração de gás do solo – remove fisicamente compostos orgânicos voláteis da zona insaturada através da aplicação de um sistema de vácuo;
- b) Barreiras reativas permeáveis – barreiras que promovem a passagem das águas subterrâneas através de porções reativas que possibilitam a remediação *in situ* por processos físicos, químicos e/ou biológicos;
- c) Contenção hidráulica e Tratamento – processos físicos de extração de águas contaminadas da zona saturada e tratamento ex-situ;
- d) Tecnologias térmicas – processos térmicos *in situ* que destroem contaminantes ou possibilitam a aceleração de transferência de fase do contaminante no subsolo;
- e) Incineração – materiais escavados são incinerados para a extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis;
- f) Lavagem de solo – lavagem de solo através de fluidos apropriados promove o *stripping* e a biodegradação.

O desenvolvimento da ciência de biorremediação, como em toda outra, implicou não só a ação imediata, mas a observação de como o meio ambiente reagiria e reage a cada intervenção - maligna ou benigna - provocada pelo homem. Dentre as formas de reação, verificou-se que microrganismos, existentes em todas as situações, na busca da autopreservação, acabam por enfrentar os agentes agressores, em maior ou menor grau, degradando tais agentes, geralmente contaminantes não raros, constituindo-se numa poderosa arma de defesa ambiental, passível de ser potencializada. A esta capacidade microbiana de degradação denominou-se biodegradação, e à técnica de utilização desta capacidade para remediação ambiental chamou-se biorremediação (MARTINS et al., 2003).

A biorremediação pode ser definida (segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana) como processo de tratamento que utiliza a atividade de microrganismos para degradar substâncias tóxicas perigosas transformando-as em substâncias não ou menos tóxicas. Este processo consiste, portanto, na oxidação de poluentes orgânicos por meio da atividade biológica, normalmente, de microrganismos e plantas encontrados no solo. Os microrganismos utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono para obter energia para manutenção, crescimento e reprodução celular, através de reações metabólicas catalisadas por enzimas (MARTINS et al., 2003).

Diversas tecnologias e procedimentos para biorremediação são freqüentemente utilizados, e um número promissor de abordagens vem sendo sugerido. Algumas dessas tecnologias são para biorremediação *in situ*, na qual o contaminante é degradado no próprio sítio contaminado sem a necessidade de que o mesmo seja feito em local diferente do aporte do contaminante. A biorremediação *in situ* é baseada na estimulação do crescimento microbiano, principalmente bactérias que são inerentes ao sistema e que podem degradar os contaminantes. Quando é fornecido oxigênio (ou outro aceptor de elétrons) e nutrientes, microrganismos podem degradar um número de contaminantes, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, a dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O) em solos e lençóis freáticos. Os nutrientes adicionados são geralmente nitrogênio e fósforo quando os contaminantes são compostos basicamente de hidrocarbonetos. Adicionar fonte de carbono como nutriente irá aumentar a biomassa dos microrganismos no solo, mas pode inibir a biodegradação dos contaminantes e resultar num crescimento por diauxia (LEE et al., 2003).

A biorremediação, por ser um processo biológico, precisa de condições específicas para ocorrer. Ela depende de diversos fatores como pH, temperatura,

solubilidade dos poluentes, dentre outros. Esta remediação de poços de óleo é uma tecnologia muito empregada, porém esse processo natural é influenciado também pela presença de componentes inibidores tais como metais pesados (AL-SALEH et al., 2005). Esses poluentes afetam a atividade das enzimas presentes no solo, as quais podem ser usadas para avaliar as propriedades microbianas do solo (SHEN et al., 2005).

A contaminação por metais pesados:

A influência danosa de metais pesados em organismos vivos é conhecida há tempos. Embora fosse de se esperar que essas substâncias também apresentassem toxicidade para microrganismos e processos microbiológicos, pouco se havia estudado sobre o assunto. As primeiras observações dos efeitos de metais pesados em processos microbiológicos datam do início do século 20. Mas apenas nas décadas de 60 e 70 percebeu-se o quão severamente microrganismos e processos microbiológicos podem ser prejudicados por elevadas concentrações de metais pesados. A contaminação extrema de metais nas vizinhanças de fundições causou efeitos claramente visíveis, tais como a acumulação de profundas camadas de matéria orgânica na superfície do solo devido à inibição da atividade dos microrganismos e fauna do solo (GILLER et al., 1997).

As primeiras medidas para limitar a carga de metais no solo foram introduzidas em alguns países europeus durante os anos 70, com a intenção de proteger plantas rasteiras, animais no pasto e o homem (evitando exposição a metais através da cadeia alimentar) contra efeitos adversos da exposição aos mesmos. Apenas 20 anos mais tarde foi levado em consideração o efeito de metais pesados sobre microrganismos do solo na elaboração da legislação (GILLER et al., 1997).

Apesar da crescente evidência sobre os efeitos danosos de concentrações elevadas de metais pesados em microrganismos, é difícil quantificar seus limites de cargas e concentrações no solo. Esta dificuldade vem da enorme disparidade evidenciada entre estudos que visavam estipular concentrações limites de metais que não apresentassem efeito adverso. Os valores, destes limites, diferiram de várias ordens de grandeza entre tais estudos (GILLER et al., 1997).

Estas diferenças são resultados de vários fatores, entre eles a disponibilidade dos metais pesados, propriedades específicas do solo, sensibilidades específicas de espécies e populações microbiológicas, estrutura das comunidades, tempo de

exposição a metais, meios de exposição e diferenças metodológicas (GILLER et al., 1997).

A disponibilidade é por si só influenciada por diversos fatores. Não pode ser medida, sendo apenas analisada pelo crescimento do organismo de interesse e pela avaliação da assimilação ou da toxicidade de um metal depois deste fato (WOLT, 1994).

As propriedades do solo têm grande influência na disponibilidade dos metais pesados. O pH, por exemplo, é o fator que apresenta a maior influência devido a seus fortes efeitos na solubilidade e na especiação de metais no solo como um todo e, particularmente na fase líquida do solo. Estima-se que o aumento de pH resulte em um aumento na assimilação de metais como zinco, níquel e cádmio nessa fase (CHRISTENSEN, 1984).

Nem todos os metais, em solução, estarão disponíveis para serem assimilados. A quelação por moléculas orgânicas é outro fator que influencia a disponibilidade dos metais, já que os metais quelados não estão disponíveis para assimilação. Outro fator de importância na disponibilidade é a especiação dos metais. Geralmente se considera que o íon livre é a espécie química que é assimilada e causa toxicidade quando presente em excesso (SUNDA et al., 1978).

JIANMIN WANG e colaboradores (2002), propuseram um modelo matemático para a assimilação de metais pesados por partículas de lodo ativado como função da concentração de matéria orgânica dissolvida e do pH. Eles também verificaram que a assimilação de sete íons de metais pesados (Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II)) aumentou com o aumento do pH em condições de pH ácido ou neutro, porém a assimilação de Cu(II), Ni(II) e Co(II) decresceu com o aumento do pH na região alcalina, principalmente, devido à grande concentração de matéria orgânica dissolvida em condições de pH alto.

Quando bactérias estão presentes em colônias no solo ou protegidas por argilas, elas geralmente não são expostas à atividade da solução de equilíbrio dos metais pesados, por isso o conteúdo de argila do solo e a estrutura das comunidades também devem ser levados em consideração quando estiver sendo estimado o efeito da toxicidade de metais (GILLER et al., 1997).

Outro fator a ser levado em conta é a presença de íons interferentes. Foi descoberto que cloreto dissolve efetivamente Cd das partículas sólidas do solo para a

solução. Isto faz com que aumente a assimilação de Cd por batatas em solos com altas concentrações de cloreto. Este efeito provavelmente também deve acontecer com microrganismos, apesar de faltar estudos para comprová-lo (TILLER et al., 1994).

Mais um aspecto importante é a sensibilidade dos microrganismos a metais pesados. Espécies de microrganismos, tipos da mesma espécie e também atividades da mesma espécie podem apresentar diferenças consideráveis em suas sensibilidades à toxicidade de metais. BESLEN e colaboradores (1991) descobriram que a sensibilidade a elementos tóxicos da comunidade microbiológica responsável pela mineralização do acetato em solos sem histórico de exposição a elevadas concentrações de metais diferiu em várias ordens de grandeza entre solos de propriedades físicas e químicas similares.

Diferenças metodológicas também podem causar grandes discordâncias entre resultados. Estudos dos efeitos de metais pesados em microrganismos do solo utilizam várias abordagens as quais influenciam diretamente a resposta medida e evitam comparação com significado entre experimentos. Estudos de toxicidade de metais podem ser classificados em três grupos principais (GILLER et al., 1997):

(1) Estudos ecotoxicológicos de laboratório em que a toxicidade de diferentes metais para uma população ou processo microbiológico é estudada. Isto é feito, normalmente, adicionando metais pesados na forma de sais mais ou menos solúveis no solo e monitorando o efeito em funções particulares ou nos números de um grupo de microrganismos no solo. A abordagem é simplista, o que faz com que apresente pouca relação com a maioria dos casos da vida real de contaminação de solos, onde a concentração de metais é aumentada gradualmente ao longo de muitos anos; e a exposição a elevadas concentrações de metais é de longo prazo.

(2) Estudos ecotoxicológicos de campo, em que amostras de solos contaminados ou não contaminados são tomadas do campo e é aplicado um teste ecotoxicológico, tal como inoculação de um organismo teste e rastreamento de sua sobrevivência ou atividade no solo através do tempo.

(3) Monitoramento ambiental, onde solos de campo são amostrados do ambiente, e a população de um grupo funcional particular ou espécie é monitorada. Tais estudos podem ser subdivididos em aqueles em que uma função ou grupo de organismos é estudado em um solo que tenha sido submetido à poluição ambiental real e aqueles onde tratamentos com diferentes cargas de metais pesados foram deliberadamente aplicadas em experimentos planejados de campo.

Os estudos ecotoxicológicos de laboratório dão informação detalhada sobre a toxicidade relativa de diferentes metais. Podem ser construídas curvas de dose-resposta quando é usada uma faixa de taxas de aplicação de metais. A dose efetiva que resulta, por exemplo, em um decréscimo de 50% na resposta medida, pode ser calculada destas curvas de resposta. Os dados detalhados de toxicidade de metais que podem ser obtidos de estudos de laboratório fazem deles uma base atrativa para medir os efeitos e estabelecer limites de metais no solo (GILLER et al., 1997).

Vários outros detalhes metodológicos podem influenciar, não intencionalmente, a resposta biológica medida, assim como também, podem afetar a concentração efetiva de metais no solo. Por exemplo, diferenças no pré-tratamento do solo podem alterar a qualidade e quantidade de substratos disponíveis, o que de fato pode alterar a resposta microbiológica medida.

Outra etapa importante na avaliação da toxicidade de metais é a escolha do ensaio a ser utilizado. O ensaio seria uma função microbiológica específica que pudesse ser medida ou monitorada por técnicas de laboratório. Vários ensaios têm sido usados no estudo de toxicidade de metais para microrganismos. Os estudos de laboratório são geralmente baseados em ensaios relativamente fáceis e rápidos, tais como a atividade de certas enzimas, mineralização de carbono e nitrificação (GILLER et al., 1997).

O tempo de exposição das comunidades a metais também vai influenciar na resposta devido a sua maior adaptação. Microrganismos irão diferir em suas sensibilidades a toxicidade, e sua exposição suficiente a metais irá resultar na morte imediata de células, devido à interrupção de funções essenciais, e em mudanças nos tamanhos da população devido a mudanças na viabilidade ou habilidade competitiva. Os microrganismos com maior tolerância a metais irão sobreviver e passar suas características para as próximas gerações. O que talvez seja surpreendente é que microrganismos sujeitos a estresse de longo prazo provocado por metais, mesmo em quantidades pequenas, não sejam capazes de manter a mesma biomassa de solos não poluídos. Poder-se-ia esperar desenvolvimento de tolerância e mudanças na estrutura da comunidade para compensar a perda de populações mais sensíveis. Ao contrário, resultados de estudos ecotoxicológicos de laboratório sugerem que mudanças na estrutura da comunidade andam de mãos dadas com o decréscimo da biomassa microbiológica. Isto acontece porque os mecanismos de tolerância a metais carregam um custo energético adicional aos microrganismos. Tal custo energético pode resultar em decréscimo da quantidade de substratos disponível para o

crescimento (SILVER et al., 1989; MEHRA e WINGE, 1991; ROSS, 1993; TOMSETT, 1993; CERVANTES, 1994).

Mecanismos de tolerância são variados em bactérias e fungos e incluem: a ligação do metal a proteínas, polímeros extracelulares ou a parede celular; compartimentação dentro das células; formação de sulfetos metálicos insolúveis; decréscimo na assimilação; aumento da excreção das células e volatilização (GILLER et al., 1997).

Como foi visto acima, metais pesados em certas concentrações confinam a atividade microbiana e, portanto, podem criar problemas sérios, especialmente para as autoridades, que dependem da biorremediação como principal estratégia para aliviar a poluição. Em geral, tecnologias disponíveis para a remediação de metais nos solos são algumas vezes suscetíveis à interrupção, além de serem muito custosas e, geralmente, a total remoção dos metais não é praticável. Logo, a decisão de remediar locais contaminados por hidrocarbonetos poluídos com metais pesados deve ser baseada na avaliação de risco da extensão da inibição que os metais exercem na biorremediação dos hidrocarbonetos (AL-SALEH et al., 2005).

A contaminação por metais pesados X hidrocarbonetos

RIIS (2002) investigou a degradação de diesel por uma comunidade microbiológica de um solo poluído com metais pesados na presença de cobre, níquel, zinco, chumbo, cádmio, mercúrio e cromo, como cromato. Os experimentos foram conduzidos em alíquotas de solo e em cultivo líquido da comunidade extraída. As concentrações foram aplicadas na faixa de milimol. Enquanto as alíquotas de solo não apresentaram efeitos significativos, a degradação na cultura líquida foi crescentemente inibida por concentrações de metal mais altas. O curso da degradação em suspensão foi demonstrado pelo consumo de oxigênio. A ausência de qualquer efeito no solo foi devido à não disponibilidade de metais, e à precipitação ou adsorção ao solo no caso de adições.

Estudos realizados sugerem que o tipo de meio determina o grau e o padrão de inibição de cada metal na biodegradação e enfatiza a importância de se conciliar a toxicidade e a disponibilidade do metal (HOFFMAN et al., 2004). Chumbo, por exemplo, em certas concentrações foi reportado como inibidor da atividade microbiológica e sua presença em altas concentrações em locais contaminados por hidrocarbonetos pode prolongar a biorremediação. Mesmo em concentrações

relativamente baixas, o efeito inibitório do chumbo foi mostrado acentuadamente na presença de outros cátions.

Determinar e caracterizar a natureza de poluentes combinados é um problema de interesse atual. Embora avaliações baseadas em exposição a um único poluente permitiram adquirir conhecimentos fundamentais sobre poluentes individuais sob condições cuidadosamente controladas, eles não refletem exposições do mundo real. De fato, organismos e ecossistemas são geralmente expostos simultaneamente ou seqüencialmente a uma variedade de poluentes via múltiplas rotas de exposição. Efeitos combinados de poluentes podem ser similares, mais fortes ou mais fracos do que os efeitos esperados de exposições em separado. O efeito de poluentes combinados depende dos constituintes da mistura, e podem variar significativamente. Em solos, o efeito combinado de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos atraiu muita atenção nas décadas recentes (SHEN et al., 2005).

Uma alternativa para superar a influência dos metais pesados na biodegradação da gasolina seria a adsorção destes metais pesados por organismos vivos. A biossorção, apesar de ser definida como um processo no qual sólidos de origem natural ou seus derivados são usados na retenção de metais pesados de um ambiente aquoso, não se baseia somente no mecanismo de retenção. O processo consiste de vários mecanismos complexos que, quantitativa ou qualitativamente, diferem de acordo com as espécies usadas, a origem da biomassa e seu processamento. Esses mecanismos são principalmente: troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e o aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e espaços de rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular e membranas (VOLESKY, 1995).

Uma grande variedade de microrganismos pode se ligar a metais. Entretanto, há grandes diferenças nas respostas das espécies microbianas quando expostas a soluções metálicas. As paredes de bactérias, algas e fungos são eficientes biossorbentes metálicos, e em muitos casos a ligação inicial pode ser seguida pela deposição inorgânica de quantidades crescentes de metal. Ligações covalentes e iônicas podem estar envolvidas na biossorção, com constituintes tais como proteínas e polissacarídeos. Em várias espécies, a biossorção pode ser a maior proporção da retenção total. Isto é especialmente verdadeiro para metais pesados como chumbo, e radioativos como urânio e tório. As variações na composição das paredes celulares das células microbianas, que podem ser influenciadas pelas condições de cultura,

podem resultar em variações consideráveis na capacidade biossorbitiva e permitir algum grau de acumulação seletiva (GADD, 1990).

Os mecanismos pelos quais microrganismos removem metais de solução são:

- a) acumulação extracelular/precipitação;
- b) adsorção na superfície celular ou complexação;
- c) acumulação intracelular.

As características mais procuradas num biossorvente são capacidade de adsorção, seletividade, regenerabilidade, compatibilidade e baixo custo. Porém, raramente um adsorvente será ótimo em todos estes aspectos.

O conhecimento da estrutura química dos biossorventes é essencial para modelar e prever seus desempenhos em ligar metais em sistemas de purificação de água. A efetividade global de um biossorvente em remover metais depende também da faixa de concentração, pH da solução, cinética da reação, equipamento de adsorção e composição do efluente. A identificação dos sítios de ligação em biossorventes eficientes seria útil no processo de seleção de novos tipos de biomassa, bem como na tentativa de melhorar suas propriedades complexantes através de processos químicos ou biológicos (VOLESKY, 1996).

A contaminação e o uso de EPS

Alguns estudos têm sido realizados com substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Estas substâncias são excretadas por bactérias durante o crescimento e consistem de várias substâncias orgânicas como polissacarídeos, ácidos urônicos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos. SPAETH e WUERTZ (2000) evidenciaram que em lodo ativado estas substâncias poderiam ser provenientes do efluente ou da lise de células. No entanto, as funções exatas destes compostos ainda não foram completamente elucidadas devido a sua natureza extremamente heterogênea (GUIBAUD et al., 2004).

A adsorção dos metais é atribuída ao grande número de grupos funcionais carregados negativamente existentes nestas substâncias como carboxilas, fosfatos e sulfatos (GUIBAUD et al., 2004).

As EPS possuem massas moleculares variando em uma faixa de alguns milhares a vários milhões de Daltons. Além da sua grande habilidade de adsorção de metais, as EPS desempenham um papel importante na formação e na função de agregados microbiológicos, incluindo fenômenos de adesão, formação da estrutura da matriz, processos fisiológicos microbiológicos, tais como proteção das células contra mudanças ambientais no pH, qualidade da água, quantidade de sal e pressão hidráulica (SUTHERLAND, 1984; URBAIN et al., 1993; LIU e FANG, 2003; SPONZA, 2003).

Para se extrair as EPS, geralmente se cultiva um consórcio de bactérias (ou se retira amostras de lodo ativado de estações de tratamento) ou uma cultura pura. Quando se tem uma população suficiente, concentra-se o consórcio por centrifugação, depois o consórcio é re-suspendido em água ultra-pura e novamente centrifugado. Após esta etapa, deve-se separar as EPS das bactérias usando ultra-som e centrifugando novamente (GUIBAUD et al., 2004).

Para se determinar a capacidade complexante das EPS, geralmente são usadas isotermas de adsorção em reatores de batelada. No entanto, as EPS podem ser parcialmente dissolvidas e então serem removidas da solução durante a centrifugação e filtração. A EPS de menor peso molecular que são dissolvidas são capazes de adsorver uma quantidade significativa de metais o que leva a uma subestimação da capacidade de adsorção das EPS (GUIBAUD et al., 2004).

Segundo as observações de DAVIES (1997), lugares de manuseio de produtos de petróleo podem apresentar uma indicação de poluição de metais pesados. É provável que metais pesados sejam encontrados associados com produtos de petróleo.

De acordo com MULLIGAN (2005), dois mecanismos para aumento da biodegradação são possíveis: aumento da solubilidade do substrato para células microbianas e a interação com a superfície celular, o que aumenta a capacidade hidrofóbica da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos se associem mais facilmente. A capacidade hidrofóbica da superfície celular aumentou mais com a linhagem produtora de biosurfactante do que com a linhagem não produtora de biosurfactante em seu crescimento em hexadecano. Uma forma geral de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos é $C_{4n+2}H_{2n}$, em que n é o número de anéis. À medida que aumenta o número de anéis, os componentes se tornam mais difíceis de

serem degradados, devido ao decréscimo da volatilidade e da solubilidade e o aumento da sorção.

Um exemplo de biosurfactantes aniônicos são os ramnolipídios, capazes de remover metais do solo e íons como o cádmio, chumbo e zinco devido a sua habilidade de complexar. Índices de argila e óxido de ferro afetam a eficiência dos biosurfactantes, mas isso não foi pesquisado ainda. Biosurfactantes podem também ser utilizados em processo de lavagem para solos escavados. Devido à propriedade espumante dos biosurfactantes, complexos metal-biosurfactante podem ser removidos pela adição de ar comprimido, e após isso, serem reciclados por precipitação, com a redução do pH para 2. Em resumo, ramnolipídios são efetivos para a remoção de hidrocarbonetos e metais pesados e podem também ser efetivos para remover misturas de hidrocarbonetos e metais contaminantes. Porém, estudos nesta linha ainda não foram feitos em larga escala (MULLIGAN, 2005).

CAPÍTULO 4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Inoculação

A inoculação foi constituída de três etapas: preparo do meio mineral; propagação do consórcio e o preparo do inóculo.

4.1.1. Preparo do Meio Mineral

O meio mineral foi preparado a partir de pesagem e solubilização de cada componente em frascos Erlenmeyer diferentes, tendo seu pH ajustado para 7,0 com adição de NaOH ou HCl concentrados, com as leituras realizadas com papel de pH da Merck. Após esse ajuste, os frascos foram autoclavados à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos.

A tabela 4.1 mostra a concentração de cada componente do meio mineral.

Tabela 4.1 – Composição do meio mineral

| Componente | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| NaCl | 5,0 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,0 |
| KNO ₃ | 3,0 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 1,0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 |

4.1.2. Propagação do Consórcio

O solo utilizado para este experimento foi o da Escola de Química do Centro de Tecnologia da UFRJ – Ilha do Fundão. Uma amostra de 10 g deste solo foram adicionados a 100 mL do meio mineral com 0,5 g/L de glicose em um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Essa mistura foi mantida sob agitação a 150 rpm e 30°C durante 4 dias.

Após esse período, uma alíquota de 10 mL desta solução foi transferida para outro frasco contendo 100 mL do meio mineral, 0,5 g/L de glicose e 0,1% v/v de gasolina. Este procedimento foi repetido outras duas vezes.

A manutenção do consórcio foi feita em meio líquido contendo glicose e gasolina, sob refrigeração para garantir sua preservação.

4.1.3. Preparo do Inóculo

Com o objetivo de ativar o consórcio, preparou-se o meio do pré-inóculo que continha tanto glicose quanto gasolina nas mesmas concentrações citadas na etapa de propagação. O pré-inóculo foi mantido sob agitação (150 rpm a 30 °C) por quatro dias. Após esse período, foi medida a concentração celular por meio da densidade óptica a 440 nm, com o uso de um espectrofotômetro marca Cam Spec M302. Assim, foi possível obter o inóculo a partir de um determinado volume do pré-inóculo, de forma que a densidade óptica inicial de todos os experimentos fosse teoricamente igual a 0,05.

4.1.4. Experimentos

Onze diferentes experimentos realizados em duplicata foram conduzidos empregando-se glicose e/ou gasolina como fonte de carbono em sistemas adicionados ou não de metais e de EPS.

Abaixo a tabela 4.2 mostra as diversas composições de meios nos experimentos realizados.

Tabela 4.2 – Composições de meios

| Experimento | Composição do meio |
|--------------------|-----------------------------------|
| 1 | Glicose |
| 2 | Glicose + metais |
| 3 | Glicose + metais + EPS |
| 4 | Glicose + gasolina |
| 5 | Glicose + gasolina + metais |
| 6 | Glicose + gasolina + EPS |
| 7 | Glicose + gasolina + metais + EPS |
| 8 | Gasolina |
| 9 | Gasolina + metais |
| 10 | Gasolina + EPS |
| 11 | Gasolina + metais + EPS |

A EPS foi obtida previamente no laboratório por uma bactéria do gênero *Paenibacillus poymyxa* de acordo com PIURI e colaboradores (1998).

A concentração dos metais pesados (Cd^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+}) dos experimentos foi 1 ppm para cada um e os sais utilizados foram: $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Os experimentos foram realizados sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 4 dias.

4.2. Amostragem

As amostragens foram realizadas seguindo intervalos de 6 ou 12 horas, sendo o tempo zero atribuído ao início de cada experimento.

As amostragens foram realizadas dentro da câmara de fluxo laminar para evitar qualquer tipo contaminação, e as amostras foram conservadas em freezer em frasco âmbar até o momento da análise.

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Quantificação da proteína

Cada amostra foi centrifugada com centrífuga marca Fanen modelo Excelsa2 a 3000 rpm para separação de sobrenadante e precipitado. Retirou-se o sobrenadante para a quantificação da glicose e com o precipitado realizou-se uma ressuspensão para concentrar as amostras e determinar a concentração da proteína.

O precipitado foi ressuspendido em 2 mL, dos quais 1 mL foi hidrolisado com 0,1 mL de NaOH (1 mol/L) durante 10 minutos a 100 °C. A hidrólise é necessária para romper as células e liberar a proteína intracelular a ser quantificada, que indica indiretamente o crescimento do microrganismo.

Para todas as amostras foram determinadas as concentrações de proteína usando o Método de LOWRY (LOWRY et al., 1951), onde foi preparado um reagente A misturando 1 mL de solução de CuSO_4 1% com 1 mL de solução de tartarato duplo de Na^+ e K^+ 0,1 mol/L e levando o volume a 100 mL com solução de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 mol/L. Um reagente B (solução de Folin-Ciocalteu) foi feito misturando-se 1 mL de reagente com 1 mL de água.

Em seguida, foram colocados 400 μL da amostra hidrolisada em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 2 mL do reagente A. Após 10 minutos, acrescentou-se 0,2 mL do reagente B, sendo feita leitura em espectrofotômetro a 660 nm depois de 30 minutos de reação.

A concentração da proteína de cada amostra foi determinada com o uso da curva padrão de BSA expressa em absorvância x concentração (g/L). Esta curva padrão foi determinada pelo método de LOWRY, através da leitura em espectrofotômetro de uma solução de BSA com diferentes concentrações conhecidas.

4.3.2. *Quantificação da glicose*

Para os experimentos que continham glicose foi realizada sua quantificação utilizando-se o método da glicose-oxidase.

Dos sobrenadantes provenientes das centrifugações das amostras, foram retirados 20 μL e colocados em diferentes tubos de ensaio. Depois foram adicionados 2 mL da solução da enzima de glicose-oxidase. Essas soluções foram incubadas por 10 minutos a 37 °C e realizada leitura em espectrofotômetro a 510 nm.

A determinação da concentração da amostra, em g/L, foi obtida pela razão entre a sua absorvância e a do padrão de glicose, de concentração igual a 1 g/L.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Curva Padrão de BSA

Para iniciar os experimentos, foi construída a curva padrão de proteínas, empregando-se o BSA, que está representado no gráfico 5.1.

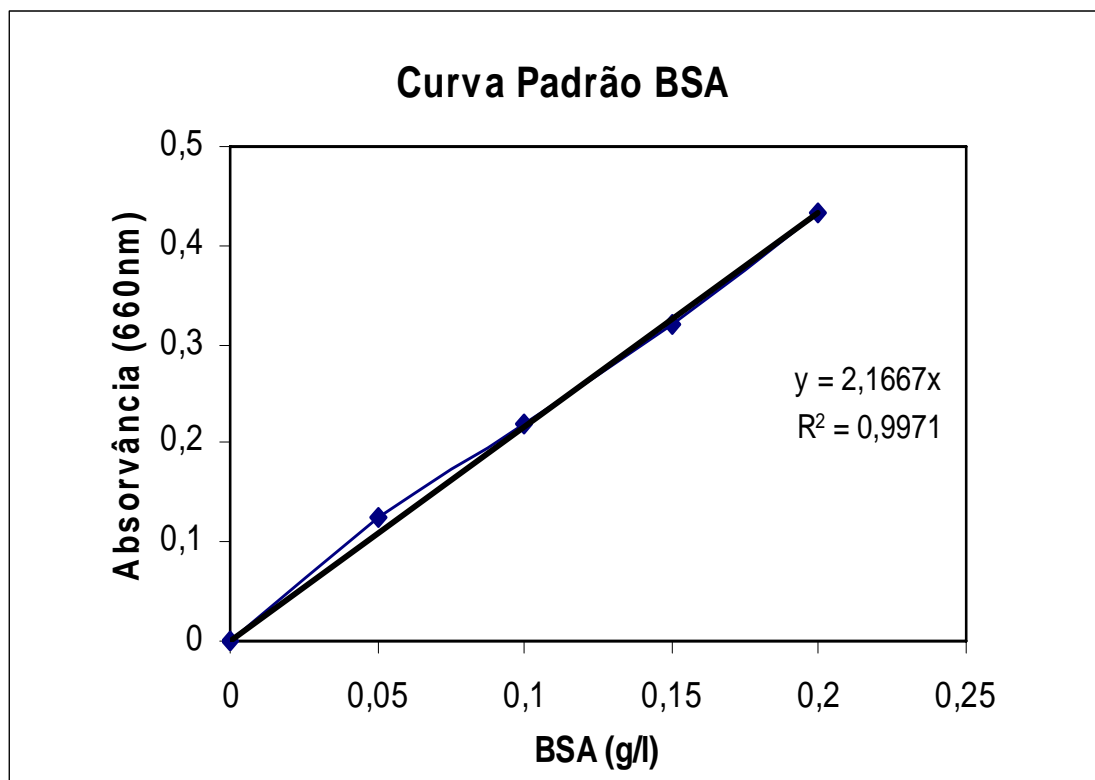


Gráfico 5.1 - Curva Padrão de Concentração de Proteína

A curva padrão de BSA foi obtida pela leitura das amostras de diferentes concentrações conhecidas em espectrofotômetro a 660 nm. A partir dos pontos obtidos foi traçado um gráfico e calculado seu ajuste linear, onde foi verificado um bom comportamento dos dados, tendo em vista o valor de R^2 que foi muito próximo da unidade.

O cálculo da concentração de proteína é um método indireto para estimar o crescimento celular e, conseqüentemente, o consumo da fonte de carbono.

5.2. Comportamento do Consórcio em Relação à Fonte de Carbono Disponível

O gráfico abaixo demonstra o crescimento do consórcio microbiano nos meios contendo diferentes fontes de carbono.

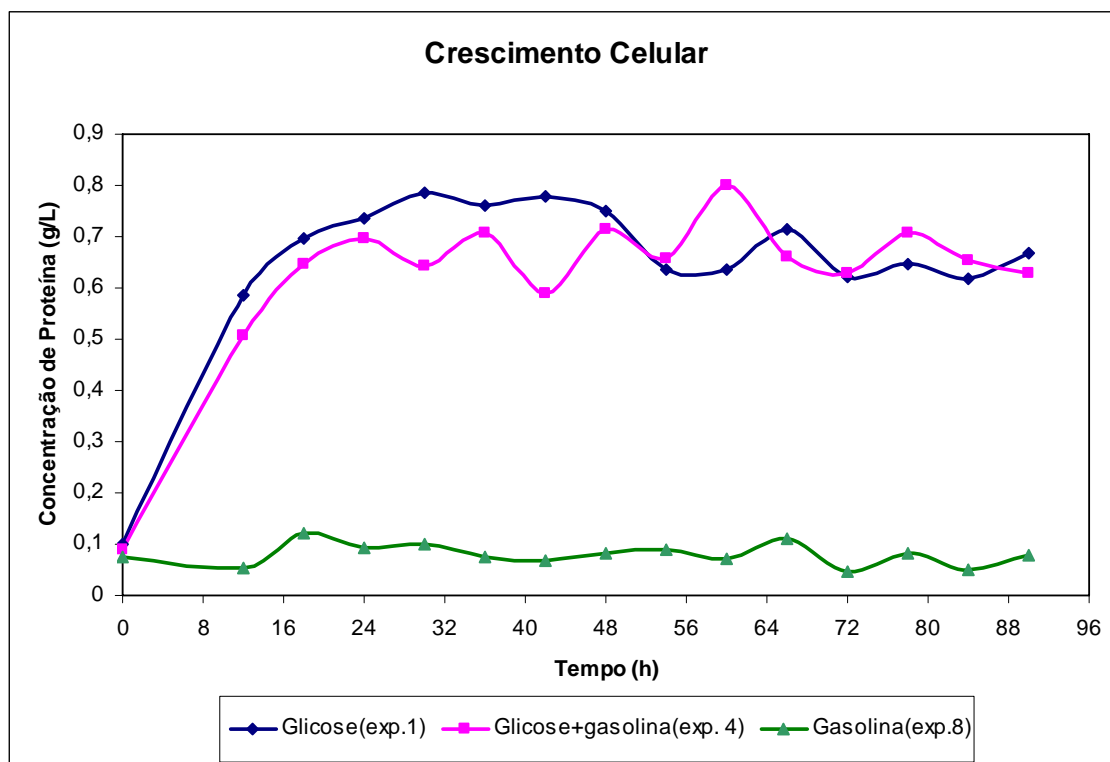


Gráfico 5.2 - Adaptação dos microrganismos a fonte de carbono

No gráfico 5.2 foi comparado o crescimento celular em experimentos que utilizavam diferentes fontes de carbono (glicose, glicose+gasolina e gasolina). Observando o gráfico, percebe-se que o experimento onde se adicionou apenas gasolina ao inóculo não apresentou crescimento celular significativo, enquanto os experimentos utilizando apenas glicose e glicose mais gasolina apresentaram.

A partir desses resultados foi possível compreender melhor o metabolismo dos microrganismos. A molécula de glicose é bem menos complexa que as moléculas dos hidrocarbonetos da gasolina, sendo assim muito mais fácil de ser degradada e utilizada como fonte de energia para o crescimento celular. Isto explica o alto crescimento celular apresentado no experimento utilizando apenas glicose como substrato.

Além disso, o consórcio utilizado nesse experimento foi inicialmente adaptado à glicose e até mesmo quando se passou a adicionar a gasolina ao meio, este nunca

deixou de ter também a glicose como fonte de carbono. Dessa forma, provavelmente o consórcio consegue manter suas funções metabólicas na presença de gasolina, mas sem degradá-la totalmente.

O experimento 4, utilizando glicose e gasolina como substratos, também apresentou bom crescimento do consórcio microbiológico. Isto pode se dever ao fato de os microrganismos terem utilizado inicialmente a glicose como substrato e assim conseguir energia suficiente para desenvolver mecanismos para degradar os hidrocarbonetos da gasolina. Conclui-se, então, que a presença da gasolina neste experimento não inibiu o crescimento celular.

Segundo SINGER e colaboradores (2005), a seleção de espécies de ambientes contaminados tem sido feita baseada em critérios de potencial habilidade de degradação, sem considerar a potencial habilidade da linhagem se proliferar e ser ativa nos sistemas em que será posteriormente aplicada.

Linhagens selecionadas do solo contaminado (SINGER et al., 2005) de populações que têm baixa abundância ou que são transientes em relação ao substrato empregado na sua seleção ou em relação ao sistema de onde são procedentes teriam pouca chance de sucesso quando usadas como inóculo, comparadas àquelas que são espacial e temporariamente diversificadas.

Portanto, de acordo com SINGER e colaboradores (2005) o consórcio microbiano deveria ser selecionado primeiramente com uma fonte de carbono de fácil degradação para que fosse possível obter algumas culturas permanentes, e, só depois, deveriam as mesmas ser acondicionadas à gasolina. Os autores indicam que uma pré-seleção com esta segunda fonte de energia somente poderia selecionar algumas culturas intermitentes do sistema, que, possivelmente, não seriam encontradas em todos os momentos ao longo do processo de degradação do contaminante no solo.

CUNHA e LEITE (2000) isolaram, de solo contaminado com gasolina por 12 dias, três espécies de microrganismos (*Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas alcaligenes*), demonstrando que a condição de isolamento utilizado foi bastante seletivo. As autoras conduziram experimentos de degradação empregando a microflora nativa do solo e a mistura de culturas puras de *B. cepacia*, *P. alcaligenes* e *P. putida*, depois da adição de 30 $\mu\text{mol/g}$ de NH_4NO_3 ao solo e 0,1 mmol/L de H_2O_2 .

Em experimentos conduzidos com a utilização da população nativa, adicionada ou não às culturas puras isoladas, obtiveram diferentes resultados de degradação. Após adição das culturas isoladas, foi verificado um aumento na degradação de algumas substâncias presentes na gasolina e diminuição de outras. Já quando da utilização da população nativa somente foi observada a degradação homogênea de 50% em todas as substâncias detectadas, evidenciando o equilíbrio metabólico e a interação da flora já instalada no ambiente (CUNHA e LEITE, 2000)

SALMOND e colaboradores (2001) registraram que bactérias não existem como células solitárias, mas como colônias que expressam elaborados sistemas de comunicação intercelular para facilitar sua adaptação à variação nas condições ambientais.

Portanto, pelas informações apresentadas e pela ausência de crescimento significativo quando apenas a gasolina foi empregada como fonte de carbono, parece que o consórcio utilizado nestes experimentos mostrados no gráfico 5.2, após propagação contínua na presença de glicose + gasolina, possivelmente teria priorizado a utilização da glicose como fonte de carbono. Nesse caso, provavelmente linhagens com potencial para degradação de alguns componentes da gasolina foram selecionados em menor número, e a atividade metabólica exercida por essa população foi conduzida apenas para manutenção da viabilidade celular sem ser detectado aumento na concentração celular (Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

5.3. Experimentos com Glicose como Única Fonte de Carbono, na presença ou não de metais

Os gráficos abaixo apresentam os resultados dos experimentos que continham apenas glicose como fonte de carbono. O gráfico 5.3 mostra o perfil do crescimento microbiano, e o gráfico 5.4 no consumo de glicose.

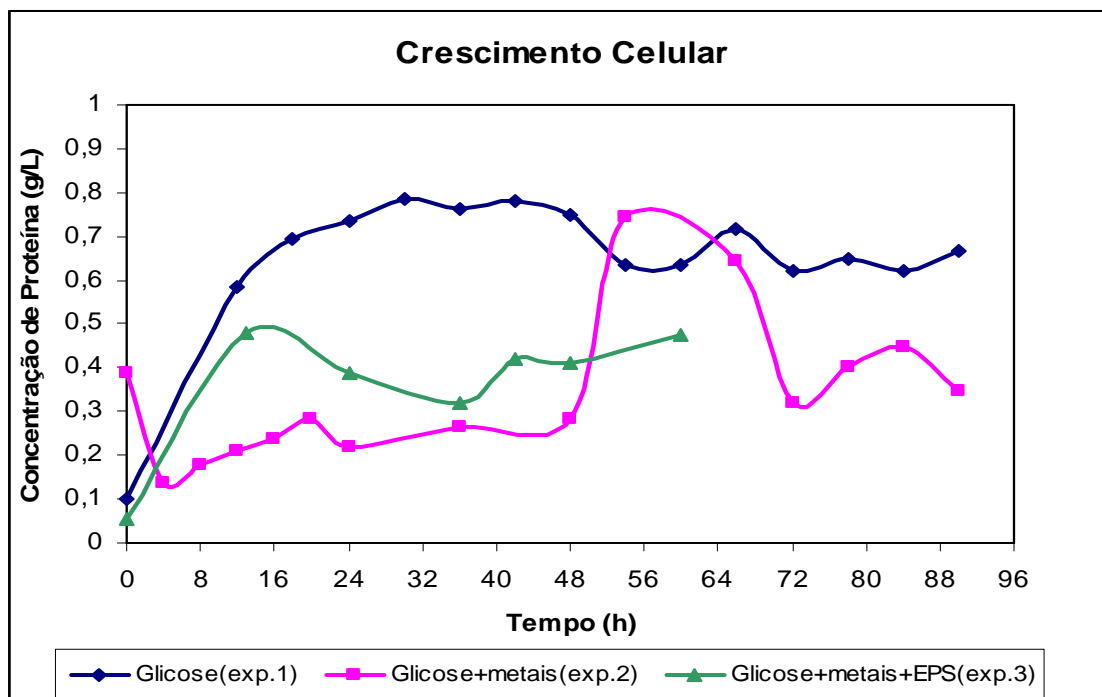


Gráfico 5.3 - Influência dos metais no crescimento celular e o uso da EPS (Glicose)

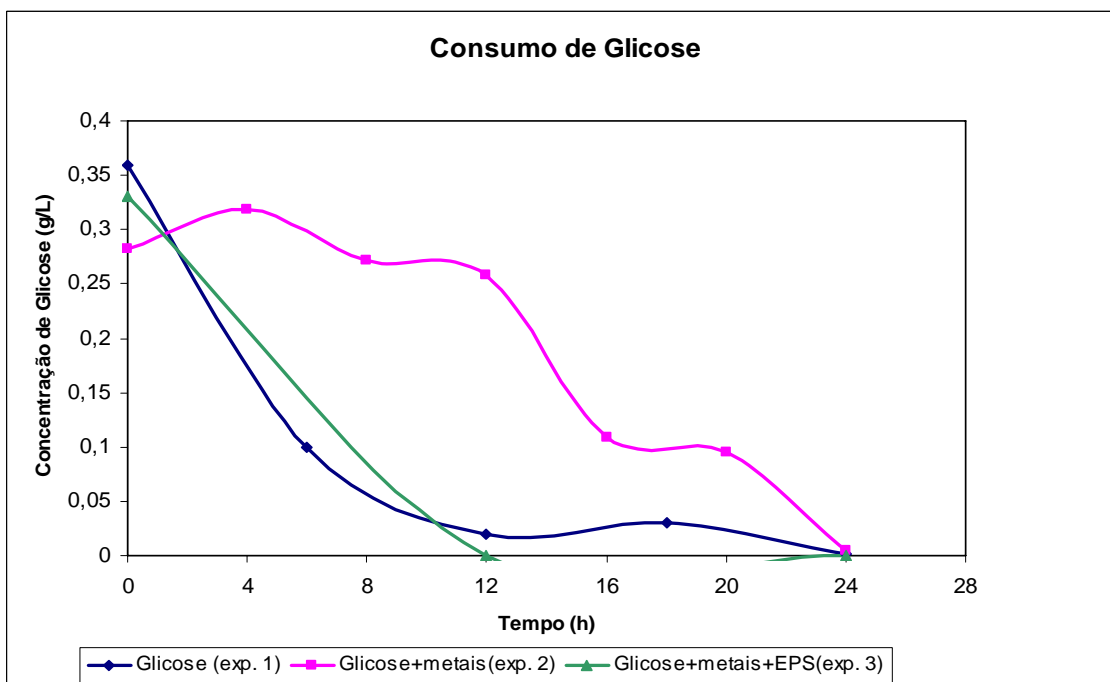


Gráfico 5.4 – Influencia dos metais no consumo de glicose

A comparação entre os experimentos 1, 2 e 3, representados acima, é de grande importância para evidenciar o efeito inibidor dos metais sobre o metabolismo biológico.

Verifica-se uma grande diferença no crescimento celular entre o experimento em que não são adicionados metais e os que recebem metais. No experimento utilizando glicose como fonte de carbono sem adição de metais o crescimento é rápido e, por ter sido retirada a segunda amostra com intervalo de 12 horas, não foi possível observar uma fase lag.

O experimento 2, que utiliza glicose e metais, confirmou que a presença destes inibe o metabolismo microbiano, demonstrando uma queda inicial no crescimento e fase de crescimento lenta e extensa. Foi verificado, também, uma queda no crescimento microbiano logo após a concentração máxima ter sido atingida.

Os estudos ecotoxicológicos de laboratório realizados por GILLER e colaboradores (1997) sugerem que, quando medida por um período de 14 a 100 dias após a adição de substrato, a adição de metais geralmente resulta em um decréscimo na resposta respiratória para uma larga faixa de substratos adicionados como glicose, celulose, palha, resíduos de plantas, lodo sanitário e misturas de alfafa. Uma análise mais detalhada da curva da resposta respiratória após adição de substrato indica que a resposta respiratória inicial é mais sensível à adição de metais. A quantidade de carbono mineralizado em um período curto de tempo, como 24 horas após a adição de glicose, por exemplo, mostrou-se sendo extremamente sensível à adição de pequenas quantidades de sais metálicos em laboratório, o que pode ser devido a um aumento na fase lag.

MARÇANO (2004) também reporta um aumento da fase lag inicial do crescimento celular para *Pseudomonas putida*, como verificado no experimento 2 (gráfico 5.3). Talvez então após esse aumento da fase lag, ocorreu a captação de glicose que levou ao crescimento máximo detectado no experimento 2 (gráfico 5.3). Porém, uma provável alteração da permeabilidade pode ter levado a biomassa à lise o que explicaria a queda posterior ao crescimento também registrado no gráfico 5.3 (exp. 2).

DIAZ-RAVIÑA e BAATH (1996) realizaram experimentos em solos, onde adicionaram zinco. Foi observado um aumento na tolerância a Zn após apenas dois dias de exposição, com concentrações de 130 mg/kg ou mais de Zn. A tolerância ao metal foi estável com a adição de 520 mg/kg. Quando foram adicionados 2080 mg/kg

de Zn, a tolerância aumentou por duas semanas, e nenhuma mudança foi percebida após estas semanas até 28 meses de exposição. O efeito imediato foi atribuído à morte rápida de espécies microbiológicas sensíveis e o efeito, a longo prazo, atribuído a diferenças na habilidade competitiva e de adaptação das bactérias sobreviventes.

O experimento 3, que usou glicose adicionada de metais e EPS aparentemente também não apresentou fase lag da mesma forma como no experimento 1; mas o crescimento celular não atingiu a concentração máxima do experimento 1 que utilizou apenas glicose. Isto demonstra que a EPS diminuiu o efeito negativo dos metais, possivelmente, pela adsorção ou complexação (MULLIGAN, 2005) dos mesmos, promovendo a indisponibilidade desses metais à biomassa.

De acordo com MULLIGAN (2005), surfactantes como ramnolipídios têm sido registrados como potenciais agentes na extração e captação de cobre, cádmio, chumbo e zinco.

O gráfico 5.4 mostra que a curva de decaimento de glicose é mais lenta quando há adição de metais o que confirma o efeito inibidor marcante dos mesmos no início da atividade microbiana.

Para os experimentos 1 e 3, o consumo máximo de glicose foi atingido próximo ao máximo crescimento detectado. Já no experimento 2, o consumo de glicose foi obtido com 24 horas, e o crescimento máximo com 48 horas, reforçando o efeito negativo dos metais na atividade metabólica.

5.4. Experimentos com Glicose e Gasolina como Fonte de Carbono, na presença ou não de metais

Os gráficos abaixo apresentam o resultado dos experimentos que continham glicose e gasolina como fontes de carbono. O gráfico 5.5 mostra o crescimento celular, e o gráfico 5.6, o consumo de glicose.

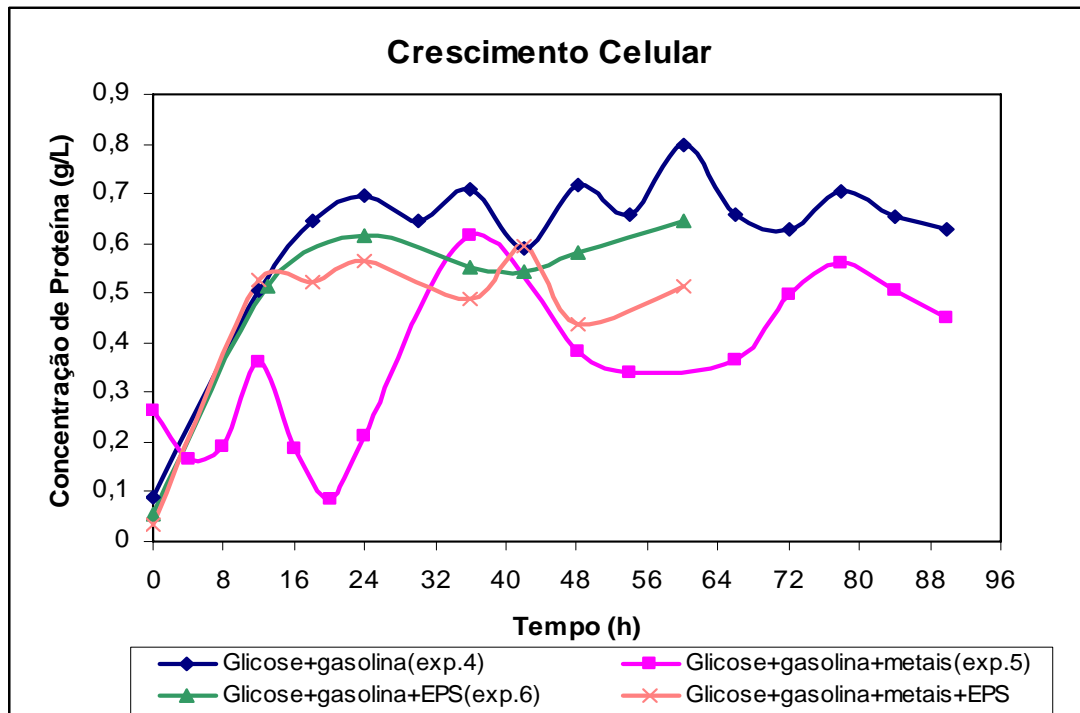


Gráfico 5.5 - Influência dos metais no crescimento celular e o uso da EPS (Glicose+Gasolina)

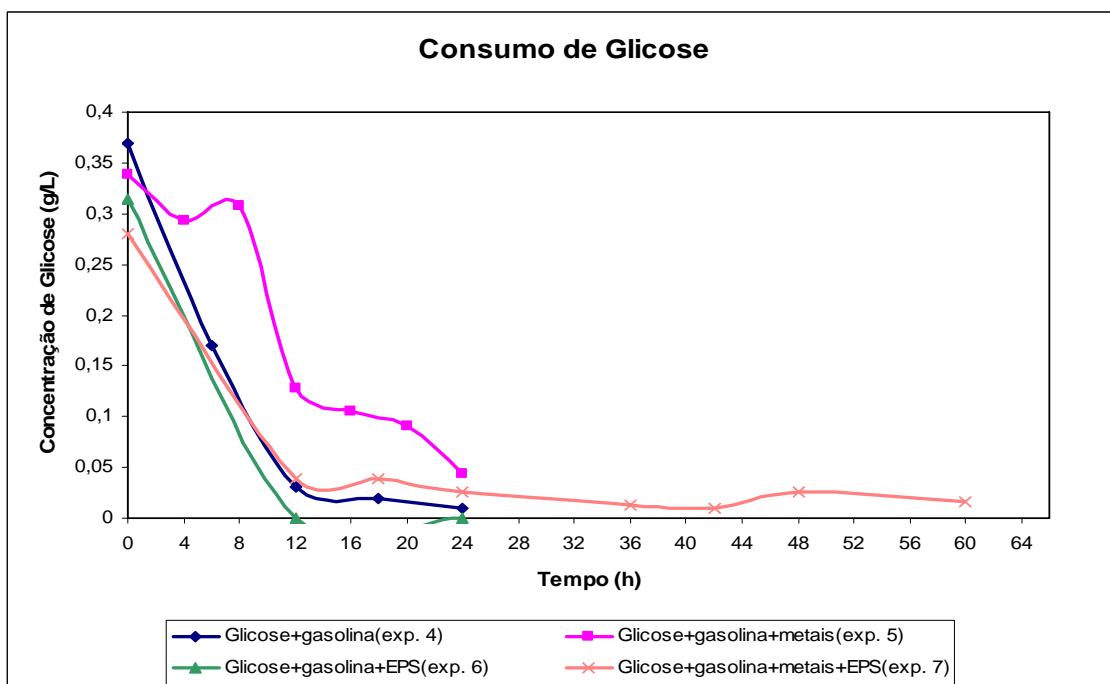


Gráfico 5.6 – Influência dos metais no consumo da glicose

Os experimentos 4, 5, 6 e 7, apresentados acima, utilizam gasolina junto com glicose como substrato. Seus comportamentos foram muito parecidos com os experimentos discutidos anteriormente e, como não foi possível quantificar a gasolina, fica impossibilitada a confirmação de sua degradação.

LEE e colaboradores (2003) propuseram, em seu trabalho sobre o efeito de uma fonte adicional de carbono na biodegradação de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7, que fosse adicionado piruvato para acelerar o processo de biodegradação. Para tanto, foram simulados diversos experimentos com quantidades diferentes desta fonte adicional para verificar quais seriam os efeitos na degradação de naftaleno. Como resultado, descobriram que a adição deve ser cuidadosa e de forma que sua quantidade seja otimizada, pois se for adicionada uma quantidade acima da ótima o microrganismo não degrada o naftaleno, consumindo apenas o piruvato e, se for adicionada uma quantidade abaixo, irá retardar o consumo de naftaleno.

É provável que, pelo fato de não ter sido pesquisada a concentração ótima de glicose a ser adicionada na biodegradação da gasolina, os resultados obtidos com os experimentos 4, 5, 6, e 7 apresentaram comportamentos parecidos com os experimentos que continham apenas glicose como fonte de energia. E, por essa razão, possivelmente o consórcio microbiano deve ter apenas consumido a glicose sem degradar a gasolina.

Pode-se notar, no entanto, que a presença de gasolina associada à glicose determina menor efeito de inibição de metais tendo em vista que a fase lag do experimento 5 foi menor quando comparada ao experimento 2 (gráfico 5.3) e os crescimentos detectados nos experimentos 6 e 7 foram mais próximos do máximo atingido no experimento 4 (gráfico 5.5) e no experimento 1 (gráfico 5.3)

De acordo com SINKKEMAN (1994), hidrocarbonetos aumentam a fluidez da membrana, prejudicando sua função. Neste caso, o metal teria então reduzido esta fluidez, o que permitiria um efeito negativo menos pronunciado da gasolina e uma diminuição da fase lag inicial (experimento 5, comparado ao 2). Isso pode estar também relacionado a hipótese de SANDRIN e colaboradores (2000), que indica que a presença de metais pode conferir uma certa proteção às bactérias, retardando a perda de viabilidade celular na presença de hidrocarbonetos.

A curva de decaimento (gráfico 5.6) da glicose mostra novamente que a presença de metais determina uma queda menos acentuada cujo efeito parece ser minimizado quando há adição de EPS.

A EPS também se mostrou eficiente na redução do efeito inibitório dos metais, sendo confirmado no experimento 7, que apresentou crescimento aproximadamente igual ao experimento 4. Isto se deve ao fato de, provavelmente, a EPS ter indisponibilizado, por adsorção, os metais do meio. O experimento 6 mostrou bom crescimento, mas atingiu uma concentração de proteína pouco menor que a do experimento 4.

5.5. Experimentos com Gasolina como Única Fonte de Carbono

O gráfico 5.7 apresenta a comparação entre os experimentos 8, 9, 10 e 11 que utilizaram a gasolina como única fonte de energia para o consórcio microbiano.

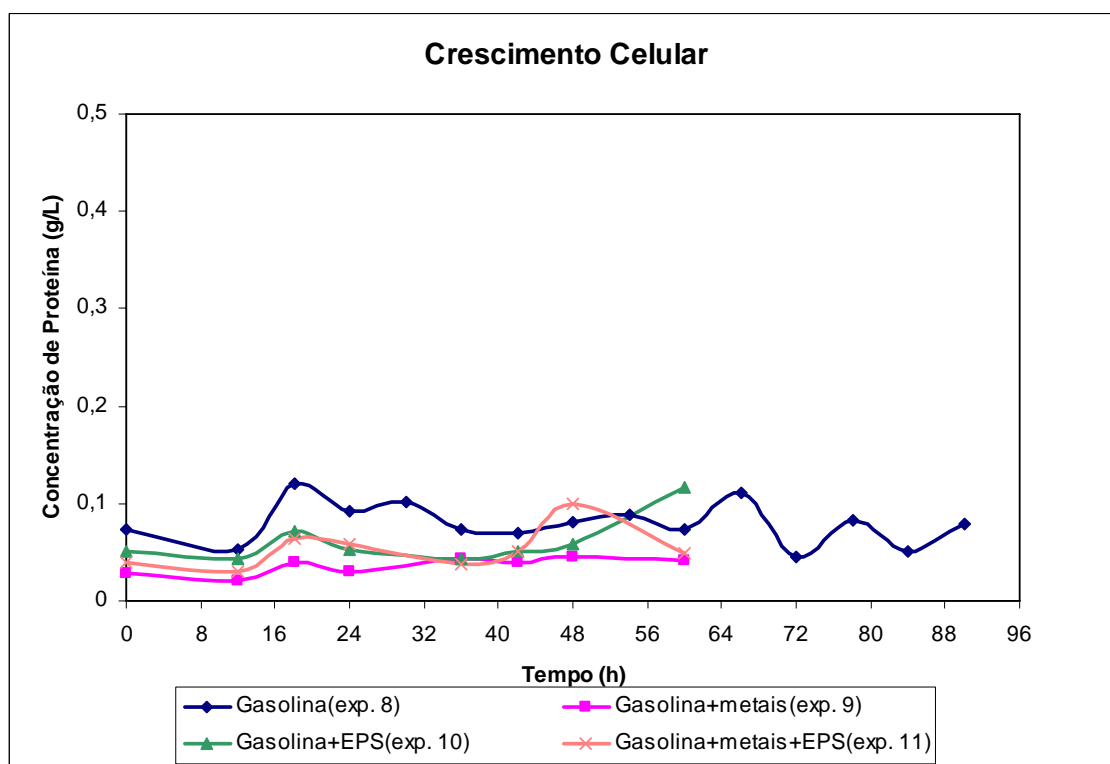


Gráfico 5.7 - Influência dos metais no crescimento celular e a importância da EPS (Gasolina)

A fase lag, em que os microrganismos tentam se adaptar aos hidrocarbonetos da gasolina é evidente em todos os experimentos bem como o baixo crescimento. Isso indica que embora os microrganismos consigam manter atividade microbiana na gasolina, esta atividade procede de forma muito mais lenta e com menor eficácia do que na presença de glicose.

Outro aspecto importante deste gráfico é o fato de o experimento 9 apresentar crescimento ainda menos significativo. Isto é indicativo de que na presença de metais pesados os microrganismos não conseguem desempenho satisfatório na gasolina.

A EPS novamente parece que mostrou eficiência na redução da disponibilidade dos metais, já que o crescimento celular nos experimentos 10 e 11 atingiram os valores máximos registrados no experimento 8.

As flutuações que geraram picos de concentração de proteínas celulares em todos os experimentos pode ser fruto da adaptação dos microrganismos para utilização como substrato os diferentes contaminantes presentes na gasolina (benzeno, tolueno, xileno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc.), ou, ainda, erros experimentais de quantificação em função dos baixos valores observados.

Alguns trabalhos da literatura têm reportado o papel da população microbiana natural na degradação de hidrocarbonetos.

PERRODIN e colaboradores (2002) registram alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) por organismos nativos do sedimento do Rio Ain (França) e indicam que essa população pode ser empregada na avaliação de toxicidade de poluentes orgânicos específicos.

TABAK e colaboradores (2005) verificaram que, com suficiente suprimento de O₂, substancial biodegradação de PAH com 2, 3, 4 e 5 anéis presentes em sítio contaminado do East River (N.Y.) foi realizada pela população natural.

WATANABE (2001) relata que uma dificuldade enfrentada na biorremediação se deve ao fato de a mesma se passar em ambientes naturais que contém diversos organismos não caracterizados. E ainda que muitos microrganismos degradadores isolados e caracterizados no laboratório podem ter pequeno efeito na biodegradação.

Todos esses trabalhos indicam que a atividade microbiana natural é efetiva. SINGER e colaboradores (2005) relembram que muitas pesquisas têm sido dedicadas à busca de organismos catabolicamente competentes, mas pouca ou nenhuma consideração tem sido dada a outras características essenciais que são necessárias à essa população quanto à ativa funcionalidade e persistência nos ambientes.

Com os dados preliminares levantados neste trabalho, vistos nos experimentos, foi possível confirmar a importância do uso adequado de condições que

estimulem um consórcio microbiano a crescer e degradar gasolina em sistemas contaminados.

MULLIGAN (2005) afirma que biossurfactantes podem ser efetivos na remoção de contaminantes mistos (hidrocarbonetos e metais), mas poucos estudos têm sido conduzidos nessa direção. Portanto acredita-se que muito ainda terá que ser desenvolvido nessa área e os resultados obtidos nesta pesquisa, ainda que promissores, deverão ser mais explorados.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÃO

A manutenção e propagação do consórcio, do modo como foi conduzida no desenvolvimento destes experimentos, propiciou uma mais intensa atividade microbiana em glicose do que em gasolina.

A ação inibidora dos metais ficou evidente em todos os experimentos, sendo mais pronunciada naqueles em que eles foram adicionados na ausência do EPS.

A capacidade da EPS de remover os metais também poderia ser confirmada devido ao maior crescimento apresentado em todos os experimentos que utilizaram metais e EPS, em comparação com aqueles que continham apenas metais.

Sugestões:

Algumas medidas poderiam ser feitas para se obter uma possível melhora nos resultados na degradação da gasolina.

Inicialmente, poder-se-ia propagar o consórcio microbiano apenas com gasolina, sem glicose, e repetir os experimentos a partir de inóculo crescido em gasolina e glicose isoladamente para comparar as respostas obtidas. Depois, avaliar a viabilidade microbiana nos experimentos conduzidos em gasolina.

Ou então, tentar otimizar as concentrações das fontes de carbono, glicose e gasolina, para avaliar a necessidade da adição de glicose na degradação da gasolina em sistemas reais, como LEE e colaboradores (2003) propõem em seu trabalho, onde adicionam piruvato para facilitar a degradação de naftaleno.

Também, para melhor compreender a função da EPS, poder-se-ia determinar a localização do metal e avaliar se são incorporados à biomassa ou se são complexados pela EPS.

Além disso, utilizar um sistema real co-contaminado com metal e gasolina para avaliação da biodegradação e na tentativa de confirmar as suposições feitas neste trabalho.

CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENIYI, A.A; AFOLABI, J.A. Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soil within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in Lagos metropolis. *Environment International*, 28 p. 79-82, 2002.
- CERVANTES, C. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. p.121-138, 1994.
- CHRISTENSEN, T.H. Cadmium soil sorption at low concentrations.I.Effect of time, cadium load, pH and calcium. *Water, Air and Soil Pollution*. p. 105-114, 1984
- CORSEUIL, H.X; MARINS, M.M. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave. *Rev. Eng. Sanit. Ambiental*, v.2, n.2, p.50-54, 1997.
- CUNHA, C.D.; DO ROSÁRIO, M.; ROSADO, A.S.; LEITE, S.G.F. Serratia sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth ith ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry* 39, p. 2277-2282, 2004.
- CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in diferents soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*. p. 31:45-49, 2000.
- FOUREST, E.; VOLESKY, B, Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by dry biomass of Sargassum fluitans, *Environ, Sci, Technol*, v.30, n.1, p.277-282, 1996.
- GADD, G.M. Biosorption, *Chemistry & Industry* , v.2, p. 421- 426, 1990.
- GILLER, K.E.; WITTER, E.; MCGRATH, S.P.Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol biochen*. Vol. 30, nº 10/11, p.1389-1414, 1998.
- GUIBAUD, G.; COMTE, S.; BORDAS, F.; DUPUY, S.; BAUDU, M. Comparison of the complexation potencial of extracelular polymeric substances (EPS), extracted bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59. p.629-638, 2005.

- HOFFMAN, D.R; OKON J. L; SANDRIN T.R. Medium composition affects the degree and pattern of cadmium inhibition of naphthalene biodegradation. *Chemosphere* 59 p. 919-927, 2005.
- LEE, K; PARK, J.W; AHN, I.S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. *Journal of Hazardous Materials B105*. p. 157-167, 2003.
- MARTINS, A., DINARDI, A.L., FORMAGI, V.M., LOPES, T.A., BARROS, R.M., CONEGLIAN, C.M.R., BRITO, N.N., SOBRINHO, G.D., TONSO, S. e PELEGRINI, R. Disponível em www.ceset.unicamp.br/lte/Artigos/3fec2401.pdf Acesso em 27/09/2006. *Biorremediação*.MORAIS, E.B; TAU-K-TORNISIELO, S.M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 71, (supl.), p. 1-749, 2004.
- MEHRA, R.K.; WINGE, D.R. Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *Biotechnology Letters* 14. p. 7-10, 1991.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133. p.183-198, 2005.
- NOBRE, M.M e NOBRE, R.C.M. Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho. Disponível em www.quimica.com.br. Acesso em 23/09/2006.
- RIIS, V.; BABEL, W.; PUCCI, O.H. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere* 49. p. 559-568, 2002
- ROSS, I.S. Membrane transport processes and response to heavy metals. *Stress Tolerance of Fungi*, ed. D.H. Jennings. p. 97-125,1993.
- SHEN, G; LU, Y; HONG J. Combined effect of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on urease activity in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. p. 1-7, 2005.
- SILVER, S.; NUCIFORA, G.; CHU, L.; MISRA, T.K. Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends in Biochemical Sciences* 14. p. 76-80, 1989.

- SUNDA, W.G.; ENGEL, D.W.; THUOTTE, R.M. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp. *Environmental Science and Technology* 12. p. 409-413, 1978.
- THOMPSON, I.P; VAN DER GAST, C.J; CIRIC, L; SINGER, A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*. p. 909-915, 2005.
- TILLER, K.; MERRY, R.; MCLAUGHLIN, M. Cadmium: a modern day problem. *Rural Research* 162. p. 32-35, 1994.
- TOMSETT, A.B. Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi. *Stress Tolerance of Fungi*, ed D.H. Jennings. p. 69-95, 1993.
- VOLESKY, B ; HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals; American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers. p. 235-251, 1995.
- VOLESKY, B. Sorption and Biosorption, 2003.
- WANG, J., HUANG, C.P., HERBERT E.A. Modeling heavy metal uptake by sludge particulates in the presence of dissolved organic matter. *Water Research* 37. p. 4835-4842, 2003.
- WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Environmental biotechnology*. p. 237-240, 2001.
- WHITEHEAD, N.A; BARNARD, A.M.L; SLATER, H; SIMPSON N.J.L; SALMOND, G.P.C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25. p. 365-404, 2001.
- WOLT, J. *Soil Solution Chemistry*. John Wiley, New York, 1994