

**Paula Salles de Oliveira Martins**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE EPS  
(SUBSTÂNCIA POLIMÉRICA EXTRACELULAR)  
NA BIORREMEDIAÇÃO DE SISTEMAS CO-  
CONTAMINADOS COM GASOLINA E METAIS  
PESADOS**

**EQ/UFRJ**

**2008**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE EPS (SUBSTÂNCIA POLIMÉRICA  
EXTRACELULAR) NA BIORREMEDIAÇÃO DE SISTEMAS CO-  
CONTAMINADOS COM GASOLINA E METAIS PESADOS**

**Paula Salles de Oliveira Martins**

**Universidade Federal do Rio de Janeiro / Escola de Química  
Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos**

**Orientadora: Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.**

**Rio de Janeiro**

**Junho de 2008**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE EPS (SUBSTÂNCIA POLIMÉRICA  
EXTRACELULAR) NA BIORREMEDIAÇÃO DE SISTEMAS CO-  
CONTAMINADOS COM GASOLINA E METAIS PESADOS**

**Paula Salles de Oliveira Martins**

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientada por:

---

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Aprovada por:

---

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

---

Cláudia Duarte da Cunha, D.Sc.

---

Erika Valdman, D.Sc.

---

Maria José de Oliveira Cavalcanti Guimarães, D.Sc.

---

Paula Daniela Braga Adamis, D.Sc.

Rio de Janeiro  
Junho de 2008

**MARTINS, PAULA SALLES DE OLIVEIRA**

**Avaliação da presença de EPS (substância polimérica extracelular) na biorremediação de sistemas co-contaminados com gasolina e metais pesados / Paula Salles de Oliveira Martins. – Rio de Janeiro, 2008.**

xviii, 113 f.:il.

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2008.

Orientadora: Selma Gomes Ferreira Leite

1. EPS. 2. Biorremediação. 3. Gasolina. 4. Metais pesados – Teses. I. Leite, Selma Gomes Ferreira; (Orient.) II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

***Aos meus filhos, João e Lívia,  
por quem tudo vale a pena.***

## **AGRADECIMENTOS**

Teria sido muita pretensão sequer imaginar que eu conseguiria desenvolver este trabalho sozinha. A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, as palavras pouco conseguirão expressar a minha gratidão.

A Deus, por ter permitido que eu alcançasse mais essa conquista em minha vida. Pelas pessoas que colocou em meu caminho, sem as quais eu jamais teria chegado até aqui.

À minha orientadora Selma, por tudo o que me ensinou, pela paciência, confiança e amizade ao longo desses quase dez anos de convivência; acima de tudo, por não ter desistido de mim, quando eu mesma já havia desistido. Não existem palavras que possam descrever o quanto sou grata.

Ao meu marido Welbert, por estar ao meu lado, desde sempre.

À minha mãe, que no meio de todas as dificuldades de criar sozinha quatro filhos, nunca descuidou de nossa educação e fez o impossível para que tivéssemos acesso às melhores escolas. Hoje estamos colhendo mais um fruto de tanta dedicação.

À minha família querida, simplesmente por existirem e fazerem minha vida ter sentido. Ao meu irmão Hugo, que muito me ajudou em algumas etapas do trabalho experimental.

Aos amigos queridos do “lab 103” e agregados: Alexandre, Aline Bravo, Aline Ramos, Andréa, Bete, Camila, Carolina, Claudete, Cláudia, Cristianne, Erika, Fabiana, Hugo, Joyce, Luciene, Márcio Marçano, Márcio Marques, Orlando, Patrícia, Priscila, Sheila, Tatyane, Verônica e Walber, e aos estagiários Carolina e Anderson. Nunca teria conseguido se não fossem vocês, que tornaram esses anos de doutorado mais amenos com a amizade e ajuda de que tanto precisei. De forma mais particular, a Fábio e Narcisa, pessoas muito mais que especiais em minha vida, que me presenteiam com sua amizade e carinho fraterno, e que Deus permitiu serem meus anjos da guarda encarnados.

Aos amigos de sempre: Charlles, Ricardo, Vivi, Juliana, Paulinha, Tati, Alex e Helder, pelos longos anos de amizade e companheirismo.

Aos meus ex-colegas do GAP e ex-alunos, em especial Gabriela, Juliana, Saullo, Suéllen, Suellen Anália e Victor Hugo, por terem me dado o apoio essencial no momento mais crítico do desenvolver desta tese.

Aos novos amigos do INPI, em especial Débora e Welington, pelo ânimo extra que me trouxeram na reta final.

Aos demais colegas dos laboratórios 109, 113 e 121, pela ajuda no desenrolar das atividades experimentais.

Aos agora ex-alunos Raquel, Amanda, Maristela, João e Leonardo, pela co-participação durante uma fase dos experimentos.

Aos alunos Felipe Alves e Cristiane Rocha, pela ajuda nos últimos experimentos da tese.

Aos professores e funcionários da Escola de Química, por tudo o que me ensinaram e ajudaram, ao longo desses 13 anos de EQ.

À professora Érika Nunes, pela amizade e por permitir o uso do rotavapor no DOPOLAB.

A João Alfredo, Maria Lúcia e Matias, do LAAM, pela análise dos metais no absorção atômica.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos durante parte do desenvolvimento desta tese de doutorado.

**“Perseverar com Deus”**

“(...) O deserto imenso é feito de grãos de areia em movimento.  
A tempestade avassaladora se constitui de moléculas invisíveis  
que se aglutinam.

... E o Universo é o resultado de partículas infinitamente  
imperceptíveis que o amor de Deus reúne mediante  
as “leis de atração e de repulsão” geradoras de equilíbrio.

Assim, os teus momentos difíceis de agora estarão  
transpostos logo mais, se souberes reunir as forças  
combatidas e perseverar na irrestrita confiança em Deus.”

Joanna de Ângelis/Divaldo Pereira Franco



## RESUMO

MARTINS, Paula Salles de Oliveira. **Avaliação da presença de EPS (substância polimérica extracelular) na biorremediação de sistemas co-contaminados com gasolina e metais pesados.** Orientadora: Selma Gomes Ferreira Leite. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ; CNPq, 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

A poluição combinada é um problema de grande interesse atualmente. Canais, rios e, por fim, mares, são contaminados com despejos orgânicos contendo altas concentrações de metais pesados, o que é de preocupação geral uma vez que eles são persistentes e capazes de se acumular no ecossistema, sendo um perigo sério para o ambiente e a saúde. Ainda, a presença de metais pode inibir a microbiota natural envolvida na degradação de compostos orgânicos, afetando as taxas de degradação. O nível de inibição depende da concentração e disponibilidade dos metais pesados, e é dependente da ação de processos complexos controlados por vários fatores, incluindo a natureza dos metais, do meio e das espécies microbianas. Os metais pesados podem inibir os microrganismos bloqueando grupos funcionais essenciais ou interferindo na incorporação de íons metálicos essenciais para as moléculas biológicas. Em alguns casos, os microrganismos são resistentes aos metais pesados por meio de diferentes mecanismos. Estratégias efetivas para melhorar a biodegradação orgânica na presença de metais pesados tóxicos incluem a redução da concentração biodisponível dessas espécies, e a redução das interações entre o metal e a célula.

As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) desempenham um importante papel na agregação das células bacterianas em flocos, na estabilização da estrutura de biofilme, retenção de água e formação de uma barreira protetora que diminui efeitos danosos, mas também são bastante importantes na biossorção de metais pesados, e são produzidos pela maioria das bactérias. As EPS são constituídas por uma mistura de polissacarídeos, mucopolissacarídeos e proteínas, que dependem da cepa e das condições de cultivo. Elas contêm grupos funcionais ionizáveis como carboxila, fosfato, amina e hidroxila, que as capacitam a seqüestrar metais pesados.

Neste trabalho, foi produzida uma EPS pela bactéria *Paenibacillus polymyxa*, numa concentração máxima de 0,35 g/L, e inicialmente foi avaliada sua capacidade de captação e remoção de íons de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  de soluções aquosas, com o uso de planejamento experimental, que resultaram em valores de eficiência de remoção de 64,6 % de  $\text{Cd}^{2+}$ ; 63,0 % de  $\text{Zn}^{2+}$ ; e 68,4 % de  $\text{Cu}^{2+}$ , quando a concentração de EPS na solução foi de 0,01 g/L. Com uma concentração de 0,25 g/L da substância, os valores de eficiência de remoção obtidos foram: 67,3 % de  $\text{Cd}^{2+}$ ; 68,7 % de  $\text{Zn}^{2+}$ ; e 70,1 % de  $\text{Cu}^{2+}$ . Também foram propagados dois consórcios microbianos a partir de uma amostra de solo, sendo o primeiro (consórcio 1) propagado a partir de glicose e o segundo (consórcio 2) a partir de gasolina. O consórcio 1 não mostrou habilidade em consumir os hidrocarbonetos da gasolina, se mostrou sensível à presença de metais pesados num meio de cultivo, e a presença de uma solução da EPS no meio diminuiu o possível efeito inibitório dos metais sobre os microrganismos. Por outro lado, o consórcio 2 exibiu crescimento em meio contendo gasolina como fonte de carbono; entretanto, a presença de metais pesados no meio não interferiu muito no crescimento celular, embora a presença de EPS tenha favorecido o consumo de um dos hidrocarbonetos da gasolina. Por fim, os resultados mostraram que a EPS apresenta potencial para melhorar a biorremediação de hidrocarbonetos em um sistema co-contaminado, minimizando a toxidez dos metais presentes ou melhorando as condições da biodegradação da gasolina.

## ABSTRACT

MARTINS, Paula Salles de Oliveira. **Avaliação da presença de EPS (substância polimérica extracelular) na biorremediação de sistemas co-contaminados com gasolina e metais pesados.** Orientadora: Selma Gomes Ferreira Leite. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ; CNPq, 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Combined pollution is a problem of current interest. Waterways, rivers and ultimately the seas are contaminated with organic waste containing high concentrations of heavy metals, which are of general concern as they are persistent and able to accumulate in the ecosystem posing serious environmental and health hazard. Still, the presence of heavy metals can inhibit the natural microbiota involved in the degradation of organic compounds and affect biodegradation rates. The level of inhibition will depend on the concentration and availability of the heavy metals and is dependent on the action of complex processes controlled by multiple factors including the nature of the metals, media and microbial species. Heavy metals inhibit microorganisms by blocking essential functional groups or interfering in the incorporation of essential metal ions for biological molecules. In some cases, microorganisms are resistant to some heavy metals through different possible mechanisms. Effective strategies to enhance organic biodegradation in the presence of toxic metals include reducing the bioavailable concentration of the toxic metal and the interactions of the toxic metal with the cell.

Extracellular polymeric substances (EPS) play an important role in aggregation of bacterial cells in flocks, stabilization of the biofilm structure, retention of water and formation of a protective barrier that buffers harmful effects, but also play a very important role in biosorption of heavy metals, and are produced by most bacteria. EPS comprise a mixture of polysaccharides, mucopolysaccharides and proteins, which depends on the strain and the culture conditions. They contain ionizable functional groups such as carboxyl, phosphoric, amine, and hydroxyl groups, which enable EPS to sequester heavy metals.

In this work, an EPS was produced by the bacterium *Paenibacillus polymyxa*, in a maximum concentration of 0.35 g/L, and initially its ability of uptake and removal of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  from aqueous solutions was evaluated with a experimental design, that resulted in removal efficiency values of 64.6 % of  $\text{Cd}^{2+}$ ; 63.0 % of  $\text{Zn}^{2+}$ ; and 68,4 % of  $\text{Cu}^{2+}$ , when EPS concentration used was 0.01 g/L. With 0.25 g/L of the substance, removal efficiency values were: 67.2 % of  $\text{Cd}^{2+}$ ; 68.7 % of  $\text{Zn}^{2+}$  and 70.1 % of  $\text{Cu}^{2+}$ . Two microbial consortia were obtained from a soil sample, and the first one (consortium 1) was obtained using glucose as carbon source, and the second one (consortium 2) with gasoline as carbon source. Consortium 1 did not show ability to consume gasoline hydrocarbons and seemed to be sensitive to heavy metals in culture medium, and the presence of an EPS solution decreased the possible inhibitory effect caused by metals on microorganisms. In the other hand, consortium 2 exhibited cellular growth in a medium containing gasoline as carbon source; nevertheless, the presence of heavy metals in medium did not interfere in cellular growth, although EPS presence has favored the consumption of one of gasoline hydrocarbons. Finally, results showed that EPS presents potential of ameliorating hydrocarbons bioremediation in a co-contaminated system, minimizing the toxicity of heavy metals or improving the conditions of gasoline biodegradation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ANOVA** – Análise de variância;
- **ANM** – Atenuação natural monitorada;
- **BTEX** – Fração benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos;
- **CEC** – Capacidade de troca iônica;
- **$C_{EPS}$**  – Concentração de EPS;
- **CETESB** – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental;
- **$C_{Gas}$**  – Concentração de gasolina;
- **$C_M$**  – Concentração inicial de metais;
- **$C_{MF}$**  – Concentração final de metais;
- **CMC** – Concentração micelar crítica;
- **C:N:P** – Relação carbono:nitrogênio:fósforo;
- **CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente;
- **DBO** – Demanda bioquímica de oxigênio;
- **DQO** – Demanda química de oxigênio;
- **EPS** – Substância (s) polimérica (s) extracelular (es);
- **FACE** – Técnica de *fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis*;
- **HPA** – Hidrocarboneto (s) poliaromático (s);
- **NAPL** – Líquido de fase não aquosa;
- **ppb** – Partes por bilhão;
- **ppm** – Partes por milhão;
- **$q$**  – Capacidade de captação;
- **rpm** – Rotações por minuto;
- **SVE** – Extração de vapores do solo;
- **$t$**  – Tempo;
- **$\chi$**  - Crescimento celular do consórcio 2 em 14 horas;
- **$\eta$**  - Eficiência de remoção.

## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 2.1.** Uso da atenuação natural monitorada nos EUA em contaminação de tanques subterrâneos. (p. 19)
- **Figura 3.1.** Procedimento para construção da curva de peso seco. (p. 39)
- **Figura 3.2.** Esquema simplificado do processo de extração e purificação parcial da EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa*. (p. 41)
- **Figura 3.3.** Procedimento realizado para obtenção dos consórcios 1 e 2. (p. 44)
- **Figura 3.4.** Esquema simplificado do procedimento realizado para amostragem e quantificação de metais nos experimentos de localização dos metais. (p. 50)
- **Figura 4.1.** Curva de peso seco para *Paenibacillus polymyxa*. (p. 55)
- **Figura 4.2.** Curvas de crescimento e consumo de substrato por *Paenibacillus polymyxa*. (p. 56)
- **Figura 4.3.** Curva de produção de EPS por *Paenibacillus polymyxa*. (p. 57)
- **Figura 4.4a.** Gráfico *Outlier T* para a eficiência de remoção. (p. 60)
- **Figura 4.4b.** Gráfico *Outlier T* para a captação de metais. (p. 60)
- **Figura 4.5.** Superfície de resposta para eficiência de remoção de  $Cd^{2+}$ . (p. 65)
- **Figura 4.6.** Superfície de resposta para captação de  $Cd^{2+}$ . (p. 66)
- **Figura 4.7.** Curva padrão de BSA. (p. 68)
- **Figura 4.8.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo glicose e/ou gasolina como fontes de carbono. (p. 69)
- **Figura 4.9.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo somente glicose como fonte de carbono, na presença ou não de metais e EPS. (p. 71)
- **Figura 4.10.** Consumo de glicose em meios contendo glicose, glicose e metais, e glicose, metais e EPS. (p. 73)
- **Figura 4.11.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo glicose e gasolina como fontes de carbono, na presença ou não de metais e EPS. (p. 74)
- **Figura 4.12.** Consumo de glicose em meios contendo glicose e gasolina, além de metais e EPS. (p. 75)
- **Figura 4.13.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo glicose e gasolina como fontes de carbono, na presença ou não de metais e EPS. (p. 76)

- **Figura 4.14.** Curvas de crescimento do consórcio 2 em meio contendo glicose com ou sem metais, a partir de diferentes pré-inóculos. (p. 78)
- **Figura 4.15.** Curvas de crescimento do consórcio 2 em meios contendo gasolina com ou sem metais, a partir de diferentes pré-inóculos. (p. 79)
- **Figura 4.16.** Curvas de crescimento do consórcio 2 em meios contendo glicose e gasolina, a partir de diferentes pré-inóculos. (p. 79)
- **Figura 4.17.** Consumo de glicose nos experimentos a partir de pré-inóculo contendo gasolina. (p. 82)
- **Figura 4.18.** Captação de metais pela EPS. (p. 86)
- **Figura 4.19.** Captação de metais pela superfície celular. (p. 87)
- **Figura 4.20.** Gráfico *Outlier T* para o crescimento celular do consórcio 2 em 14 horas. (p. 92)

## LISTA DE TABELAS

- **Tabela 2.1.** Exemplos de algumas espécies de microrganismos ou consórcios de microrganismos com habilidade para degradar poluentes orgânicos. (p. 14)
- **Tabela 2.2.** Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes de alguns hidrocarbonetos. (p. 21)
- **Tabela 3.1.** Composição do meio de manutenção de *Paenibacillus polymyxa*. (p. 37)
- **Tabela 3.2.** Composição dos meios de crescimento testados para *Paenibacillus polymyxa*. (p. 38)
- **Tabela 3.3.** Níveis máximos e mínimos dos fatores. (p. 42)
- **Tabela 3.4.** Composição dos meios mineral e TSA. (p. 45)
- **Tabela 3.5.** Condições dos experimentos envolvendo o consórcio 1. (p. 46)
- **Tabela 3.6.** Condições dos experimentos com variação da fonte de carbono do pré-inóculo (p. 48)
- **Tabela 3.7.** Condições dos experimentos do planejamento experimental. (p. 51)
- **Tabela 3.8.** Níveis máximos e mínimos dos fatores. (p. 51)
- **Tabela 3.9.** Condições para análise em cromatografia gasosa. (p. 54)
- **Tabela 4.1.** Resultados do planejamento experimental para captação de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . (p. 59)
- **Tabela 4.2.** Análise de variância – Modelo linear para eficiência de remoção. (p. 61)
- **Tabela 4.3.** Análise de variância – Modelo quadrático para  $q$ . (p. 63)
- **Tabela 4.4.** Comparação entre os resultados obtidos no planejamento experimental e os dados encontrados na literatura. (p. 67)
- **Tabela 4.5.** Efeito da presença de EPS no crescimento do consórcio 2 em um meio contendo metais pesados e gasolina, após 30 horas de cultivo. (p. 83)
- **Tabela 4.6.** Eficiência de remoção dos metais. (p. 85)
- **Tabela 4.7.** Consumo das frações de gasolina. (p. 88)
- **Tabela 4.8.** Resultados de crescimento do consórcio 2 nos experimentos utilizados para o planejamento experimental. (p. 91)

- **Tabela 4.9.** Análise de variância – Modelo cúbico reduzido para crescimento do consórcio 2 em 14 horas. (p. 93)
- **Tabela 4.10.** Valores máximos do crescimento celular ( $\chi$ ) obtidos quando as concentrações de metais e gasolina são máxima, variando-se a concentração de EPS. (p. 94)

## SUMÁRIO

• <b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	01
• <b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica</b> .....	06
2.1. Petróleo e derivados – origem de hidrocarbonetos no ambiente .....	07
2.2.1. Gasolina .....	09
2.2. A Biotecnologia no tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos .....	11
2.2.1. Microrganismos envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos ..	12
2.2.2. Biodegradação de hidrocarbonetos .....	15
2.3. Fatores que afetam a biorremediação de hidrocarbonetos .....	16
2.4. A atenuação natural no tratamento de ambientes contaminados .....	18
2.5. Legislação .....	20
2.6. Contaminação por metais pesados .....	21
2.6.1. Tratamento de ambientes contaminados por metais pesados .....	24
2.6.1.1. Biorremediação de metais pesados .....	24
2.7. Efeito da co-contaminação sobre os microrganismos .....	29
2.8. EPS (substâncias poliméricas extracelulares) .....	30
2.8.1. Biossurfactantes .....	31
2.8.2. As EPS e sua aplicação na biorremediação de ambientes co-contaminados .....	33
• <b>Capítulo 3 – Material e Métodos</b> .....	36
3.1. Microrganismo usado para a produção de EPS e condições de manutenção .....	37
3.2. Meios de crescimento e produção de EPS .....	38
3.3. Construção da curva de peso seco .....	39
3.4. Construção das curvas de crescimento celular e consumo de substrato para <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	40
3.5. Extração e purificação da EPS produzida por <i>Paenibacillus polymyxa</i> ..	40
3.6. Captação de metais pesados pela EPS produzida por <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	41
3.7. Obtenção dos consórcios para os testes de biodegradação de gasolina ...	43
3.8. Experimentos de biodegradação em sistemas sintéticos co-contaminados .....	45



3.9. Experimentos para avaliação de crescimento/degradação empregando-se pré-inóculo cultivado a partir de diferentes fontes de carbono .....	47
3.10. Experimentos para localização dos metais durante o cultivo em sistemas co-contaminados .....	48
3.11. Avaliação da influência de EPS no crescimento do consórcio 2 na presença de metais e gasolina .. ..	50
3.12. Metodologia analítica .....	52
3.12.1. Quantificação da biomassa do consórcio microbiano – dosagem de proteínas .....	52
3.12.2. Quantificação de carboidratos .....	53
3.12.3. Quantificação dos metais .....	53
3.12.4. Quantificação dos hidrocarbonetos da gasolina .....	54
• <b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão</b> .....	55
4.1. Curva de peso seco para <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	55
4.2. Crescimento de <i>Paenibacillus polymyxa</i> e produção de EPS .....	56
4.3. Captação de metais pesados pela EPS produzida por <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	58
4.4. Experimentos realizados com o consórcio 1 .....	68
4.4.1. Curva padrão de BSA .....	68
4.4.2. Comportamento do consórcio 1 na presença de diferentes fontes de carbono .....	69
4.4.3. Efeito da presença de metais e EPS nos experimentos envolvendo somente glicose como fonte de carbono .....	70
4.4.4. Efeito de metais e EPS nos experimentos envolvendo glicose e gasolina como fontes de carbono .....	73
4.4.5. Efeito de metais e EPS nos experimentos envolvendo gasolina como única fonte de carbono .....	76
4.5. Experimentos com variação do pré-inóculo envolvendo o consórcio 2 ..	77
4.6. Experimentos para localização dos metais durante o cultivo em sistemas co-contaminados .....	82
4.6.1. Influência da presença de EPS no crescimento .....	83
4.6.2. Biorremediação de metais pesados .....	84
4.6.3. Consumo dos hidrocarbonetos da gasolina .....	87
4.7. Experimentos para determinação da melhor concentração de EPS para favorecer o crescimento celular .....	90
• <b>Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões</b> .....	96
5.1. Conclusões .....	97

5.2. Sugestões .....	100
• <b>Capítulo 6 – Referências Bibliográficas</b> .....	101

# ***Capítulo 1***

## ***Introdução***

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Derrames acidentais e propositais de petróleo e seus derivados, como a gasolina, têm sido uma fonte significativa de poluição ambiental por hidrocarbonetos. A fração BTEX da gasolina é considerada a de maior importância, uma vez que esses compostos são solúveis em água e trazem diversos malefícios à saúde, podendo causar até leucemia em exposições crônicas. O benzeno é classificado como carcinogênico, enquanto tolueno e xileno são classificados como tóxicos sistêmicos, e esses compostos são indicadores para caracterizar uma contaminação por gasolina (da Cunha, 2004; Corseuil *et al.*, 1997). Paralelamente, processos industriais como operações de exploração e descarga de efluentes resultam na liberação e acúmulo de metais pesados em ecossistemas aquáticos (Salehizadeh e Shojaosadati, 2003; Yilmaz, 2003). Vários metais são micro-nutrientes para quase toda maioria dos organismos vivos; porém, quando a concentração dos metais é altamente excessiva nos ambientes contaminados, eles podem se tornar tóxicos tanto para esses organismos como para os seres humanos (Chen *et al.*, 2005). Esse tipo de contaminação causa ameaças sérias para a saúde humana e dos animais, uma vez que os metais pesados tendem a persistir no ambiente indefinidamente (Jézéquel *et al.*, 2005).

A Biorremediação utiliza o potencial metabólico de microrganismos para limpar ambientes contaminados, e pode ser descrita como a conversão de compostos químicos por organismos viáveis, especialmente microrganismos com novas funções catabólicas derivadas de seleções genéticas ou metabólicas, em produtos não-tóxicos, como dióxido de carbono (via degradação aeróbia), água e sais inorgânicos simples ou, algumas vezes, metano (via degradação anaeróbia). As técnicas de biorremediação aceleram a degradação natural pela otimização de condições como suprimento de oxigênio para manutenção das condições aeróbicas, temperatura, pH, atividade da água, mistura, presença ou adição de uma população microbiana adequada (bioaumento), e/ou adição de nutrientes (bioestímulo), na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos,

umentando a população de microrganismos endógenos (Chaîneau *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2002; Watanabe, 2001; Bernoth *et al.*, 2000; Gutnick e Bach, 2000).

Por outro lado, os processos de acúmulo de metais pesados por células biológicas são chamados pelo termo geral “biossorção”, que pode ser considerada uma técnica alternativa para a remoção/recuperação de metais, devido a seus aspectos econômicos favoráveis (Volesky, 2003; Yilmaz, 2003). Esse tipo de sorção é baseado em uma fase sólida (sorvente ou biossorvente) que varia com o tipo de biomassa ou biomaterial (algas, bactérias, leveduras, fungos filamentosos, resíduos de operações industriais), e em uma fase líquida (solvente, normalmente água) contendo a (s) espécie (s) metálica (s) a ser (em) sorvida (s) (sorvato) (Volesky, 2003).

Sítios contaminados com misturas de metais e compostos orgânicos (sistemas co-contaminados) são um desafio em termos de remediação, por causa da natureza mista dos contaminantes (Mulligan *et al.*, 2001). Canais, rios e mares contaminados com despejos orgânicos contendo altas concentrações de metais pesados são de preocupação geral por serem persistentes e capazes de se acumular no ecossistema, causando vários prejuízos para o ambiente e a saúde (Al-Saleh and Obuekwe, 2005; Sannasi *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006). A presença de metais pesados pode inibir a microbiota envolvida na degradação de compostos orgânicos e afetar as taxas de biodegradação. O nível de inibição dependerá da concentração e disponibilidade dos metais pesados, e é dependente da ação de processos complexos controlados por múltiplos fatores, incluindo natureza dos metais, meio e espécies microbianas. Os metais pesados inibem o crescimento dos microrganismos por bloquearem seus grupos funcionais essenciais ou por interferirem na incorporação de íons metálicos essenciais às moléculas biológicas. Em alguns casos, os microrganismos são resistentes a alguns metais pesados por meio de diferentes mecanismos possíveis (Amor *et al.*, 2001).

As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) têm aplicação na biodegradação de contaminantes orgânicos, além de poderem ser usadas para remover metais de sistemas, devido à sua capacidade de complexação. Sua composição complexa

apresenta sítios de ligação potenciais para o seqüestro de íons metálicos (Mulligan *et al.*, 2001). Troca iônica, complexação com grupos funcionais negativamente carregados, adsorção e precipitação são mecanismos envolvidos na biossorção pela EPS (Zhang *et al.*, 2006). Sendo assim, o uso de EPS para reduzir a biodisponibilidade dos metais para as células parece ser uma alternativa eficiente no tratamento de ambientes onde a contaminação por metais acaba por prejudicar a biodegradação dos compostos orgânicos (Sandrin *et al.*, 2000).

Este trabalho tem como objetivo principal a aplicação de uma substância polimérica extracelular em um sistema sintético co-contaminado com gasolina e metais pesados –  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , a fim de avaliar seu efeito no processo de biodegradação dos hidrocarbonetos por um consórcio microbiano. Os objetivos específicos são:

- Produção e extração de uma EPS pela bactéria *Paenibacillus polymyxa*;
- Avaliação da capacidade de captação dos metais citados pela EPS com o uso de planejamento experimental;
- Obtenção de dois consórcios microbianos a partir de amostras de solo, com o uso de dois métodos de propagação diferentes;
- Avaliação do crescimento desses consórcios em meios de cultivo contendo glicose, gasolina, metais pesados e a EPS previamente produzida em diferentes combinações;
- Investigação do efeito causado no perfil de crescimento de inóculos do consórcio obtidos a partir de pré-inóculos cultivados em diferentes fontes de carbono;
- Localização dos metais pesados durante o cultivo em sistemas co-contaminados;
- Determinação da melhor concentração de EPS para favorecer o crescimento microbiano em um sistema co-contaminado.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial da Escola de Química da UFRJ, e os resultados obtidos foram apresentados em Congressos Nacionais (XVI SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007; X ENAMA – Encontro Nacional de Microbiologia Industrial, 2006; XV SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005) e Internacional (ENPROMER – 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress in Chemical Engineering – 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005), além de um artigo publicado na revista indexada *The Open Biotechnology Journal* (vol. 2, p. 176-182, 2008) sob o título “Evaluation of EPS application in microbial consortia growing in aqueous co-contaminated systems: the trend of natural attenuation”, e um segundo artigo sob avaliação na revista indexada *Brazilian Journal of Microbiology*, sob o título “Application of a bacterial extracellular polymeric substance in heavy metal adsorption in a co-contaminated aqueous system”.

# ***Capítulo 2***

## ***Revisão Bibliográfica***



## CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Petróleo e derivados – origem de hidrocarbonetos no ambiente

O petróleo, do latim *petroleum* (*petrus*, pedra, e *oleum*, óleo), no sentido de *óleo bruto*, é uma substância oleosa, inflamável, geralmente menos densa que a água, com cheiro característico e coloração que pode variar desde o incolor ou castanho claro até o preto, passando por verde e marrom (castanho). É uma combinação complexa de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos, podendo conter pequenas quantidades de nitrogênio, oxigênio, compostos de enxofre e metais (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Petr%C3%B3leo>).

O petróleo é um recurso natural abundante, porém sua pesquisa envolve elevados custos e complexidade de estudos. É também, atualmente, uma das principais fontes de energia, servindo de base para fabricação dos mais variados produtos, dentre os quais destacam-se o óleo diesel, a gasolina, o alcatrão, polímeros plásticos e até mesmo medicamentos (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Petr%C3%B3leo>).

Os hidrocarbonetos presentes no petróleo que fazem parte da fração saturada incluem os n-alcenos, alcenos ramificados e cicloalcenos (naftenos). Os hidrocarbonetos aromáticos são amplamente tóxicos e carcinogênicos, podendo causar vários danos ao ambiente, principalmente os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), que possuem dois ou mais anéis benzênicos condensados e apresentam baixa solubilidade em água. Os componentes aromáticos com maior aplicação na indústria são: benzeno, tolueno, etilbenzeno, estireno e xilenos (Pereira, 2006).

Uma vez que grandes quantidades de hidrocarbonetos são extraídos, produzidos, refinados e manuseados todos os anos, e apesar das melhorias para manuseio, transporte e retenção adequados, ainda há a possibilidade de que haja a contaminação de solos e,

conseqüentemente, de águas subterrâneas (Chaîneau *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005). Com a grande quantidade de combustível necessária para o uso em automóveis e aquecimento de casas, e o número de vezes que cada galão de petróleo é estocado, transportado ou transferido, acidentes e vazamentos são inevitáveis. A contaminação com petróleo resulta de vazamentos de tanques de estocagem superficiais ou subterrâneos, derramamentos durante o transporte de produtos do petróleo, sítios abandonados de manufatura de gasolina, entre outros (Sarkar *et al.*, 2005).

Essa liberação acidental de óleo causa sérios prejuízos para os ecossistemas naturais quando não administrados corretamente. No solo, apesar dos processos físicos e biológicos, os hidrocarbonetos podem persistir por bastante tempo (Chaîneau *et al.*, 2005). Entre os hidrocarbonetos poluentes, o óleo diesel, por exemplo, é uma mistura complexa de alcanos e compostos aromáticos que freqüentemente são relatados como contaminantes do solo, por escoamento de tanques de estocagem e oleodutos, ou liberados em derramamentos acidentais (Bento *et al.*, 2005).

Os hidrocarbonetos poliaromáticos têm uma grande afinidade pela matéria orgânica e partículas, e são acumulados em solo orgânico e sedimentos marinhos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos identificou 16 HPA como poluentes prioritários, oito dos quais são possíveis carcinogênicos humanos (Abbondanzi *et al.*, 2005). Esses compostos são contaminantes sem igual no ambiente, porque são gerados continuamente tanto por processos naturais como antropogênicos, como a combustão incompleta de matéria orgânica (incêndios florestais, aquecimento caseiro e incineração de despejos). Os sítios contaminados com HPA são, em sua maioria, encontrados nas cidades ou próximos a elas, representando um perigo considerável à saúde pública (Johnsen *et al.*, 2005). Sua persistência no ambiente se deve principalmente à baixa solubilidade em água. Por serem prontamente adsorvidos na matéria particulada, os sedimentos costais e marinhos tornam-se os últimos sítios de depósito para os HPA. Uma vez em ambiente marinho, podem ser bioacumulados em organismos aquáticos, podendo ser transferidos ao homem via frutos do mar. Os mangues, existentes ao longo das costas das regiões tropicais e subtropicais, estão

relacionados à atividade humana e são objetos desse tipo de contaminação. Essa classe de compostos é de interesse crescente devido a suas propriedades tóxicas, mutagênicas e, como dito anteriormente, carcinogênicas (Abbondanzi *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Potin *et al.*, 2004).

### 2.1.1. Gasolina

A gasolina é uma mistura complexa de várias centenas de compostos líquidos, voláteis e inflamáveis derivados do petróleo, contendo de 4 a 12 átomos de carbono e pontos de ebulição variando entre 30 a 225 °C. No Brasil, a gasolina pode ser de tipos “A” e “C”. A gasolina “A” é derivada diretamente da refinaria, e a gasolina “C” é a gasolina “A” com adição de aproximadamente 24% ± 1 de etanol (% v/v) (Wiedemann *et al.*, 2005).

Os compostos aromáticos (incluindo os compostos de baixo peso molecular conhecidos como BTEX – benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) compõem de 10 a 59 % (p/p) de gasolina, enquanto os hidrocarbonetos alifáticos compõem de 41 a 62 % (p/p) (Vieira *et al.*, 2007).

A gasolina pode conter também antioxidantes que têm como objetivo evitar a formação da chamada goma, proveniente da oxidação da fração que fica fortemente aderida às paredes do carburador e válvulas, impedindo um melhor desempenho. Os detergentes e dispersantes utilizados diminuem, consideravelmente, a formação de depósitos no sistema de alimentação, melhorando a “performance” do motor (da Cunha, 2004).

A fração BTEX da gasolina é considerada de maior importância no contexto ambiental uma vez que estes compostos, solúveis em água, são considerados substâncias perigosas por serem depressantes do sistema nervoso central, podendo causar leucemia em exposições crônicas. O benzeno é classificado como carcinogênico, enquanto tolueno e xileno são classificados como tóxicos sistêmicos. Desta forma, estes

compostos são indicadores específicos usados para caracterizar uma contaminação por gasolina (da Cunha, 2004; Corseuil *et al.*, 1997).

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, de forma geral, 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. A fração BTEX é a que primeiro vai atingir o lençol freático (Corseuil *et al.*, 1997).

De acordo com a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), de 1984 até setembro de 2007, 70,2 % dos acidentes que aconteceram no Estado de São Paulo envolveram liberação de gasolina, sendo que 30,8 % dessa liberação aconteceu a partir de tanques, e 15,9 % a partir de tubulações ([www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/estatisticas/revenda.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/estatisticas/revenda.asp)).

Uma grande variedade de processos físico-químicos tem sido utilizada na remoção de hidrocarbonetos de petróleo puros e dissolvidos na água subterrânea. Processos como extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, extração com solventes, incineração, torres de aeração, adsorção em carvão ativado, entre outros, têm sido usados para remover contaminantes orgânicos de águas subterrâneas e sistemas de solo subsuperficial. Esses processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas (contaminantes), tratar águas subterrâneas, e/ou descontaminar solos. No entanto, longos períodos de tempo e altos custos estão normalmente associados com a grande maioria dos processos utilizados para remediação de áreas contaminadas (Corseuil *et al.*, 1997).

## 2.2. A Biotecnologia no tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos

Um dos maiores impactos dos processos metabólicos microbianos na biotecnologia ambiental tem sido a exploração de caminhos para a biodegradação e conseqüente biorremediação de poluentes orgânicos no ambiente (Gutnick e Bach, 2000). O elevado potencial do uso de microrganismos na degradação de diversos tipos de substâncias, aliado ao cada vez mais freqüente uso da Biotecnologia, indicam o tratamento biológico como o mais eficiente meio de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos no meio ambiente (Alexander, 1999). Biorremediação é uma tecnologia que utiliza o potencial metabólico de microrganismos para limpar ambientes contaminados, e pode ser descrita como a conversão de compostos químicos por organismos viáveis, especialmente microrganismos com novas funções catabólicas derivadas de seleções, em produtos não-tóxicos, como dióxido de carbono (via degradação aeróbia), água e sais inorgânicos simples ou, algumas vezes, metano (via degradação anaeróbia). Uma importante característica da biorremediação é que ela é realizada em ambientes não estéreis que contêm uma variedade de organismos. As tecnologias de biorremediação aceleram a degradação natural pela otimização de condições como suprimento de oxigênio para manutenção das condições aeróbicas, temperatura, pH, atividade da água, mistura, presença ou adição de uma população microbiana adequada (bioaumento), uma vez que nenhum microrganismo sozinho é capaz de degradar todos os componentes do óleo cru, e/ou adição de nutrientes (bioestímulo), na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos, aumentando a população de microrganismos endógenos (Chaîneau *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2002; Watanabe, 2001; Bernoth *et al.*, 2000; Gutnick e Bach, 2000).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas como processos de tratamento *in-situ* ou *ex-situ*. Os processos de tratamento *in-situ* são baseados no estímulo à biodegradação natural de contaminantes na subsuperfície e da água, sem a escavação da camada superficial do solo, por meio do uso de bioaumento e bioestímulo,

definidos anteriormente (Ross, 1991). Por outro lado, os processos de tratamento *ex-situ* são aqueles que envolvem a remoção física do material contaminado do local original e o encaminhamento do mesmo para o processo de tratamento em si, que ocorre em outro local (Boopathy, 2000). Esses últimos são mais rápidos, fáceis de controlar e mais úteis para tratar uma larga gama de contaminantes e tipos de solos (Collina *et al.*, 2005).

Desta forma, a biorremediação é uma tecnologia simples de manter, aplicável em grandes áreas, barata, devido ao baixo valor agregado associado com sua aplicação comercial, e pode levar à completa destruição do contaminante, com sua mineralização a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Bento *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005). A manutenção dos fatores como pH, temperatura, aerobiose e suplemento de nutrientes é crítica para o sucesso da implementação de sistemas de biorremediação. Para assegurar uma aplicação prática, qualquer processo de biorremediação deve levar à remoção completa dos contaminantes como efeito primário da biodegradação, e a taxa de degradação deve ser maior do que a taxa de descontaminação natural (Bento *et al.*, 2005).

### **2.2.1. Microrganismos envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos**

Diferentes tipos de microrganismos estão envolvidos no processo de biodegradação, variando desde os que requerem oxigênio para realizar as reações catabólicas até aqueles que necessitam de um ambiente anaeróbio (Riser-Roberts, 1998). Dentre os organismos utilizados, as bactérias, que são capazes de degradar poluentes, geralmente possuem papéis principais na biorremediação, enquanto outros organismos, como fungos e protozoários, também afetam o processo. Um entendimento mais profundo da ecologia microbiana dos sítios contaminados é, portanto, necessário para uma posterior melhora dos processos de biorremediação (Rahman *et al.*, 2002; Watanabe, 2001; Gutnick e Bach, 2000).

Alguns microrganismos e comunidades microbianas possuem a capacidade de processar compostos recalcitrantes, frequentemente compostos xenobióticos que não

fazem parte do seu metabolismo central, transformando-os em compostos que são mais facilmente metabolizados (co-metabolismo). Devido à complexidade do óleo e seus derivados, a biodegradação por meio de culturas mistas é mais efetiva do que a biodegradação realizada por culturas puras, uma vez que uma ampla capacidade enzimática pode ser ativada e a possibilidade de formação de metabólitos intermediários tóxicos pode ser neutralizada pela seleção de degradadores desses produtos finais, formados principalmente pelo processo de co-metabolismo (Pereira, 2006).

A Tabela 2.1, a seguir, apresenta alguns microrganismos ou consórcios de microrganismos capazes de degradar alguns poluentes.

**Tabela 2.1.** Exemplos de algumas espécies de microrganismos ou consórcios de microrganismos com habilidade para degradar poluentes orgânicos (Liu *et al.*, 2004; Watanabe, 2001; Riser-Roberts, 1998).

Microrganismo ou consórcio	Alvo da degradação
<i>Syntrophus</i> spp.	Ácidos orgânicos, com a produção de acetato e hidrogênio
Duas espécies de <i>archae</i> : <i>Methanosaeta</i> e <i>Methanospirillum</i> e duas espécies de bactérias: uma do gênero <i>Desultotomaculum</i> e outra de gênero desconhecido.	Tolueno
Grupo <i>Azoarcus/Thauera</i> .	Alquil-benzenos e n-alcanos
<i>Brevibacterium erythogenes</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>Nocardia</i> sp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Alcanos ramificados
$\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ - <i>Proteobacteria</i> , principalmente os representativos do gênero <i>Pseudomonas</i> e <i>Sphingomonas</i> .	HPA
<i>Geobacter</i> spp.	Oxidação anaeróbica de benzeno

Nicholson e Fathepure (2005) verificaram a capacidade de bactérias endógenas da região de Great Salt Plains, um ambiente naturalmente hipersalino, em degradar compostos BTEX, e buscaram determinar o impacto da concentração de sal na taxa de degradação e na estrutura da comunidade bacteriana. Seus resultados mostraram que, em ambientes extremos, com nenhum histórico de fonte de contaminação, foi detectado o potencial de degradação rápida de poluentes tóxicos. A habilidade de melhorar a degradação de benzeno em uma larga faixa de concentrações de sal e as correspondentes mudanças na estrutura da comunidade microbiana, com proliferação de



diferentes espécies de acordo com a concentração salina, refletem um potencial natural de atenuação da cultura e sua habilidade de se adaptar a concentrações flutuantes de sal, freqüentemente encontradas na região.

### **2.2.2. Biodegradação de hidrocarbonetos**

No processo de biorremediação de solos, as bactérias são os principais microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, pois com o aumento da profundidade do solo, o número relativo de bactérias tende a aumentar, enquanto o número de fungos e actinomicetos diminuem. Este aumento da população bacteriana é atribuído à habilidade de as bactérias utilizarem outros aceptores de elétrons que não sejam o oxigênio (Pereira, 2006).

Os n-alcanos são considerados os compostos mais rapidamente degradados dentro da mistura de petróleo, tendo sido demonstrada a biodegradação de n-alcanos com cadeias acima de 44 átomos de carbono (n-C<sub>44</sub>) (Atlas, 1981). Os alcanos ramificados são mais difíceis de serem biodegradados quando comparados aos n-alcanos. A recalcitrância desses compostos cresce com o aumento das ramificações.

Os cicloalcanos são particularmente resistentes ao ataque microbiano. Compostos complexos alicíclicos, como os hopanos (tripentacíclicos), estão entre os componentes mais persistentes em ambientes contaminados por petróleo. Porém, alguns trabalhos demonstram que os cicloalcanos substituídos e não substituídos podem sofrer degradação oxidativa e co-oxidativa (Atlas, 1981).

Os hidrocarbonetos aromáticos, inclusive os HPA, podem ser degradados por uma ampla variedade de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e algas. Entretanto, a taxa de biodegradação desses hidrocarbonetos é inversamente proporcional ao número de anéis da molécula (os HPA de baixo peso molecular são degradados mais rapidamente do que os compostos de maior peso molecular). A taxa de biodegradação decresce com o aumento do número de anéis devido à redução da solubilidade desses

compostos em água e ao aumento da energia de ressonância dos anéis. Sendo assim, os hidrocarbonetos de baixo peso molecular, tais como naftaleno e fenantreno, são rapidamente degradados. Já os HPA de alto peso molecular como o benzo(a)antraceno, criseno ou benzo(a)pireno, são praticamente resistentes à ação dos microrganismos presentes no solo (Pereira, 2006).

De acordo com Aichberger e colaboradores (2005), em certas condições ambientais, o grau de biodegradação dos hidrocarbonetos é afetado principalmente pelo tipo de hidrocarboneto na matriz contaminada. Das várias frações do petróleo, n-alcanos e alcanos ramificados de comprimento intermediário ( $C_{10}$ - $C_{20}$ ) são os substratos preferidos dos microrganismos e tendem a ser mais rapidamente degradados. Alcanos de cadeia longa ( $> C_{20}$ ) são hidrofóbicos sólidos e são difíceis de degradar devido a suas características recalcitrantes e baixa solubilidade em água. Os cicloalcanos são degradados mais lentamente do que os n-alcanos e alcanos ramificados. Uma seqüência generalizada dos componentes do petróleo em ordem decrescente de biodegradabilidade é representada a seguir: n-alcanos > alcanos ramificados > n-alkil aromáticos de baixo peso molecular > monoaromáticos > alcanos cíclicos > aromáticos polinucleares > > asfaltenos (Pereira, 2006).

### **2.3. Fatores que afetam a biorremediação de hidrocarbonetos**

A persistência dos contaminantes de petróleo depende da quantidade e da qualidade da mistura de hidrocarbonetos e das propriedades do ecossistema afetado. Em um ambiente contaminado, os hidrocarbonetos do petróleo podem persistir indefinidamente, entretanto, sob outras condições, os mesmos hidrocarbonetos podem ser completamente biodegradados em poucas horas ou dias (Atlas, 1981).

Segundo Pereira (2006), as condições dos sítios contaminados irão ditar a composição das comunidades microbianas endógenas, afetando diretamente a

degradação dos contaminantes presentes. Sendo assim, fatores que influenciam as taxas de crescimento microbiano e as atividades enzimáticas afetam a biodegradação dos hidrocarbonetos. Tais fatores incluem: composição química do contaminante, estado físico (líquido, lama, borra), relação C:N:P, umidade e solubilidade, reatividade química, volatilidade, pH, temperatura, demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO) (Atlas, 1981).

Assumindo a presença de microrganismos, a disponibilidade de nutrientes – especialmente nitrogênio e fósforo – parece ser o fator limitante mais comum. De acordo com Pereira (2006), experimentos laboratoriais e de campo utilizando nitrogênio inorgânico e fertilizantes de fosfato, incluindo ossos de peixe, carne de animais ou peixe, biosurfactantes e outros agentes, têm sido bem sucedidos.

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ocorrer sob uma ampla escala de temperatura, e microrganismos psicrófilos, mesófilos e termófilos têm sido isolados. Baixas temperaturas podem resultar em baixa atividade microbiana e em uma baixa disponibilidade de contaminantes para os microrganismos (Salminen *et al.*, 2004). Entretanto, Atlas (1981) relata a degradação de hidrocarbonetos em temperaturas abaixo de 0 °C, assim como a 70 °C.

O oxigênio é utilizado pelos microrganismos tanto como acceptor final de elétrons nos processos aeróbios, quanto como substrato para as reações de biodegradação catalisadas pelas enzimas oxigenases (reações de clivagem do anel, hidroxilação de compostos cíclicos e aromáticos e oxidação de compostos alifáticos). Entretanto, em ambientes onde existe carência de oxigênio, outros aceptores de elétrons podem ser utilizados pelos microrganismos, tais como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , permitindo a degradação de hidrocarbonetos sob condições anaeróbicas (Pereira, 2006).

Ainda, fatores como pH, presença de contaminantes tóxicos, concentração ou ausência de co-substratos-chave podem inibir a biodegradação dos compostos orgânicos. Solos que possuem pH muito ácido ou muito básico, por exemplo, possuem

uma influência negativa sobre a população degradadora de hidrocarbonetos (Pereira, 2006).

#### **2.4. A atenuação natural no tratamento de ambientes contaminados**

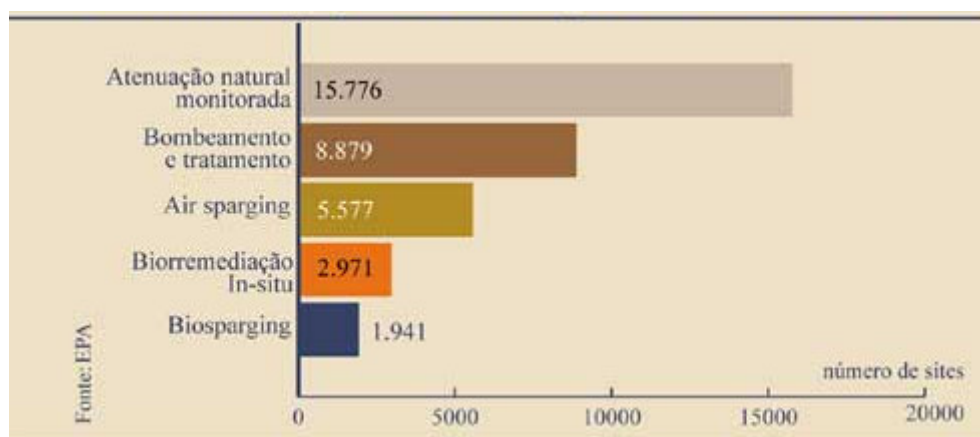
A limpeza de água contaminada por petróleo (água de zonas abaixo da superfície) é um desafio. Uma grande mudança ocorreu nos últimos cinco anos, com o reconhecimento comprovado de que processos de atenuação natural podem contribuir, de forma significativa, para controle e redução das plumas de contaminação no solo e águas subterrâneas (Nobre e Nobre, 2007; Van Stermpvoort *et al.*, 2007). Com diversas denominações – atenuação natural, bioatenuação, biorremediação intrínseca, remediação natural e atenuação natural monitorada (ANM) – essa tecnologia de remediação vem ganhando popularidade e se solidificando no mercado como uma alternativa viável para os casos em que são confirmadas as condições biogeoquímicas favoráveis à ocorrência das reações naturais (Nobre e Nobre, 2007).

A atenuação natural é uma estratégia de gerenciamento de solos e sedimentos contaminados, onde a noção de que alguns processos de transformação de compostos-alvo envolvendo metabolismo microbiano *in-situ* é auto-sustentável, apropriado para o tipo de contaminação e suficiente em magnitude para controlar o risco associado aos poluentes locais (Serrano *et al.*, 2008). Tais processos são diluição, volatilização, biodegradação, adsorção e reações químicas com materiais presentes em subsuperfície ([http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia\\_03.htm](http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_03.htm)). Mecanismos biotecnológicos para a redução de metais pesados e poluentes orgânicos consistem em usar e aumentar os processos naturais para tratar despejos específicos (Srinath *et al.*, 2002).

A atenuação natural não é uma “não ação”, embora seja freqüentemente encarada como se fosse. Ela é largamente usada em outros países; deve ser utilizada para se determinar concentrações e tempos de remediação, sendo necessária uma

extensa caracterização da área ([http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia\\_03.htm](http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_03.htm)). A atenuação natural monitorada pode ser um procedimento efetivo de remediação de solos e águas subterrâneas quando utilizada em conjunto a outras tecnologias ou simplesmente como uma única alternativa desde que comprovada ao longo de um tempo de monitoramento (Nobre e Nobre, 2007).

Um trabalho de diagnóstico correto e a implantação de um programa de ANM podem reduzir consideravelmente o valor das remediações e evitar uma nova intervenção humana no local contaminado. Nos Estados Unidos, onde o mercado ambiental se encontra bem desenvolvido, a maior parte dos programas para remediação de contaminações provocadas por tanques subterrâneos é feita por atenuação natural (Figura 2.1). Lá há quase 16 mil programas de ANM para contaminações de tanques, contra apenas 3 mil biorremediações *in-situ* com a mesma finalidade (Furtado, 2007).



**Figura 2.1.** Uso da atenuação natural monitorada nos EUA em contaminação de tanques subterrâneos (Furtado, 2007).

A seguir são apresentados alguns fatores que podem limitar a aplicabilidade e eficiência do processo de ANM ([http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia\\_03.htm](http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_03.htm)):

- Dificuldade para obter dados para se determinar os parâmetros do modelo;
- Exigência de modeladores com alta experiência técnica;
- As degradações intermediárias podem ser mais móveis e seus produtos mais tóxicos do que o contaminante original;
- Deve ser utilizada em áreas onde não ocorram impactos para receptores;
- Os contaminantes podem migrar antes de serem degradados.

## **2.5. Legislação**

De acordo com da Cunha (2004), até aquela data ainda não havia no Brasil uma legislação em nível federal para proteção ou remediação de solos e águas subterrâneas, existindo somente algumas leis em níveis locais, como no Estado de São Paulo. A Resolução nº 357 do CONAMA dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, além de estabelecer as condições e padrões de lançamento de efluentes. No que diz respeito a alguns contaminantes orgânicos, a Tabela 2.2. apresenta tais padrões.

**Tabela 2.2.** Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes de alguns hidrocarbonetos (Fonte: Resolução CONAMA nº 357).

Parâmetro	Valor máximo (µg/L)	
	Águas doces – classe 1 <sup>a</sup>	Águas salinas – classe 1 <sup>b</sup>
Benzeno	5L	700
Etilbenzeno	90	25
Tolueno	2,0	215
Xileno	300	n.d.*

a, b – Classificação da qualidade das águas de acordo com a presença ou não de efeitos tóxicos a organismos, materiais flutuantes, óleos e graxas, substâncias que produzem odor e turbidez, corantes, resíduos sólidos objetáveis e coliformes termotolerantes, e valores de carbono orgânico total, oxigênio dissolvido e pH, entre outros.

n.d. – Valores não disponíveis.

O valor de intervenção adotado pela CETESB indica “o limite de contaminação do solo e água subterrânea acima do qual há risco potencial à saúde humana. Ele será usado em caráter corretivo no gerenciamento de áreas contaminadas e quando for excedido irá requerer alguma forma de intervenção na área avaliada, de forma a interceptar as vias de exposição, devendo ser efetuada uma avaliação de risco caso a caso” (da Cunha, 2004).

## 2.6. Contaminação por metais pesados

Alguns processos industriais, como operações de exploração e descarga de efluentes, resultam na liberação e acúmulo de metais pesados em ecossistemas aquáticos, o que têm aumentado a preocupação com os efeitos dos metais pesados tóxicos como poluentes ambientais (Salehizadeh e Shojaosadati, 2003; Yilmaz, 2003). Exemplos de alguns íons metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,

$Mn^{4+}$ ,  $Na^+$  e  $Ni^{2+}$  são micro-nutrientes para a maioria dos organismos vivos; porém, quando a concentração dos metais é altamente excessiva nos ambientes contaminados, eles podem se tornar tóxicos tanto para esses organismos como para os seres humanos (Chen *et al.*, 2005). Assim, o uso de depósitos por longos períodos na agricultura leva à acumulação de metais pesados no solo. As plantas podem acumular esses metais e ser, conseqüentemente, uma possível contaminação na cadeia alimentar, levando a efeitos deletérios em todas as formas de vida. Esse tipo de contaminação causa ameaças sérias para a saúde humana e a dos animais, uma vez que os metais pesados tendem a persistir no ambiente indefinidamente (Jézéquel *et al.*, 2005).

De acordo com Cordeiro (2006), nos últimos anos, o avanço no conhecimento sobre a toxicidade dos metais pesados e seus efeitos nocivos levou à implementação de restrições legais mais rígidas em relação à prevenção da contaminação de ecossistemas naturais. Entretanto, em vista dos benefícios que os metais pesados têm produzido para a sociedade, contribuindo para o desenvolvimento de bens que podem representar uma melhoria na qualidade de vida das populações, a ameaça que representam ao meio ambiente deve ser enfrentada por meio da busca de métodos eficientes e de custos adequados para a remoção desses poluentes dos ambientes contaminados.

Os metais pesados mais comumente associados com atividades antropogênicas incluem chumbo ( $Pb^{2+}$ ), cádmio ( $Cd^{2+}$ ), cobre ( $Cu^{2+}$ ), cromo ( $Cr^{3+}$ ), níquel ( $Ni^{2+}$ ), ferro ( $Fe^{2+}$ ), mercúrio ( $Hg^{2+}$ ) e zinco ( $Zn^{2+}$ ) (Mulligan, 2005). Dentre eles, serão brevemente discutidos aspectos sobre o cádmio, zinco e cobre, objetos deste trabalho.

### • Cádmio

Devido a sua alta toxicidade, o cádmio se juntou ao chumbo e ao mercúrio formando o chamado “big three” de metais pesados com grande potencial de perigo para humanos e para o ambiente. Os usos industriais de cádmio estão difundidos e aumentam com o uso de eletrorefino, pigmentos de tintas, plásticos e baterias de prata-cádmio (Volesky, 1990). Na agricultura, o cádmio está presente em fertilizantes



minerais e orgânicos, e devido à agricultura intensiva, é possível encontrar esse metal em níveis significativos em algumas superfícies (Jézéquel *et al.*, 2005).

O descarte de cádmio em águas naturais é, em parte, derivada da indústria de eletrorefino, que contava, em 1990, com cerca de 50 % do consumo anual de cádmio nos Estados Unidos. Outras fontes de contaminação da água são a indústria de baterias de níquel-cádmio e as operações de fundição, que são pequenas em número, mas de grande significância como poluidoras, freqüentemente afetando o ambiente a distâncias da ordem de 100 km de magnitude (Volesky, 1990).

Uma doença conhecida como “Itai-Itai”, no Japão, é especificamente associada ao envenenamento por cádmio, resultando em múltiplas fraturas devido a osteomalacia. Esse metal tende a se acumular no corpo humano, com 33 % nos rins e 14 % no fígado. Envenenamentos crônicos por cádmio produzem proteinúria e causam a formação de pedras nos rins. Há evidências de relação entre cádmio e hipertensão. O principal problema com cádmio em humanos parece ser o fato de que o corpo raramente excreta a quantidade de cádmio que absorve. Nos Estados Unidos, o nível seguro de cádmio adotado para a água potável é de 10 ppb (Volesky, 1990).

- **Cobre e zinco**

Cobre é um dos metais mais comuns na indústria. Zinco também é bastante usado na indústria, principalmente em processos de galvanização e na manufatura de bronze e outras ligas. Há muitas atividades industriais envolvendo esses dois metais; conseqüentemente, há numerosas fontes de efluentes industriais que descartam zinco e cobre no ambiente (Volesky, 1990).

A absorção de excesso de cobre no homem causa a chamada “doença de Wilson”, na qual esse excesso de cobre é depositado no cérebro, na pele, no fígado, no pâncreas e no miocárdio. Zinco é um dos metais pesados menos tóxicos, e na verdade é

um elemento essencial para as células vivas. Entretanto, todos os elementos são eventualmente tóxicos se presentes e absorvidos em excesso, e zinco não é uma exceção (Volesky, 1990).

### **2.6.1. Tratamento dos ambientes contaminados por metais pesados**

Métodos de tratamento dos efluentes contaminados com metais consistem em precipitação química e filtração, oxidação ou redução química, extração com solvente, diálise, extração eletrolítica, cementação, osmose reversa, métodos evaporativos, resinas de troca iônica, adsorção em carvão, utilização de ácidos orgânicos e inorgânicos e agentes complexantes como EDTA, e diluição. Significantes esforços têm sido feitos na busca de novos mecanismos para a remoção de metais pesados de sítios contaminados (Akar e Tunali, 2005; Kachlany *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2001). Tipo de solo e pH, capacidade de troca catiônica (CEC), tamanho da partícula, permeabilidade e contaminantes afetam a eficiência da remoção (Mulligan *et al.*, 2001).

#### **2.6.1.1. Biorremediação de metais pesados**

Os processos físicos e químicos para remoção de metais são caros e complexos, e a busca por métodos econômicos, efetivos e seguros leva às técnicas biológicas para remover metais. Os processos de acúmulo de metais pesados por células biológicas são chamados pelo termo geral “biossorção”, que pode ser considerada uma técnica alternativa para a remoção/recuperação de metais, devido a seus aspectos econômicos favoráveis (Volesky, 2003; Yilmaz, 2003). Esse tipo de sorção é baseado em uma fase sólida (sorvente ou biossorvente) que varia com o tipo de biomassa ou biomaterial (algas, bactérias, leveduras, fungos filamentosos, resíduos de operações industriais), e em uma fase líquida (solvente, normalmente água) contendo a (s) espécie (s) metálica (s) a ser (em) sorvida (s) (solvato). A habilidade que o biossorvente tem de

servir diferentes espécies metálicas iônicas de soluções aquosas é importante, uma vez que elimina a necessidade de pré-tratamentos químicos caros dos ambientes contaminados, que acabam resultando na produção de lamas tóxicas que eventualmente causam mais problemas, uma vez que a recuperação de metais dessas lamas é mais difícil e muitas vezes economicamente inviável (Volesky, 2003).

Horsfall Jr. e colaboradores (2006) descreveram a cinética de adsorção de  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  em solução aquosa usando biomassa proveniente de resíduos vegetais do plantio da mandioca tratada com ácido tioglicólico, salientando a importância do uso de rejeitos agrícolas nos processos de biorremediação de metais, por serem biodegradáveis, baratos e prontamente disponíveis.

Segundo Cordeiro (2006), a captação de metais também pode se dar por meio de um processo ativo onde há a chamada bioacumulação, que consiste em um processo de remoção de metais que depende da atividade metabólica de um organismo vivo que envolve o transporte do metal pela membrana da célula, podendo ocorrer em seguida a transformação do metal. Sugere-se que os sistemas de transporte do metal pela célula ocorram por gradiente eletroquímico de próton ou por difusão passiva alternando com mecanismo de sorção e dessorção. O crescimento de biomassa viva na presença de substratos como glicose (ligações carbono-carbono) e cisteína (ligações S e N) pode contribuir para o seqüestro de grandes quantidades de metais no processo de bioacumulação.

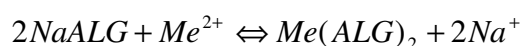
As características biológicas e químicas dos processos de captação são importantes, não apenas para ajudar na compreensão do papel dos íons metálicos em funções celulares básicas, mas também como um auxílio para a desintoxicação de efluentes industriais devido ao uso de biomassa para proteger o ambiente (Yilmaz, 2003).

Alguns mecanismos de ligação de metais a biossorventes já foram sugeridos, como: quimiossorção por troca iônica, complexação, coordenação, quelatação, adsorção física e microprecipitação. Há ainda possíveis reações de oxidação/redução que ocorrem

no bioissorvente. Dependendo do tipo de bioissorvente e da solução de metais, é possível que alguns desses mecanismos atuem simultaneamente em vários níveis. É necessário ter em mente que a ligação dos íons metálicos à biomassa sólida pode ser física ou química. Assim, enquanto o termo sorção é não-específico, o termo adsorção implica em atração física e deposição na superfície, ao contrário da quimiossorção, que é baseada nos mecanismos químicos de atração através do material permeável às espécies iônicas (Volesky, 2003). Desta forma, o mecanismo de captação por microrganismos é um processo complexo que depende da química dos íons metálicos; do tipo e características da biomassa; da fisiologia das células; do processo físico-químico envolvido; e da influência físico-química dos micro-ambientes em contato com os microrganismos (pH inicial da solução, temperatura, interação com outros íons e concentração do metal) (Chen *et al.*, 2005; Volesky, 2003).

- **Troca iônica** (Volesky, 2003)

A troca iônica é o intercâmbio de íons formados por espécies moleculares ou atômicas pelo ganho ou perda de elétrons. As propriedades de troca iônica de certos polissacarídeos naturais vêm sendo estudadas em detalhes, e sabe-se, por exemplo, que íons metálicos bivalentes trocam com íons de grupos ativos de polissacarídeos como o ácido algínico (*ALG*):



- **Adsorção** (Volesky, 2003)

A adsorção é um processo pelo qual moléculas aderem a superfícies sólidas. A atração pode ser baseada nas cargas eletrostáticas. A adsorção negativa é a adsorção de espécies positivas por sítios de adsorção negativos e vice-versa para a adsorção positiva. Enquanto o termo adsorção implica em um fenômeno superficial, o termo seqüestro

pode ser usado baseado tanto em fenômenos físicos (adsorção física) como em uma variedade de meios de ligação química (quimiossorção).

A adsorção física é não-específica, e as forças de atração entre as moléculas e a superfície sólida são relativamente fracas, o que leva a um declínio rápido da quantidade de espécies adsorvidas quando a temperatura é aumentada. A quimiossorção é específica e envolve forças muito mais fortes. As moléculas adsorvidas são envolvidas na superfície por forças de valência do mesmo tipo das que ocorrem entre átomos nas moléculas. Exemplos de quimiossorção são a complexação de metais e a quelação.

Algumas condições que influenciam o processo de bioissorção estão listadas a seguir.

- **Efeito da temperatura (Volesky, 2003)**

Considerando que a entalpia global das interações metal-bioissorvente é diferente de zero, uma dependência da temperatura irá ocorrer na bioissorção de metais. As mudanças na temperatura irão afetar vários fatores de importância na bioissorção do íon metálico, tais como:

- ✓ A estabilidade da espécie iônica presente inicialmente na solução;
- ✓ A presença de ligantes competidores;
- ✓ A constante de ionização da água, com efeito direto no pH da solução;
- ✓ A estabilidade do complexo bioissorvente-metal (dependendo dos sítios de bioissorção).

De acordo com Volesky (2003), a ligação de íons cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) à alga *Ascophyllum nodosum* aumentou em 50-70 % quando a temperatura foi aumentada de 4 °C para 23 °C. O aumento da temperatura para 40 °C causou apenas um pequeno

aumento na captação, enquanto a 60 °C começa a haver perda da capacidade de sorção devido à deterioração do material. Assim, para aplicações práticas de biossorção, deve ser usada uma faixa estreita de temperatura.

### • Influência do pH

O valor do pH da solução é de grande importância tanto na biossorção catiônica quanto na aniônica. Entretanto, o pH ótimo da biossorção aniônica é oposto ao da biossorção catiônica. Enquanto esta é favorecida em valores de pH maiores que 4,5, a adsorção aniônica se dá em valores de pH na faixa de 1,5 – 4,0 (Volesky, 2003).

Existem três formas nas quais o pH influencia a biossorção do metal (Volesky, 2003):

- 1) O estado dos sítios quimicamente ativos pode ser alterado pelo pH da solução. Quando os grupos ligantes do metal são fracamente ácidos ou básicos, a disponibilidade dos sítios livres depende do pH;
- 2) Valores extremos de pH, como os empregados para a regeneração (dessorção) do sorvente, podem danificar a estrutura do biossorvente;
- 3) A espécie do metal na solução é dependente do pH, uma vez que os metais em soluções aquosas ocorrem como íons hidrolisados quando o pH é baixo, especialmente ânions metálicos altamente carregados e com tamanho pequeno.

Segundo Volesky (1990), no caso da captação, por células de *Chlorella vulgaris*, de íons metálicos classificados como intermediários entre cátions de metais “soft” e “hard”, incluindo  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{U}^{4+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , o comportamento do biossorvente se assemelha à ligação desses íons às resinas de troca catiônica que contêm primariamente grupos amino ou carboxila. Quando os sítios ativos também

podem ligar prótons, geralmente ocorre uma dependência do pH, o que sugere que os íons metálicos e os prótons competem pelos mesmos sítios de ligação. Assim, as ligações cátion-biossorvente ocorrem mais fortemente quando o pH aumenta de 2 para 5, por diminuir a concentração de íons  $H^+$  presentes.

- **Competição entre os íons**

Metais como  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Cr^{3+}$ , por apresentarem características químicas de coordenação semelhantes, acabam competindo substancialmente entre si por sítios de ligação do biossorvente, devido às propriedades químicas semelhantes, como por exemplo o raio iônico (Volesky, 2003).

## **2.7. Efeito da co-contaminação sobre os microrganismos**

Derrames acidentais e propositais de óleo cru têm sido uma fonte significativa de poluição ambiental, assim como as indústrias de polimento de metais. A determinação e a caracterização da natureza da poluição combinada é um problema de interesse. Canais, rios e mares contaminados com despejos orgânicos contendo altas concentrações de metais pesados, são de preocupação geral por serem persistentes e capazes de se acumular no ecossistema, causando vários prejuízos para o ambiente e a saúde (Sannasi *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Al-Saleh and Obuekwe, 2005). O trabalho desenvolvido por Adeniyi e Afolabi (2002) visou examinar os níveis de contaminação por hidrocarbonetos poliaromáticos e metais pesados em solos da metrópole de Lagos, na Nigéria, causada pela presença de refinarias de petróleo, sem regulamentação e diretrizes próprias.

De acordo com Srinath e colaboradores (2002), a acumulação de metais pesados por microrganismos freqüentemente se dá em duas fases: uma fase inicial rápida envolvendo adsorção física ou troca iônica na superfície celular, e uma fase lenta

subseqüente, envolvendo transporte ativo do metal para o interior das células, dependente do metabolismo. Durante a bioacumulação, muitas características da célula viva, como seqüestro intracelular seguido de localização dentro de organelas específicas, ligação pela metalotioneína, acumulação de metal particulado, precipitação extracelular e formação de complexos podem ocorrer (Srinath *et al.*, 2002).

Desta forma, a presença de metais pesados pode inibir a microbiota envolvida na degradação de compostos orgânicos e afetar as taxas de biodegradação. O nível de inibição dependerá da concentração e disponibilidade dos metais pesados, e é dependente da ação de processos complexos controlados por múltiplos fatores, incluindo a natureza dos metais, meio e espécies microbianas. Os metais pesados inibem os microrganismos por bloquearem seus grupos funcionais essenciais ou por interferir na incorporação de íons metálicos essenciais de moléculas biológicas. Em alguns casos, os microrganismos são resistentes a alguns metais pesados por meio de diferentes mecanismos possíveis (Amor *et al.*, 2001).

## **2.8. EPS (substâncias poliméricas extracelulares)**

Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são produtos metabólicos de microrganismos e que acumulam na superfície celular, formando uma barreira protetora para as células contra o ambiente externo, e também servindo como reserva de carbono e energia durante a falta de substrato. As EPS também têm a função de sorção de íons inorgânicos que constituem elementos metabólicos para bactérias. Sua composição é complexa, e constituída principalmente de polissacarídeos, proteínas, substâncias húmicas, ácido urônico, ácido nucleico e lipídeos, que dependem da linhagem microbiana e das condições de cultivo. (Comte *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2006; Liu e Fang, 2002). Importantes tipos de EPS usados para aumentar a solubilidade de hidrocarbonetos são os biossurfactantes, discutidos mais profundamente no item 2.8.1.



### 2.8.1. Biossurfactantes

Surfactantes são compostos anfifílicos (contendo porções hidrofóbicas e hidrofílicas), que reduzem a energia livre de um sistema por reporem a maior parte das moléculas de mais energia em uma interface. Sua porção hidrofóbica apresenta pequena afinidade pelo meio, e seu grupo hidrofílico é atraído pelo meio. Os monômeros do surfactante formam esferóides ou estruturas lamelares com interiores de pseudo-fases orgânicas, o que diminui as tensões superficial e interfacial. A concentração mínima na qual isso acontece é chamada de concentração micelar crítica (CMC). Salinidade, comprimento da cadeia carbônica e tipo de surfactante influenciam essa concentração (Mulligan *et al.*, 2001). O uso de surfactantes sintéticos no tratamento de sistemas contaminados com hidrocarbonetos melhora a restauração dessas áreas aumentando a área superficial para o ataque microbiano; entretanto, pode promover o acúmulo no ecossistema causando sérios problemas no ambiente (Cunha *et al.*, 2004).

Várias substâncias com as propriedades anteriormente descritas podem ser sintetizadas por organismos vivos, como plantas e microrganismos, e por isso são considerados surfactantes naturais. Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, diminuindo a tensão superficial e com alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes, e são subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos (Nitschke e Pastore, 2002). Embora a maioria dos microrganismos produtores de biossurfactantes seja aeróbica, existem alguns exemplos de produtores anaeróbicos, como *Bacillus licheniformis* JF-2 (Mulligan *et al.*, 2001).

As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, lipídeos neutros, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. A maioria desses compostos é aniônica ou neutra, e apenas alguns poucos são catiônicos, como os que contêm grupos amino. Todos possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica, geralmente composta por cadeia carbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados (hidróxi-ácidos graxos) ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster,

um grupo hidróxi, fosfato, aminoácido, peptídeo cíclico, álcool, carboxilato ou carboidrato (Nitschke e Pastore, 2002; Mulligan *et al.*, 2001). Suas concentrações micelares críticas geralmente alcançam entre 1 e 200 mg/L, e seus pesos moleculares vão de 500 a 1500 unidades de massa atômica (Mulligan *et al.*, 2001).

Os biossurfactantes são sintetizados como co-produtos metabólicos de alguns microrganismos. A composição e o rendimento dependem do desenho do fermentador, pH, composição nutricional, substrato, temperatura e tempo de cultivo. Eles apresentam vantagens como alta especificidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Mulligan *et al.*, 2001). Apesar da variedade de biossurfactantes, a grande maioria possui características comuns (Nitschke e Pastore, 2002):

- Atividade superficial e interfacial: são mais efetivos que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante;
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: podem ser usados em ambientes em condições mais drásticas;
- Biodegradabilidade: são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos;
- Baixa toxidez: podem ser usados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

Uma das importantes aplicações industriais dos biossurfactantes é a biorremediação, visto que esses compostos são uma alternativa viável ao uso de surfactantes. Por aumentarem a interação superficial água/óleo, eles aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos, promovendo a biorremediação de águas e solos. Sua capacidade de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água

aumenta a degradação desses compostos no ambiente (Cunha *et al.*, 2004; Nitschke e Pastore, 2002).

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo, e na biorremediação de locais contaminados com metais pesados. Também podem ser usados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir esses compostos (Nitschke e Pastore, 2002).

Em seu trabalho, Mulligan e colaboradores (2001) citaram que os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UG2 são capazes de remover uma mistura de hidrocarbonetos de um solo arenoso, e o grau de remoção depende do tipo de hidrocarboneto removido e da concentração de surfactante usada. Pesquisas com *Pseudomonas marginalis* indicaram que o biossurfactante produzido por esse microrganismo solubilizou HPA como fenantreno e aumentou a biodegradação. Segundo Cunha e colaboradores (2004), *Serratia* sp. SVGG16 mostrou habilidade para produzir biossurfactantes, além de degradar hidrocarbonetos presentes na gasolina e produzir dioxigenases, que são enzimas-chave no processo de biodegradação (Cunha *et al.*, 2004).

### **2.8.2. As EPS e sua aplicação na biorremediação de ambientes co-contaminados**

De acordo com Mulligan (2005), além de os biossurfactantes terem aplicação na biodegradação de contaminantes orgânicos, também podem ser usados para remover metais de sistemas, devido à sua capacidade de complexação. Sua composição complexa apresenta sítios de ligação potenciais para o seqüestro de íons metálicos. Vários autores descrevem a utilização dessas substâncias na biossorção de metais pesados (Zhang *et al.*, 2006; Maslin e Maier, 2000; Nitschke e Pastore, 2000). Troca

iônica, complexação com grupos funcionais negativamente carregados, adsorção e precipitação são mecanismos envolvidos na biossorção pela EPS (Zhang *et al.*, 2006).

A EPS pode ser parcialmente dissolvida, e apenas uma pequena parte é removida da solução por centrifugação ou filtração. A EPS de baixo peso molecular (EPS dissolvida) que permanece em solução é capaz de se ligar a uma quantidade significativa de metal, levando assim a uma subestimação da capacidade ligante da EPS (Guibaud *et al.*, 2005a; Guibaud *et al.*, 2005b).

Desta forma, os biopolímeros desempenham um importante papel na remoção de metais de soluções. Segundo Guibaud e colaboradores (2003), a quantidade de metal ligado às células é proporcional à quantidade de polímeros em cada uma. No tratamento secundário de plantas de tratamento de efluentes, os metais tóxicos descartados no ambiente pelas indústrias são adsorvidos por biomassa e removidos do efluente juntamente com o lodo formado, e tal adsorção é atribuída às EPS (Guibaud *et al.*, 2005a; Guibaud *et al.*, 2005b).

A inibição, induzida por metais, da atividade microbiana heterotrófica normal tem sido bastante documentada. Assim, em sítios co-contaminados, pode ser necessário o uso de tratamentos seqüenciais ou combinados que se dirijam aos dois tipos de contaminantes separadamente para atingir os objetivos da remediação (Maslin e Maier, 2000). Estratégias efetivas para melhorar a biodegradação de compostos orgânicos na presença de metais pesados incluem a redução da concentração biodisponível de metais tóxicos e a redução das interações entre tais metais e a célula. Em seu trabalho, Sandrin e colaboradores (2000) realizaram um sistema experimental para determinar o efeito de um ramnolipídeo, que é uma EPS produzida por *Pseudomonas aeruginosa* 9027, na capacidade de degradação de um contaminante orgânico por um microrganismo sensível a metais. Seus resultados sugerem que o ramnolipídeo reduz a inibição causada por cádmio na degradação de naftaleno por meio da combinação da complexação de cádmio e liberação de lipopolissacarídeos pela célula. Desta forma, o uso de EPS para reduzir a biodisponibilidade dos metais para as células parece ser uma alternativa eficiente no

tratamento de ambientes onde a contaminação por metais acaba por prejudicar a biodegradação dos compostos orgânicos.

Marçano (2004) realizou experimentos envolvendo crescimento de *Pseudomonas putida* e *Serratia* sp. em meios contendo naftaleno, acrescidos ou não de cádmio. Seus resultados mostraram que ambas culturas eram capazes de metabolizar o hidrocarboneto, e a adição do metal, em altas concentrações, causou uma inibição no crescimento desses microrganismos. A adição de biossurfactantes minimizou os efeitos negativos causados pelo cádmio na degradação do naftaleno, uma vez que, além de aumentarem a solubilidade e disponibilidade do hidrocarboneto, possivelmente também funcionaram como agentes quelantes do metal, diminuindo seu efeito tóxico sobre o metabolismo das bactérias.

De forma contrária às referências encontradas na literatura, nesta tese trabalhamos com baixas concentrações de metais pesados e contaminantes orgânicos, o que se assemelha mais às condições de co-contaminação encontrada em sistemas aquáticos, além de usarmos consórcios microbianos ao invés de culturas puras para os experimentos de biodegradação.

# ***Capítulo 3***

## ***Material e Métodos***

## CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Microrganismo usado para a produção de EPS e condições de manutenção

Para a produção da substância polimérica extracelular (EPS) foi utilizada a bactéria Gram-positiva formadora de esporos *Paenibacillus polymyxa*, isolada de lingüiças fermentadas, de acordo com Piuri e colaboradores (1998).

A cultura era mantida em tubos de ensaio contendo gelose cuja composição é descrita na Tabela 3.1. O pH foi ajustado para 7,0 com o uso de HCl ou NaOH, ambos 1 mol/L, e o meio foi esterilizado com o uso de autoclave, a 0,5 atm por 15 minutos. Após o repique, os tubos eram mantidos entre 25 – 30 °C, por dois dias, e depois desse período eram estocados em geladeira. A cultura era renovada a cada dois meses, a partir de novos repiques.

**Tabela 3.1.** Composição do meio de manutenção de *Paenibacillus polymyxa*.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	1,5
Extrato de lêvedo	10,0
Peptona	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0
Agar-agar	30,0

### 3.2. Meios de crescimento e produção de EPS

Para a produção da EPS, três meios de cultivo foram testados e avaliados quanto à composição, turvação após inóculo (indicativo de crescimento) e tratamento pós-produção, que consistia na extração da EPS do meio de cultivo. As composições dos meios são apresentadas na Tabela 3.2. O pH de todos foi ajustado para 7,0 com HCl ou NaOH, ambos 1 mol/L. Todos foram esterilizados com o uso de autoclave a 0,5 atm, por 15 minutos.

**Tabela 3.2.** Composição dos meios de crescimento testados para *Paenibacillus polymyxa*.

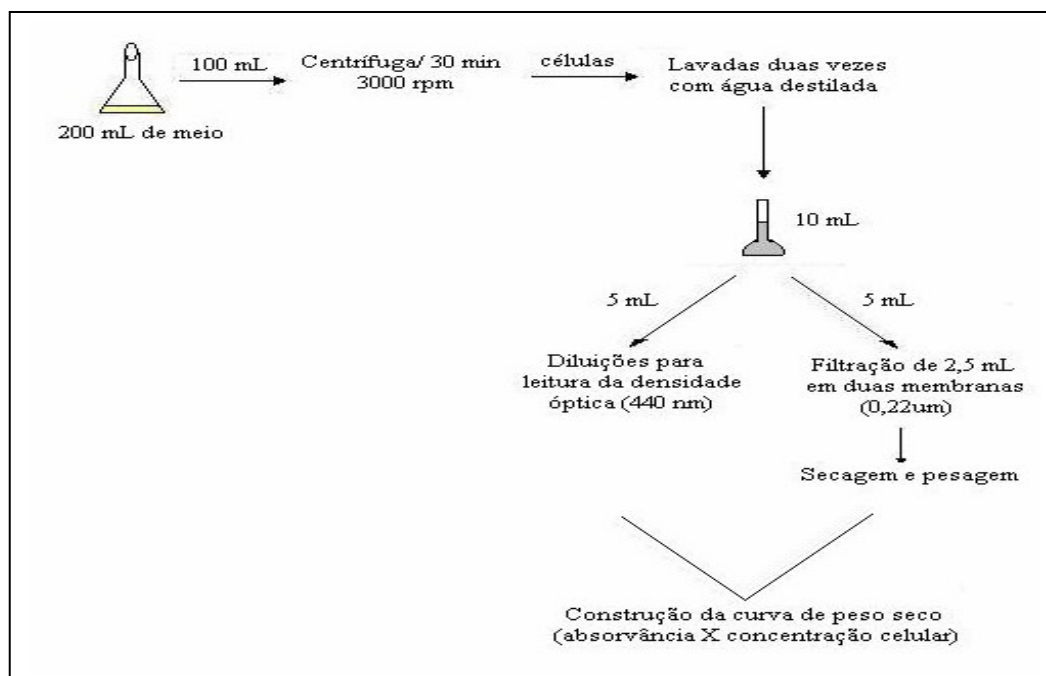
Componente	Concentração (g/L)		
	Meio 1 (Piuri <i>et al.</i> , 1998)	Meio 2 (Fonseca <i>et al.</i> , 2007)	Meio 3 (Sharma <i>et al.</i> , 2001)
Glicose	1,5	---	---
Sacarose	---	10,0	5,0
Peptona	10,0	---	---
Extrato de lêvedo	10,0	---	0,15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0	---	---
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	---	3,0	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	6,6	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	---	0,2	0,41
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	---	6,0	---
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	---	0,001	---



Os meios contendo os microrganismos foram mantidos sob agitação de 150 rpm e 30 °C, em agitador New Brunswick Scientific. O crescimento foi avaliado após 2 dias.

### 3.3. Construção da curva de peso seco

Após a seleção do melhor meio para cultivo, foi construída uma curva de peso seco para *Paenibacillus polymyxa*: o microrganismo foi cultivado por 24 horas em 200 mL do meio pré-selecionado. Em seguida, foram centrifugados 100 mL do meio em centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R, a 3000 rpm por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com água destilada e ressuspensas em balão volumétrico de 10 mL, dos quais 5 mL foram filtrados em duas membranas de 0,22 µm (2,5 mL em cada) previamente taradas. As células foram secas e pesadas, e com esses resultados foi possível obter a concentração celular (massa de células presente em 2,5 mL de meio). Dos 5 mL restantes foram feitas várias diluições para determinação da densidade óptica, a 440 nm, com o uso de espectrofotômetro CamSpec, modelo M302. Um esquema simplificado desse procedimento é apresentado na Figura 3.1.



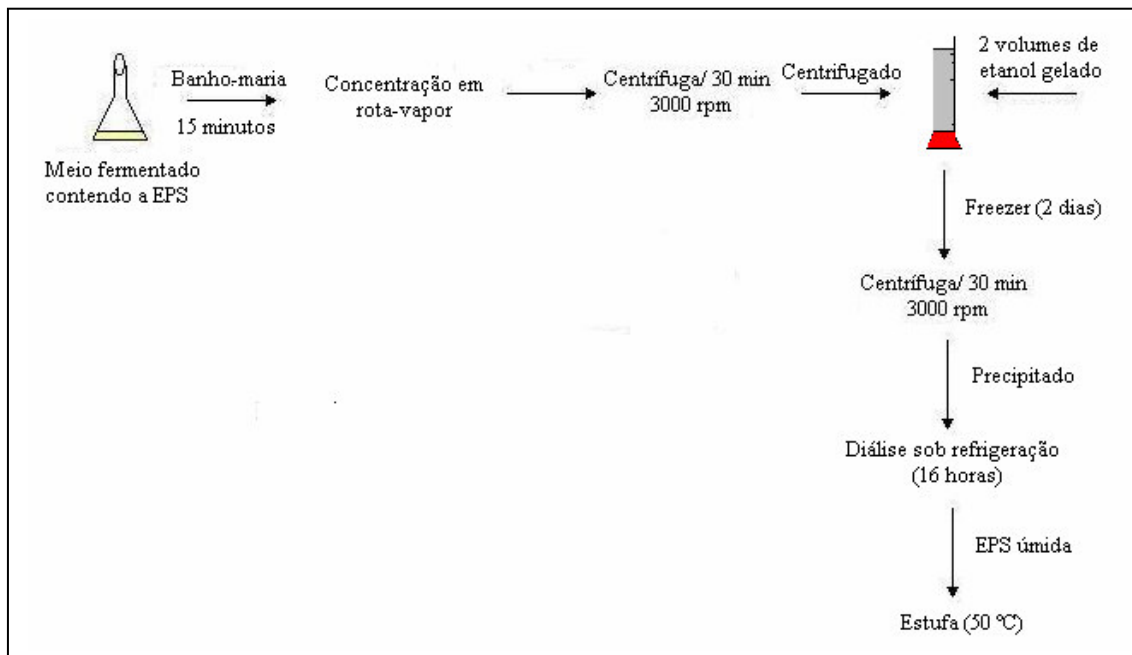
**Figura 3.1.** Procedimento para construção da curva de peso seco.

### **3.4. Construção das curvas de crescimento celular e consumo de substrato para *Paenibacillus polymyxa***

Com o objetivo de se conhecer melhor o comportamento de *Paenibacillus polymyxa*, foram construídas as curvas de crescimento celular e consumo de substrato, seguindo os seguintes passos: foram retirados 4 mL do meio de cultivo pré-selecionado, a cada duas horas, e centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos em centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R. O sobrenadante foi recolhido para dosagem de substrato, e as células foram ressuspensas em 4 mL e homogeneizadas para determinação da densidade ótica, a 440 nm, com o uso de espectrofotômetro CamSpec, modelo M302.

### **3.5. Extração e purificação da EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa***

Após 15, 20, 24, 30 e 48 horas de processo, o meio de cultivo foi submetido a aquecimento em banho-maria, por 15 minutos, e em seguida foi concentrado com o uso de um Rota-vapor marca Fisatom, modelo 802. A partir daí foi realizada uma centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, em centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R. O volume do centrifugado foi medido para adição de 2 volumes de etanol gelado. Essa mistura foi mantida em freezer por 2 dias, para precipitação da EPS, e após esse período foi centrifugada para obtenção da EPS impura. Esta, por sua vez, foi submetida à diálise por 16 horas, em água destilada e sob refrigeração, e posteriormente seca em estufa a 50 °C até peso constante. A Figura 3.2 apresenta um esquema simplificado desse processo.



**Figura 3.2.** Esquema simplificado do processo de extração e purificação parcial da EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa*.

Com as massas obtidas nos tempos mencionados, foi possível construir uma curva de concentração de EPS *versus* tempo, a fim de se conhecer o momento ideal no qual deve ser interrompido o processo para se obter a maior massa de EPS produzida.

### 3.6. Captação de metais pesados pela EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa*

A avaliação da capacidade de captação pela EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa* foi feita empregando-se planejamento experimental.

Para o preparo das soluções de metais foram usados os sais  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Os experimentos foram realizados sob as seguintes condições: concentração variável de EPS, concentração de cada metal igual a 50 ppm em um volume final de 20 mL, em frascos com 50 mL de capacidade, e agitação

moderada de 125 rpm. As concentrações finais de EPS e os tempos de adsorção são apresentados na Tabela 3.3. As amostras de controle foram feitas sem a adição de EPS.

**Tabela 3.3.** Níveis máximos e mínimos dos fatores.

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Tempo de adsorção (h)	8	16	24
Concentração de EPS (g/L)	0,01	0,13	0,25
Metal	Cd <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>

A biossorção de Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> de soluções aquosas foi avaliada por experimentos fatoriais de três níveis (Tabela 3.3). O planejamento experimental foi um experimento 3<sup>k</sup>, onde 3 denota o número de níveis e *k* denota o número de fatores: concentração de EPS – *C*<sub>EPS</sub>; tempo de adsorção – *t*; e tipo de metal – *M1*, *M2*, *M3* (cádmio, zinco e cobre, respectivamente). Foram realizados trinta e nove experimentos, mais dois brancos para cada metal, onde não houve adição de EPS, para avaliação da capacidade de captação (*q*, em mg/g, de acordo com a Equação 3.1) e eficiência de remoção (*η*, em %, de acordo com a Equação 3.2).

$$q = \frac{C_M - C_{MF}}{C_{EPS}} \quad (3.1)$$

$$\eta = \frac{C_M - C_{MF}}{C_M} \times 100 \quad (3.2)$$

onde *C*<sub>*M*</sub> e *C*<sub>*MF*</sub> são, respectivamente, as concentrações inicial e final dos íons metálicos (mg/L), e *C*<sub>EPS</sub> é a concentração de EPS (g/L).

O procedimento de amostragem e quantificação dos metais encontra-se descrito no item 3.12.3 deste capítulo.

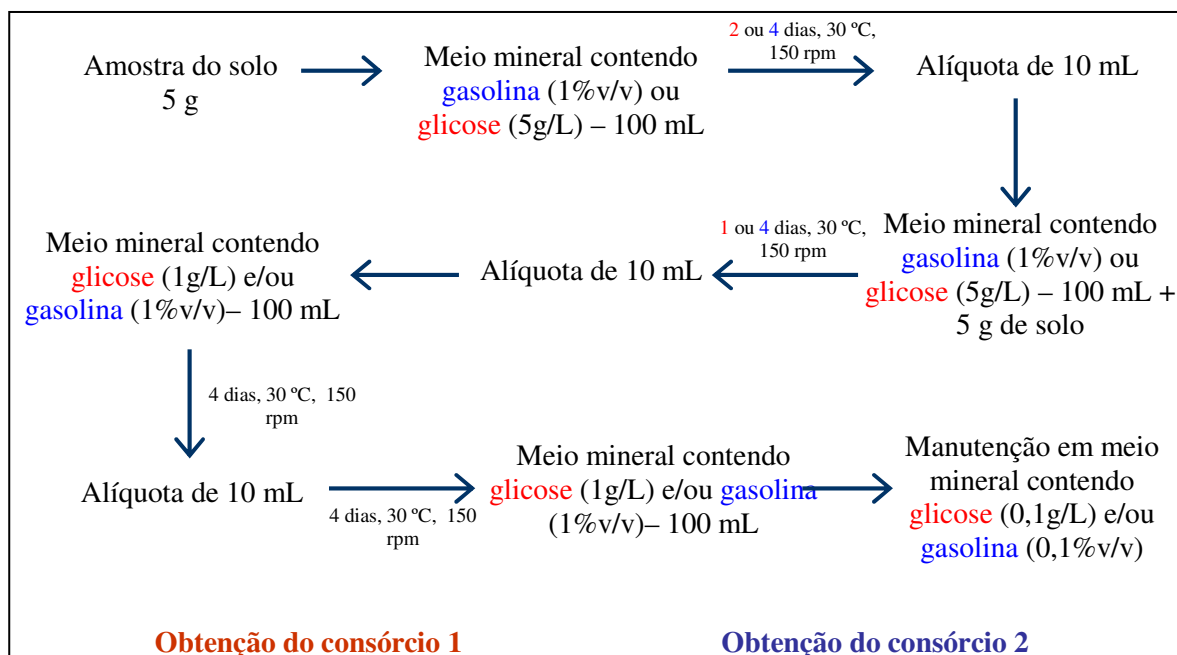
Os resultados foram analisados com o uso do *software* DESIGN EXPERT 6.0.4, e os efeitos principais e as interações entre os fatores foram determinados. O efeito de um fator é definido como a mudança na resposta produzida por uma mudança no nível do fator (Carmona *et al.*, 2005).

### **3.7. Obtenção dos consórcios para os testes de biodegradação de gasolina**

Os consórcios utilizados nos experimentos de biodegradação de gasolina foram obtidos a partir de uma amostra de solo coletada da Escola de Química – UFRJ. A propagação foi feita de duas formas diferentes: na primeira, segundo Thompson e colaboradores (2005), 5 gramas do solo foram misturados a 100 mL de meio mineral, cuja composição se encontra na Tabela 3.4, ao qual foram acrescentados 5 g/L de glicose para estimular a população microbiana total que, de acordo com os autores, poderia aumentar as chances de serem obtidos isolados que também utilizassem gasolina posteriormente. A mistura foi mantida sob agitação de 150 rpm a 30 °C, em agitador New Brunswick Scientific, por 48 horas. Depois desse período, uma alíquota de 10 mL foi retirada desse meio e transferida para 100 mL de meio mineral, também contendo 5 g do solo e 5 g/L de glicose. Essa nova mistura ficou sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 10 mL foi retirada e transferida para um novo frasco, contendo 100 mL de meio mineral, 1 g/L de glicose e 1,0 % (v/v) de gasolina tipo “A”, obtida na Reduc (RJ), a fim de selecionar a população capaz de consumir gasolina. A mistura foi mantida também a 150 rpm e 30 °C, por 4 dias. Este último procedimento foi repetido mais uma vez, e a manutenção do consórcio foi feita em meio mineral líquido, contendo 0,5 g/L de glicose e 0,1 % (v/v) de gasolina, sob refrigeração. O consórcio microbiano obtido por meio dessa técnica foi chamado de “consórcio 1”.

Na segunda técnica de propagação do consórcio, a metodologia utilizada foi similar à descrita anteriormente, sendo que não foi usada glicose para a propagação

inicial, e sim 1 % (v/v) de gasolina, e cada mistura foi mantida em agitação por 4 dias, como tem sido conduzido de modo geral nos trabalhos da literatura e nos laboratórios. O consórcio microbiano obtido por meio dessa técnica foi chamado de “consórcio 2”. Um esquema simplificado desses procedimentos é apresentado na Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Procedimento realizado para obtenção dos consórcios 1 e 2.

Uma vez que a turvação do meio contendo o consórcio 2 foi fraca, não claramente indicando se realmente houve crescimento celular ou se era resultado de partículas de solo em suspensão, após as sucessivas transferências na etapa de propagação foram realizados plaqueamentos a partir da última etapa. Os meios utilizados foram gelose TSA e gelose de mesma composição do meio mineral, ambas contendo glicose (0,5 g/L para o meio mineral) ou gasolina (0,1 ou 1,0 % (v/v)). A Tabela 3.4 também apresenta a composição do meio TSA.

**Tabela 3.4.** Composição dos meios mineral e TSA.

Componentes	Concentração (g/L)	
	Meio mineral	Meio TSA
KNO <sub>3</sub>	3,0	---
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	---
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	---
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	---
NaCl	5,0	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	2,5
Triptona	---	17,0
Glicose	---	2,5
Extrato de lêvedo	---	2,5

O pH dos meios foi ajustado a 7,0 com HCl ou NaOH, ambos 1 mol/L. No preparo das geloses, foi utilizado agar-agar 20 g/L. Os meios foram esterilizados com o uso de autoclave a 0,5 atm e 15 minutos.

### 3.8. Experimentos de biodegradação em sistemas sintéticos co-contaminados

Os experimentos envolveram meios contendo glicose, gasolina, solução da mistura dos metais (Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>) e EPS, em várias combinações e usando o consórcio propagado pela primeira técnica (consórcio 1). O meio usado foi o meio mineral descrito na Tabela 3.4. A Tabela 3.5. apresenta os experimentos realizados.

Para obtenção do inóculo, foi preparado previamente pré-inóculo em frasco Erlenmeyer de 1 L de capacidade, contendo 400 mL de meio mineral, adicionado de

0,5 g/L de glicose e 0,1 % (v/v) de gasolina. A partir desse crescimento foi então obtido um volume de inóculo para iniciar os experimentos com densidade ótica inicial de 0,05, medida com o uso de um espectrofotômetro CamSpec modelo M302 a 440 nm.

**Tabela 3.5.** Condições dos experimentos envolvendo o consórcio 1.

Experimento	Meio mineral contendo			
	Glicose 0,5 g/L	Gasolina 0,1 % (v/v)	Metais 1 ppm	EPS 0,05 g/L
G	sim	não	não	não
Gas	não	sim	não	não
GGas	sim	sim	não	não
GasEPS	não	sim	não	sim
GGasEPS	sim	sim	não	sim
GM	sim	não	sim	não
GMEPS	sim	não	sim	sim
GasM	não	sim	sim	não
GasMEPS	não	sim	sim	sim
GMGas	sim	sim	sim	não
GMGasEPS	sim	sim	sim	sim

G – meio mineral contendo somente glicose

Gas – meio mineral contendo somente gasolina

GGas – meio mineral contendo glicose e gasolina

GasEPS – meio mineral contendo gasolina e EPS

GGasEPS – meio mineral contendo glicose, gasolina e EPS

GM – meio mineral contendo glicose e metais

GMEPS – meio mineral contendo glicose, metais e EPS

GasM – meio mineral contendo gasolina e metais

GasMEPS – meio mineral contendo gasolina, metais e EPS

GMGas – meio mineral contendo glicose, metais e gasolina

GMGasEPS – meio mineral contendo glicose, metais, gasolina e EPS



A concentração de metais (1 ppm) usada foi escolhida por ser relativamente mais alta do que a máxima encontrada em ambientes co-contaminados com gasolina e metais e permitida pela legislação vigente (Resolução nº 357 – CONAMA), e a concentração de EPS usada foi cinco vezes maior do que a obtida no planejamento experimental (esse dado será apresentado no capítulo 4: Resultados e Discussão), para evitar erros decorrentes da amostragem, uma vez que a concentração de EPS seria muito baixa.

Quatro mililitros de amostra foram retirados a cada 6 horas, durante cerca de 3 a 4 dias. Essas amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 30 minutos, em centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R, e o sobrenadante, quando fosse o caso, era reservado para dosagem de substrato (glicose). O crescimento celular foi determinado como descrito no item 3.12.1.

### **3.9. Experimentos para avaliação de crescimento/degradação empregando-se pré-inóculo cultivado a partir de diferentes fontes de carbono**

De acordo com Lee e colaboradores (2003), a adição de uma fonte de carbono mais acessível pode aumentar a biorremediação *in situ* por estimular o crescimento dos microrganismos capazes de degradar contaminantes. Desta forma, foi avaliado o crescimento do consórcio 2 (propagado de gasolina) em meio contendo glicose e/ou gasolina, a partir de dois pré-inóculos com fontes de carbono diferentes: também glicose e gasolina. A Tabela 3.6, a seguir, apresenta os experimentos realizados. Neles, a concentração de glicose utilizada foi 0,5 g/L, a de gasolina foi 0,1 % (v/v), e a de cada metal ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) foi 1 ppm. Os pré-inóculos foram obtidos em frascos Erlenmeyer de 1 L de capacidade, contendo 400 mL de meio mineral, adicionado da fonte de carbono correspondente. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio mineral, adicionado da (s) fonte (s) de carbono correspondente (s), com ou sem metais. Os experimentos

foram iniciados com densidade ótica igual a 0,05, medida com o uso de um espectrofotômetro CamSpec modelo M302 a 440 nm.

**Tabela 3.6.** Condições dos experimentos com variação da fonte de carbono do pré-inóculo.

Experimento	Fonte de carbono do pré-inóculo	Condições de crescimento
1	Glicose	Glicose
2	Glicose	Gasolina
3	Glicose	Glicose + gasolina
4	Glicose	Glicose + metais
5	Glicose	Gasolina + metais
6	Gasolina	Glicose
7	Gasolina	Gasolina
8	Gasolina	Glicose + gasolina
9	Gasolina	Glicose + metais
10	Gasolina	Gasolina + metais

### 3.10. Experimentos para localização dos metais durante o cultivo em sistemas co-contaminados

Os experimentos para localização dos metais foram realizados com o consórcio 2, em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio mineral, adicionado de 0,1 % (v/v) de gasolina e 1 ppm de cada metal pesado ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ), além de um frasco contendo apenas EPS (0,05 g/L) para verificar a possibilidade do consumo desta. Uma suspensão de EPS foi adicionada a alguns

frascos, em uma concentração final de 0,05 g/L. Após 30 horas de incubação a 30 °C e 150 rpm em agitador New Brunswick Scientific, foi retirada uma amostra do meio para quantificar a fração BTEX da gasolina, e outra amostra foi obtida para as medidas de metais pesados. Um frasco de controle sem inóculo foi usado para avaliar as perdas abióticas da gasolina.

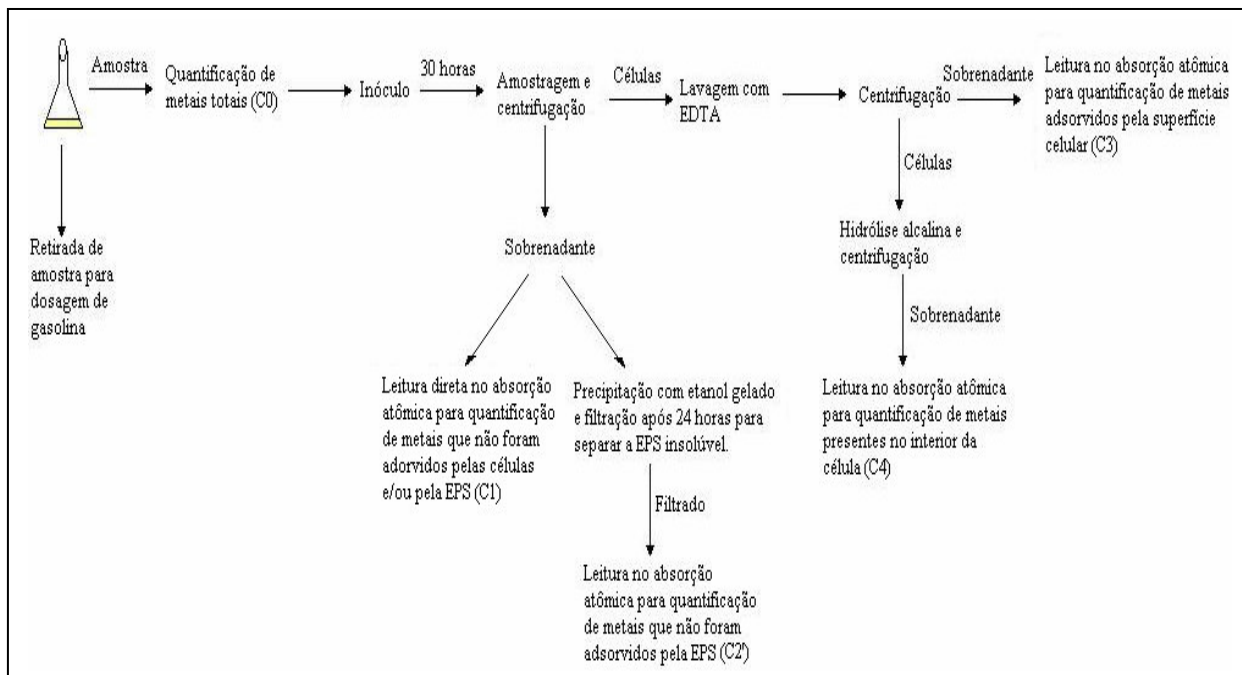
Conforme descrito no item 3.9, para obtenção do inóculo foi preparado previamente um pré-inóculo com o uso de meio mineral e gasolina (0,1 % (v/v)) como fonte de carbono.

Nestes experimentos, os metais pesados foram quantificados em cinco frações diferentes: C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>.

Antes da adição do inóculo, uma amostra do meio foi obtida para quantificar a concentração inicial de metais (C<sub>0</sub>). Ao final do experimento, outra amostra foi retirada e centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos, em centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R, para separação das células, que por sua vez foram guardadas para análises posteriores. O sobrenadante foi dividido em duas partes: a primeira foi usada para medida da concentração total de metais solúveis após 30 horas (C<sub>1</sub>), e a segunda foi usada para quantificar a concentração de metais adsorvidos na EPS (C<sub>2</sub>) após precipitação com etanol gelado. Esse sistema foi filtrado com uso de uma membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro para separar a EPS precipitada, e o filtrado foi usado para determinar os metais solúveis (C<sub>2</sub>'). C<sub>2</sub> foi determinado pela diferença entre C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>'.

As células obtidas anteriormente foram lavadas com 35 mL de uma solução de EDTA a 10 mM. O sistema foi centrifugado em uma centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R, nas mesmas condições descritas acima, e o sobrenadante foi usado para determinar a concentração de metais adsorvidos na superfície celular (C<sub>3</sub>). As células foram ressuspensas em 35 mL de água destilada, e a suspensão foi hidrolisada com 10 % (v/v) de NaOH 1 M, a 100 °C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas como já descrito, e o sobrenadante foi usado para quantificar a concentração de metais no interior da célula (C<sub>4</sub>).

A Figura 3.4 apresenta o esquema simplificado do procedimento adotado para a obtenção das diversas amostras usadas nas quantificações de metais.



**Figura 3.4.** Esquema simplificado do procedimento realizado para amostragem e quantificação de metais nos experimentos de localização dos metais.

### 3.11. Avaliação da influência de EPS no crescimento do consórcio 2 na presença de metais e gasolina

A fim de se verificar a concentração ideal de EPS para favorecer o crescimento celular em um sistema aquoso co-contaminado com gasolina e metais pesados ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ), foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  (2 níveis e 3 fatores) com ponto central nas condições apresentadas na Tabela 3.7., de forma codificada.

**Tabela 3.7.** Condições dos experimentos do planejamento experimental.

Experimento	Concentração de gasolina	Concentração de cada metal	Concentração de EPS
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

A Tabela 3.8 apresenta os níveis dos fatores do planejamento experimental.

**Tabela 3.8.** Níveis máximos e mínimos dos fatores.

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Concentração de gasolina (% (v/v))	0,1	0,55	1,0
Concentração de cada metal (ppm)	1	3	5
Concentração de EPS (g/L)	0,01	0,03	0,05

O planejamento foi realizado com quintuplicata do ponto central (experimento 9).

Todos os experimentos foram realizados em frascos de 50 mL de capacidade, contendo 20 mL de meio mineral, com utilização do consórcio 2. O inóculo foi obtido conforme descrito anteriormente no item 3.9. Para cada tomada de amostra foi usado um frasco diferente, e as amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item 3.12.1.

Com as curvas de crescimento obtidas, foi escolhido o tempo que correspondeu ao maior crescimento, e esse tempo foi a variável de resposta. Os resultados foram analisados com o uso do *software* DESIGN EXPERT 6.0.4.

### **3.12. Metodologia analítica**

#### **3.12.1. Quantificação da biomassa dos consórcios microbianos – dosagem de proteínas**

O crescimento microbiano foi determinado indiretamente pela dosagem de proteínas. Quatro mililitros de amostra foram retirados do meio e centrifugados a 3500 rpm por 30 minutos, em centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R. As células foram ressuspensas em 2 mL e homogeneizadas com o uso de um vórtex Phoenix AP56. A seguir, a 1 mL dessa nova suspensão foi adicionado 0,1 mL de solução de NaOH 1 mol/L, em tubos eppendorf, para lise celular a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga Sigma, modelo D3752-0. Do sobrenadante foram retirados 400 µL para quantificação de proteínas pelo Método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Após a reação, foi realizada a leitura da absorvância das amostras em espectrofotômetro CamSpec, modelo M302, a 660 nm.

Para poder relacionar a absorvância das amostras com a concentração de proteínas, foi preciso construir uma curva padrão de uma proteína (BSA – albumina

bovina). Diferentes concentrações de BSA foram submetidas às reações do Método de Lowry, o que resultou em uma curva Absorvância *versus* Concentração protéica.

### 3.12.2. Quantificação de carboidratos

Para quantificação de substrato, foi utilizado o kit Doles Glucol 500, que emprega o método da glicose-oxidase, no qual a glicose é oxidada a ácido glucônico por ação da enzima. O peróxido de hidrogênio produzido, na presença de peroxidase, 4-aminofenazona e fenol (presentes no reativo de trabalho), forma uma quinoneimina, com um pico de absorção a 510 nm. A intensidade da cor formada após a reação é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Assim, a 20 µL da amostra contendo glicose foram adicionados 2 mL do reativo de trabalho. A mistura foi incubada por 10 minutos a 37 °C, sendo em seguida feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro CamSpec, modelo M302, a 510 nm. A concentração da amostra, em g/L, é feita pela relação entre a sua absorvância e a do padrão de glicose, de concentração 1 g/L.

Quando o substrato utilizado no meio de cultivo era sacarose, foi preciso realizar uma hidrólise prévia desse açúcar, com a adição de 1 mL de HCl 2 N a 1 mL de amostra. A mistura foi aquecida a 65 – 70 °C por 10 minutos, e após esse tempo foi realizado um tratamento com 3 mL de NaOH 1 N.

### 3.12.3. Quantificação dos metais

Terminado o processo de captação, 4 mL de cada amostra foram levadas a tubos de ensaio contendo 8 mL de etanol gelado, e mantidos sob refrigeração por 24 horas. Após esse tempo, a mistura presente em cada frasco foi filtrada para separação da EPS insolúvel, e os filtrados obtidos foram utilizados na quantificação dos metais por absorção atômica.

A quantificação dos metais residuais em solução, após os testes de captação, foi realizada por meio de espectrometria de absorção atômica, com o uso de um espectrômetro Perkin Elmer, modelo 3100. A chama usada foi ar/acetileno, e os comprimentos de onda para cada metal foram: 228,8 nm (Cd), 213,9 nm (Zn) e 324,8 nm (Cu).

#### 3.12.4. Quantificação dos hidrocarbonetos da gasolina

A quantificação da fração BTEX da gasolina residual foi feita com o uso de um cromatógrafo a gás Trace Thermofinnigan, acoplado a um auto-amostrador headspace Tekmar Dohrmann 7000, cujas condições estão descritas na tabela abaixo (Tabela 3.9). As áreas dos picos e os tempos de retenção foram comparados com padrões de referência, e as injeções foram feitas em triplicata.

**Tabela 3.9.** Condições para análise em cromatografia gasosa.

Parâmetro	Condições
Coluna	Megabore 30 m x 0,53 mm
Programação da temperatura da coluna	45 °C por 1 min Gradiente de 12 °C/min até 200 °C 200 °C por 3 min
Gás de arraste	He (5 mL/min)
Injetor	230 °C
Detector FID	250 °C



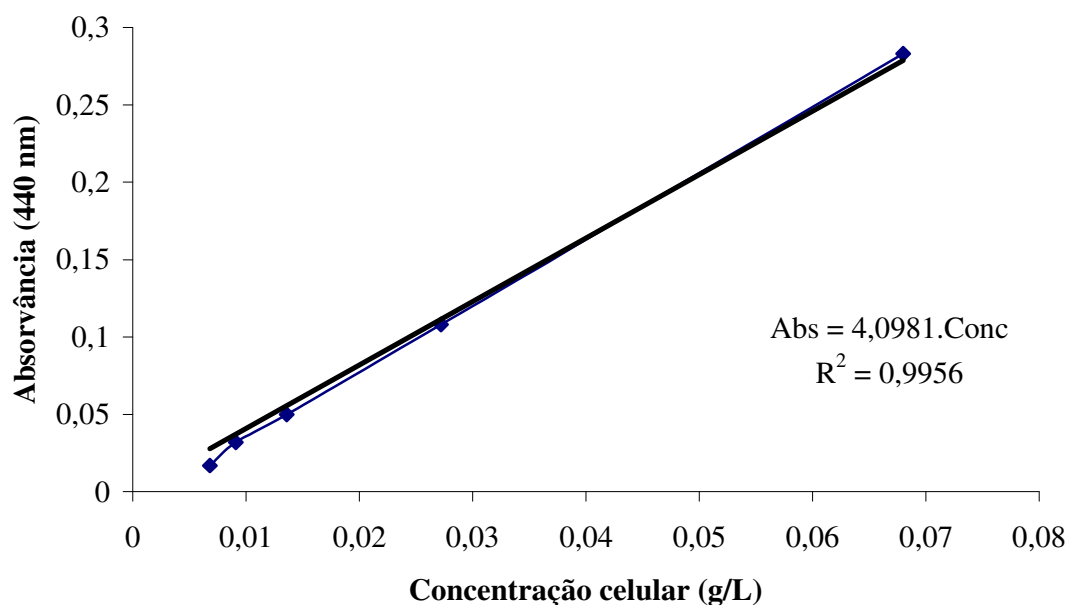
# ***Capítulo 4***

## ***Resultados e Discussão***

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Curva de peso seco para *Paenibacillus polymyxa*

Para iniciar os experimentos de produção de EPS por *Paenibacillus polymyxa*, foi preciso antes conhecer o perfil de crescimento dessa bactéria, e para tanto inicialmente foram testados três meios de cultivo diferentes, conforme citado no item 3.2 do capítulo 3. O meio escolhido para a realização de todos os experimentos envolvendo *Paenibacillus polymyxa* foi o meio 3 (Sharma *et al.*, 2001), por ter apresentado visivelmente maior turvação, ter composição mais simples e, conseqüentemente, ser mais barato, e envolver um tratamento pós-produção menos complexo. Uma vez escolhido o meio, foi construída uma curva de peso seco, apresentada na Figura 4.1, conforme descrito no capítulo 3.

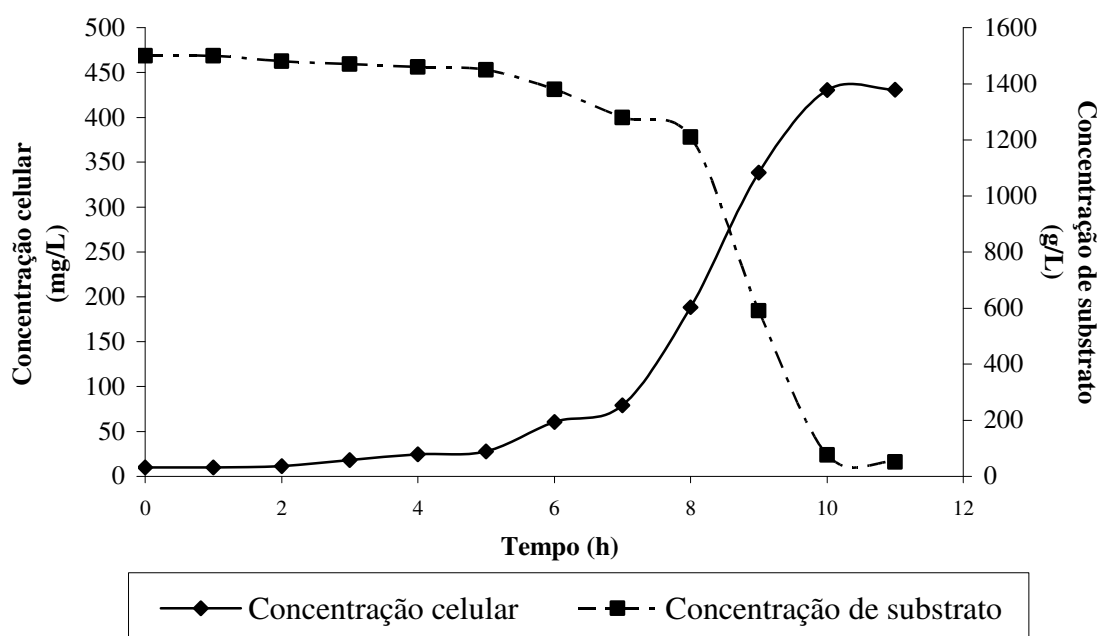


**Figura 4.1.** Curva de peso seco para *Paenibacillus polymyxa*

Com essa curva, foi possível relacionar a turbidez de uma amostra retirada do meio de crescimento e relacioná-la com a concentração celular.

#### 4.2. Crescimento de *Paenibacillus polymyxa* e produção de EPS

A Figura 4.2, a seguir, apresenta as curvas de crescimento e consumo de substrato por *Paenibacillus polymyxa* no meio previamente selecionado.

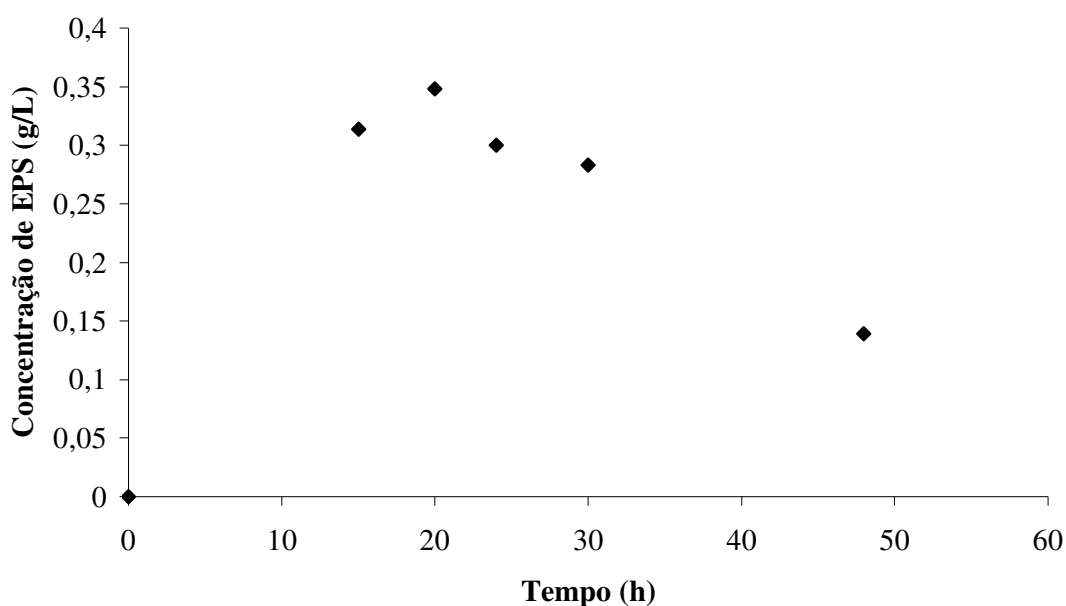


**Figura 4.2.** Curvas de crescimento e consumo de substrato por *Paenibacillus polymyxa*.

Observando os gráficos obtidos, nota-se que a bactéria levou cerca de 5 horas em sua adaptação ao meio (fase lag), e daí por diante deu início a seu crescimento, atingindo a fase estacionária por volta de 10 horas. Como era de se esperar, a concentração de substrato diminuiu consideravelmente durante a fase exponencial do

crescimento (entre 7 e 10 horas), tendo chegado a valores mínimos quando o microrganismo encontrava-se na fase estacionária.

A Figura 4.3 apresenta a curva de produção de EPS, com o objetivo de se determinar o momento ideal para interrupção do crescimento e extração da maior concentração de EPS solúvel no meio.



**Figura 4.3.** Curva de produção de EPS por *Paenibacillus polymyxa*.

De acordo com a Figura 4.3, a produção máxima de EPS foi obtida em 20 horas, quando o microrganismo já se encontrava há algum tempo na fase de diminuição do crescimento celular, o que provavelmente se deve ao estresse causado pela falta de substrato (Ryu e Beuchat, 2004). Em seguida, parece haver um consumo da EPS, verificado pela queda em sua concentração após esse tempo. Um possível efeito de diauxia talvez pudesse ter sido observado na curva de crescimento; entretanto, esta foi interrompida antes de 24 horas, que corresponde ao tempo aproximado no qual se começa a detectar a queda na concentração da EPS.

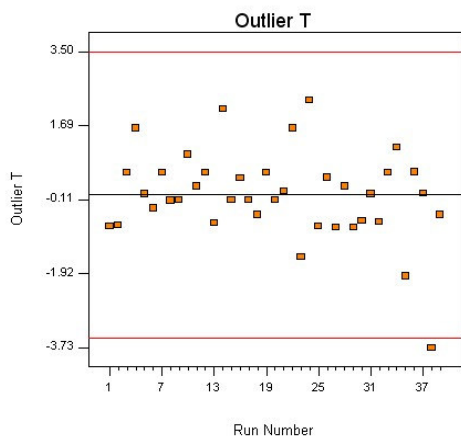
A concentração máxima de EPS obtida foi de aproximadamente 0,35 g/L, mais que o dobro do encontrado por Tallon e colaboradores (2003) alcançaram 0,14 g/L com a bactéria *Lactobacillus plantarum* EP56. Dueñas e colaboradores (2003) obtiveram uma produção de 0,115 g/L por *Pediococcus damnosus* 2.6 após 29 dias de cultivo, ao realizar um planejamento experimental variando a temperatura do sistema e as concentrações de glicose e nitrogênio. Shu e Lung (2004), por sua vez, alcançaram 0,15 g/L de um exopolissacarídeo produzido por *Antrodia camphorata* em uma batelada de dois estágios, variando o pH de 4,0 a 5,0 após 8 dias de cultivo.

### **4.3. Captação de metais pesados pela EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa***

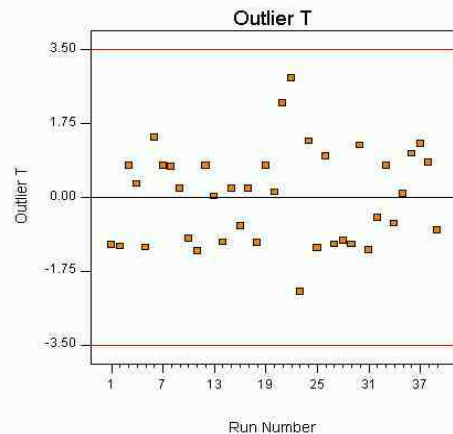
Os resultados do planejamento experimental para a captação de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  pela EPS são apresentados na Tabela 4.1, a seguir.

**Tabela 4.1.** Resultados do planejamento experimental para captação de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

Fator		Espécies					
		$\text{Cd}^{2+}$		$\text{Zn}^{2+}$		$\text{Cu}^{2+}$	
$t$	$C_{EPS}$	$q$ (mg/g)	Eficiência de remoção (%)	$q$ (mg/g)	Eficiência de remoção (%)	$q$ (mg/g)	Eficiência de remoção (%)
-1	-1	2630,6	64,6	2455,6	63,0	3033,3	68,4
-1	+1	109,7	67,3	107,1	68,7	124,3	70,1
-1	0	202,4	64,6	180,3	60,1	233,3	68,4
+1	-1	2519,4	61,8	2455,6	63,0	3133,3	70,7
+1	+1	105,2	64,6	102,7	65,8	123,3	69,5
+1	0	202,4	64,6	197,4	65,8	237,2	69,5
0	-1	2741,7	67,3	2455,6	63,0	3058,3	69,0
0	+1	105,2	64,6	102,7	65,8	122,3	69,0
0	0	210,9	67,3	197,4	65,8	237,2	69,5
0	0	202,4	64,6	197,4	65,8	231,4	67,9
0	0	202,4	64,6	197,4	65,8	231,4	67,9
0	0	193,8	61,8	197,4	65,8	233,3	68,4
0	0	202,4	64,6	197,4	65,8	241	70,7



**Figura 4.4a.** Gráfico *Outlier T* para a eficiência de remoção.



**Figura 4.4b.** Gráfico *Outlier T* para a captação de metais.

A Figura 4.4a apresenta o gráfico *Outlier T* para a eficiência de remoção, que avalia a resposta de cada experimento em relação ao intervalo de confiança. É possível observar a presença de um *outlier*, relacionado ao experimento de adsorção de zinco, onde a concentração de EPS ( $C_{EPS}$ ) é 0,13 g/L e o tempo ( $t$ ) é 8 horas, provavelmente devido a um erro experimental. A Figura 4.4b mostra o gráfico *Outlier T* para a captação de metais. Nesse caso, os dados estão inseridos no intervalo de confiança.

Uma vez que os valores de  $\eta$  e  $q$  foram calculados a partir dos mesmos valores de  $C_M$  e  $C_{MF}$ , de acordo com as Equações 3.1 e 3.2 (capítulo 3), a presença de um *outlier* na avaliação da eficiência de remoção, e a ausência de *outliers* na avaliação da captação de metais pode ser justificada pelo termo inferior dessas equações. Sendo  $C_{EPS} \ll C_M$ , há uma diluição de erros relacionados à Equação 3.2, o que explica o fato de todos os dados estarem inseridos no intervalo de confiança, como mostrado na Figura 4.4b.

As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam a análise de variância (ANOVA) para os modelos mais adequados de eficiência de remoção e captação de metais, respectivamente, relacionados à concentração de EPS, tempo de adsorção e variedade do metal.

O modelo linear obtido para descrever a eficiência de remoção (Tabela 4.2) fornece um valor baixo de Prob > F (<0,0001), e o teste *lack of fit* apresenta um valor de Prob > F igual a 0,1421. Não houve outro modelo que se adequasse melhor a esta resposta. Entretanto, o modelo linear apresenta um baixo valor de R<sup>2</sup> (0,6533), indicando que aproximadamente 35 % dos valores de  $\eta$  não estão bem descritos pelo modelo. Esse fato confirma a existência de erros consideráveis relacionados à avaliação dessa resposta.

**Tabela 4.2.** Análise de variância – Modelo linear para eficiência de remoção.

Fator	Estatísticas					
	Graus de liberdade	Média quadrada	Valor de F	Prob>F	Coefficiente estimado	Erro padrão
Modelo	4	42,84	16,02	<0,0001		
Interseção	1				66,29	0,26
$C_{EPS}$	1	11,84	4,43	0,0428	0,81	0,39
$t$	1	5,556E-004	2,077E-004	0,9886	5,556E-003	0,39
$C_M$	1	79,76	29,82	<0,0001		
$C_{M1}$	1				-1,50	0,37
$C_{M3}$	1				-1,36	0,37
Resíduo	34	2,67				
<i>Lack of fit</i>	22	3,18	1,82	0,1421		
Erro puro	12	1,75				

R<sup>2</sup> = 0,6533

*M1 – Cádmio*

*M2 – Zinco*

*M3 – Cobre*



O coeficiente estimado do efeito tempo ( $t$ ) no modelo linear de eficiência de remoção é menor que seu próprio erro, indicando que esse efeito não é estatisticamente significativo. Para a construção do modelo, são considerados apenas os níveis extremos. Uma vez que o zinco é um ponto central no planejamento, de acordo com a Tabela 4.1, seu valor é multiplicado por zero e, conseqüentemente, não é mostrado nas equações geradas pelo modelo. Assim, ele foi removido da equação do modelo (Equação 4.1).

O modelo matemático codificado empregado para a eficiência de remoção foi:

$$\eta = 66,29 + 0,81C_{EPS} - 1,50C_{M1} - 1,36C_{M3} \quad (4.1)$$

As equações finais em termos de fatores reais são:

$$\eta_{Cd} = 63,91 + 6,76C_{EPS} \quad (4.2)$$

$$\eta_{Zn} = 64,06 + 6,76C_{EPS} \quad (4.3)$$

$$\eta_{Cu} = 68,28 + 6,76C_{EPS} \quad (4.4)$$

As equações obtidas para os metais apresentam o mesmo coeficiente angular, com diferentes coeficientes lineares, o que sugere que a eficiência de remoção está mais intensamente associada à concentração do bioissorvente do que ao tipo de metal. Esse fato pode ser observado analisando-se a Tabela 4.2, onde o coeficiente estimado para  $C_{EPS}$  é maior do que os outros. A diferença nos coeficientes lineares dos modelos pode estar associada às características de cada íon; entretanto, considerando o baixo valor de  $R^2$  nesse modelo, seria necessário repetir alguns experimentos, com a intenção de reduzir os erros associados ao modelo. Sendo assim, não é possível avançar nas conclusões sobre as equações obtidas.

**Tabela 4.3.** Análise de variância – Modelo quadrático para  $q$ .

Fator	Estatísticas				Coeficiente estimado	Erro padrão
	Graus de liberdade	Média quadrada	Valor de F	Prob>F		
Modelo	11	4,109E+006	699,40	< 0,0001		
Interseção					214,29	18,37
$C_{EPS}$	1	3,063E+007	5213,84	< 0,0001	-1304,49	18,07
$t$	1	5,556E-004	9,456E-008	0,9998	-5,556E-03	18,07
$C_M$	1	99460,81	16,93	< 0,0001		
$C_{M1}$	1				-26,32	17,36
$C_{M3}$	1				-71,28	17,36
$C_{EPS}^2$	1	1,213E+007	2064,26	< 0,0001	1209,81	26,63
$t^2$	1	1258,82	0,21	0,6471	-12,33	26,63
$C_{EPS} t$	1	0,14	2,397E-005	0,9961	0,11	22,13
$C_{EPS} C_M$	2	1,433E+005	24,38	<0,0001		
$C_{EPS} C_{M1}$	1				42,56	25,55
$C_{EPS} C_{M3}$	1				128,78	25,55
$t C_M$	2	2011,35	0,34	0,7131		
$t C_{M1}$	1				-19,28	25,55
$t C_{M3}$	1				2,12	25,55
Resíduo	27	5874,88				
<i>Lack of fit</i>	15	10560,40	587,34	<0,0001		
Erro puro	12	17,98				

$$R^2 = 0,9965$$

Para a capacidade de captação de metais (Tabela 4.3), o modelo mais adequado para a resposta é o quadrático, que fornece um baixo valor de Prob > F (<0,0001) e um alto valor de  $R^2$  (0,9965), confirmando que o modelo se adequa à resposta. O valor do teste *lack of fit* também apresentou um baixo valor de Prob > F (<0,0001).

O coeficiente estimado do efeito  $t$  no modelo quadrático de captação de metais, da mesma forma como descrito anteriormente, é menor que seu erro, indicando que esse

fator não é estatisticamente significativa, assim como suas combinações ( $t^2$ ,  $C_{EPS}$ ,  $tC_{M1}$ ,  $tC_{M3}$ ). Desta forma, o modelo simplificado é recalculado com a exclusão desses termos da Equação 4.5.

O modelo matemático codificado empregado para a captação de metais foi:

$$q = 210,77 - 1304,49C_{EPS} - 26,32C_{M1} - 71,28C_{M3} + 1205,11C_{EPS}^2 + 42,56C_{EPS}C_{M1} + 128,78C_{EPS}C_{M3} \quad (4.5)$$

As equações finais em termos de fatores reais são:

$$q_{Cd} = 2965,88 - 32275,08C_{EPS} + 83688,33C_{EPS}^2 \quad (4.6)$$

$$q_{Zn} = 2827,51 - 31556,60C_{EPS} + 83688,33C_{EPS}^2 \quad (4.7)$$

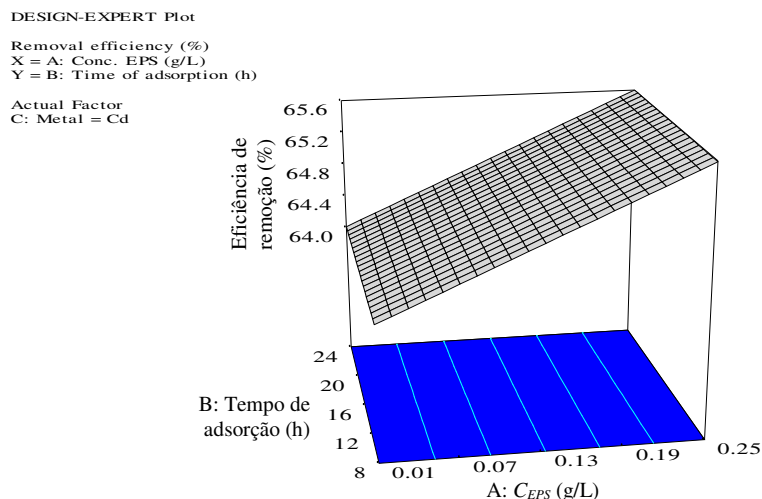
$$q_{Cu} = 3321,53 - 34057,58C_{EPS} + 83688,33C_{EPS}^2 \quad (4.8)$$

É possível observar que os coeficientes das equações (4.6, 4.7 e 4.8) são muito similares, o que leva a concluir que a captação de metais está mais intensamente associada à concentração da EPS do que ao tipo de íon, assim como foi observado para a eficiência de remoção. Esse fato pode ser confirmado pelo alto valor de  $R^2$  (0,9965), o que significa que apenas 0,35% das respostas obtidas para  $q$  não estão bem descritas pelo modelo. A Tabela 4.3 mostra os coeficientes estimados para os termos associados à  $C_{EPS}$ , que são mais altos do que os termos associados aos íons metálicos.

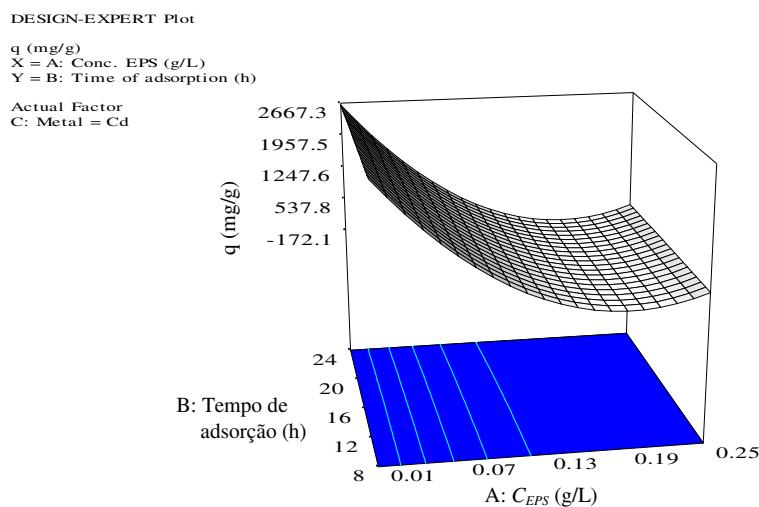
As Figuras 4.5 e 4.6 apresentam as superfícies de resposta obtidas para eficiência de remoção de cádmio e captação de cádmio, respectivamente. As superfícies de resposta para zinco e cobre foram similares, com diferentes valores de  $\eta$  and  $q$ . Ambas superfícies obtidas demonstram que o tempo de contato não interfere na resposta relacionada à adsorção dos metais. Desta forma, pode-se concluir que em 8 horas de contato o equilíbrio de adsorção já foi atingido para cada metal. Para avaliar a

interferência do fator  $t$  nas respostas, seria necessário usar intervalos de tempo inferiores a 8 horas.

A Figura 4.5 mostra um pequeno aumento na eficiência relacionada a um aumento na concentração de EPS ( $C_{EPS}$ ), com pequenas variações nos valores de  $\eta$ , e a Figura 4.6 apresenta um aumento na captação do metal resultante de baixos valores de  $C_{EPS}$ , de acordo com a Equação 3.2. A variação de  $q$  é considerável quando a concentração do bioissorvente é reduzida. A análise de ambas superfícies de resposta permite concluir que a otimização da captação de metais envolve o uso de baixas concentrações de EPS, embora esse fato possa causar uma pequena redução na eficiência de remoção.



**Figura 4.5.** Superfície de resposta para eficiência de remoção de Cd<sup>2+</sup>.



**Figura 4.6.** Superfície de resposta para captação de  $Cd^{2+}$ .

Loaçc e colaboradores (1997) estudaram a capacidade de captação de metais por um exopolissacarídeo produzido por *Alteromonas macleodii* subsp. *Fijiensis*. Para uma concentração de exopolissacarídeo igual a 1,0 g/L e concentrações iniciais de chumbo, cádmio e zinco iguais a 50 ppm, eles obtiveram 100 % de eficiência de remoção. Entretanto, uma vez que a concentração de biossorvente utilizada por eles foi maior do que a máxima usada no planejamento experimental (0,25 g/L), as captações dos metais foram menores: 316 mg  $Pb^{2+}$ /g EPS, 125 mg  $Cd^{2+}$ /g EPS e 75 mg  $Zn^{2+}$ /g EPS.

Em seu trabalho, Salehizadeh e Shojaosadati (2003) obtiveram valores de captação em torno de 700 mg  $Pb^{2+}$ /g EPS, 400 mg  $Zn^{2+}$ /g EPS e 400 mg  $Cu^{2+}$ /g EPS, usando 0,25 g/L de um polissacarídeo produzido por *Bacillus firmus*, e eficiências de remoção de 98,3 %, 74,9 % e 61,8 % de chumbo, cobre e zinco, respectivamente. Como mencionado anteriormente, um aumento nos valores de EPS leva a um aumento da eficiência de remoção. Um resumo desses resultados é apresentado na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Comparação entre os resultados obtidos no planejamento experimental e os dados encontrados na literatura.

Íon metálico	$C_{EPS}$ (g/L)	$C_M$ (ppm)	$q$ (mg/g)	$\eta$ (%)	Referência
Cd <sup>2+</sup>	1,0	50	125,0	100,0	Loaëc <i>et al.</i> (1997)
	0,25	50	109,7	67,3	Planejamento experimental
	0,01	50	2630,6	64,6	Planejamento experimental
Zn <sup>2+</sup>	1,0	50	75,0	90,0	Loaëc <i>et al.</i> (1997)
	0,25	n.d.	400,0	61,8	Salehizadeh e Shojaosadati (2003)
	0,25	50	107,1	68,7	Planejamento experimental
	0,01	50	2455,6	63,0	Planejamento experimental
Cu <sup>2+</sup>	0,25	n.d.	400,0	74,9	Salehizadeh e Shojaosadati (2003)
	0,25	50	124,3	70,1	Planejamento experimental
	0,01	50	3033,3	68,4	Planejamento experimental

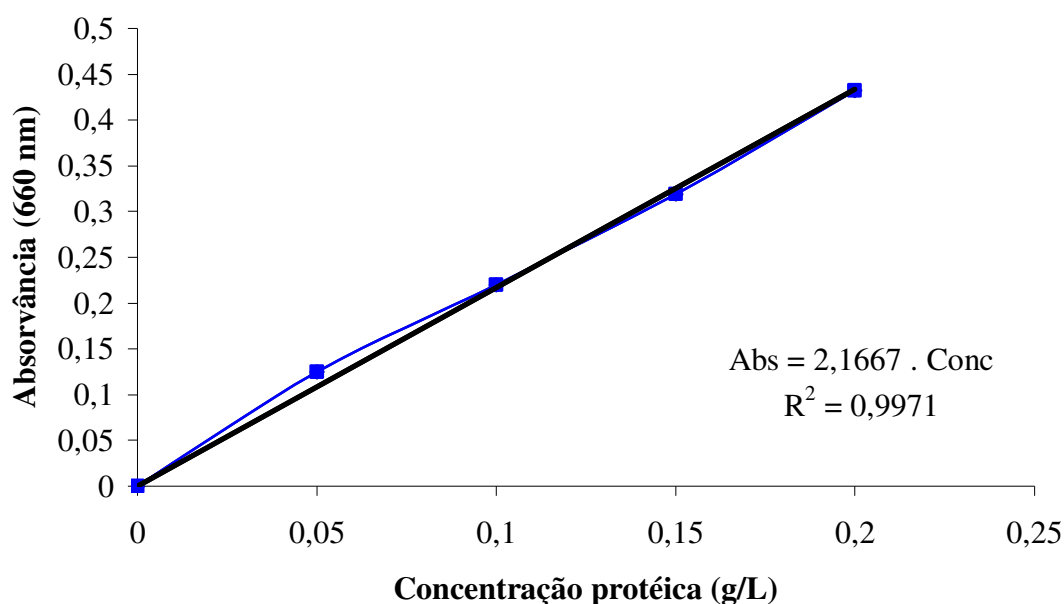
n.d.: não disponível

Acosta e colaboradores (2005) avaliaram a capacidade de captação de cobre pela EPS produzida pela mesma espécie de *Paenibacillus polymyxa* usada neste trabalho, e chegaram em resultados semelhantes aos encontrados aqui. Os autores também caracterizaram a EPS com o uso de cromatografia de camada fina e a técnica de FACE (*fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis*), e constataram que a substância é um polímero de manose, e não apresenta proteínas.

## 4.4. Experimentos realizados com o consórcio 1

### 4.4.1. Curva padrão de BSA

Para a quantificação de proteínas intracelulares do consórcio, foi necessária a construção de uma curva padrão de BSA (albumina bovina), apresentada na Figura 4.7, a seguir:

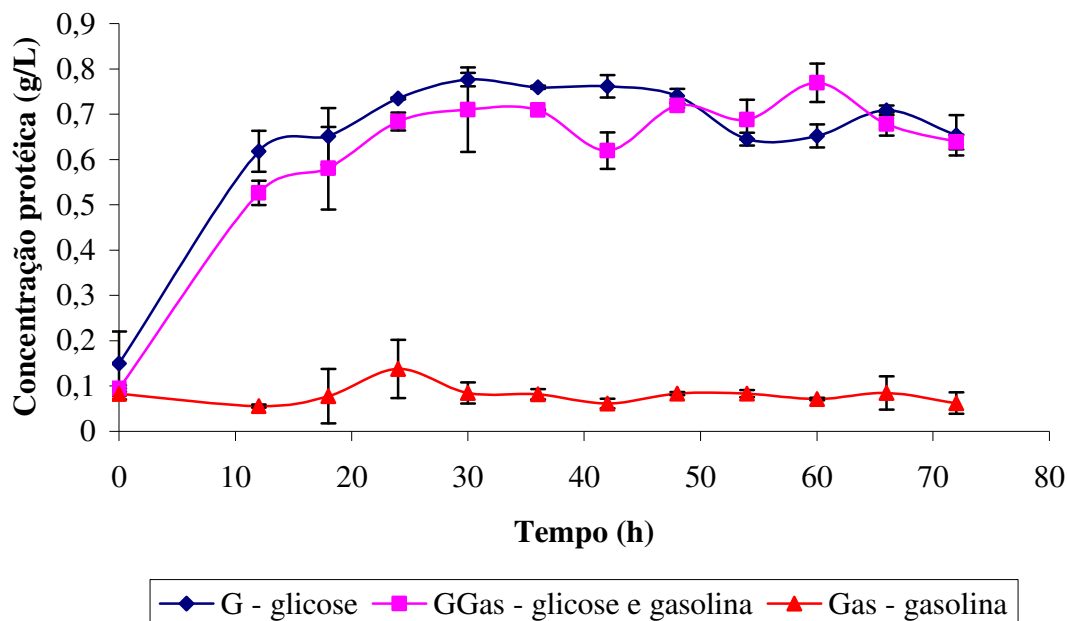


**Figura 4.7.** Curva padrão de BSA.

Para determinar a concentração proteica, os valores de absorvâncias lidos no espectrofotômetro após a realização do Método de Lowry foram colocados nesse gráfico, correspondendo diretamente a um valor de concentração de proteínas.

#### 4.4.2. Comportamento do consórcio 1 na presença de diferentes fontes de carbono

A Figura 4.8, a seguir, apresenta as curvas de crescimento do consórcio 1 na presença de diferentes fontes de carbono no meio de cultivo.



**Figura 4.8.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo glicose e/ou gasolina como fontes de carbono.

É possível observar, como já seria esperado, que o crescimento do consórcio na presença de glicose é bem mais acentuado do que no meio contendo apenas gasolina, uma vez que a primeira molécula tem estrutura bem mais simples, sendo mais facilmente metabolizada pelos microrganismos. Entretanto, no meio contendo glicose e gasolina, o crescimento celular foi um pouco reduzido, quando comparado ao meio contendo apenas glicose, provavelmente devido a algum efeito inibitório causado pelos hidrocarbonetos da gasolina sobre o metabolismo microbiano.

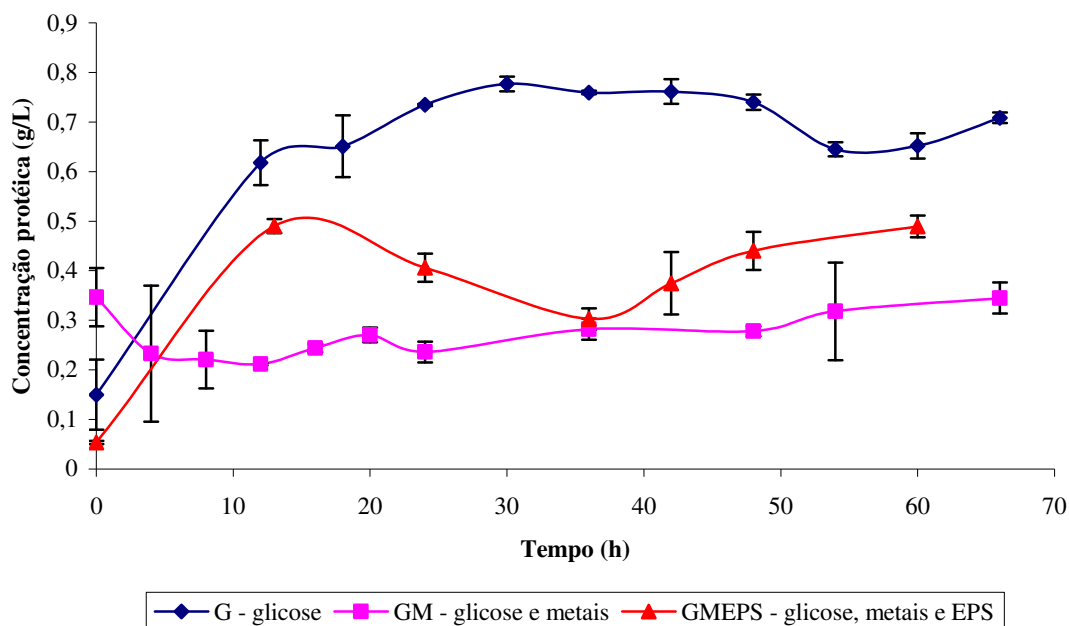


Uma vez que o consórcio 1 foi propagado inicialmente a partir de glicose, e visto que essa fonte de carbono sempre esteve presente nos meios de propagação, embora houvesse também gasolina, provavelmente o consórcio consegue manter suas funções metabólicas na presença desta, mas sem degradá-la totalmente.

De acordo com Thompson e colaboradores (2005), um consórcio microbiano deveria ser selecionado inicialmente com uma fonte de carbono de fácil biodegradação, a fim de fornecer algumas culturas permanentes, para somente depois serem adaptadas a uma fonte de carbono mais complexa. Segundo os autores, uma pré-seleção com tal fonte de carbono mais simples 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 sistema. Entretanto, o que foi possível observar, de acordo com a Figura 4.8, é que o consórcio obtido inicialmente a partir de glicose não foi capaz de metabolizar gasolina e usá-la como fonte de energia para seu crescimento. Sendo assim, provavelmente as linhagens com potencial para biodegradação dos hidrocarbonetos 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.

#### **4.4.3. Efeito da presença de metais e EPS nos experimentos envolvendo somente glicose como fonte de carbono**

A análise da Figura 4.9, a seguir, permite observar o efeito inibitório causado pela presença de metais pesados sobre o metabolismo microbiano, evidenciado pela diminuição na taxa de crescimento no meio contendo glicose e metais (curva GM), quando comparado ao meio contendo apenas glicose (curva G).



**Figura 4.9.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo somente glicose como fonte de carbono, na presença ou não de metais e EPS.

Em seu trabalho, Giller e colaboradores (1998) reportam que estudos ecotoxicológicos de laboratório sugerem que a adição de metais alguns dias após a adição de substrato resulta em um decréscimo na resposta respiratória para uma larga faixa de substratos adicionados, que vão desde a glicose até a celulose. A quantidade de carbono mineralizado em um período de 24 horas após adição de glicose, por exemplo, mostrou-se bastante sensível à adição de pequenas quantidades de sais metálicos em laboratório, aumentando o tempo da fase lag. Marçano (2004) observou um aumento da fase lag do crescimento celular para *Pseudomonas putida* em meio contendo naftaleno, quando foi adicionada determinada concentração de cádmio, confirmando o efeito inibitório desse metal sobre o metabolismo da bactéria.

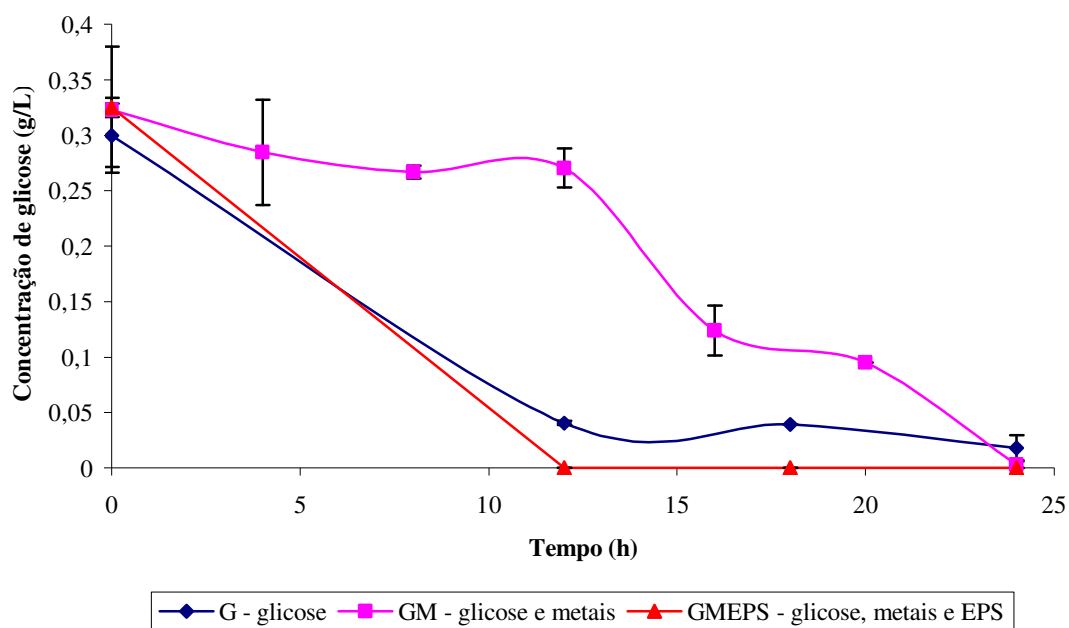
Após um período relativamente longo correspondente à fase lag do crescimento no experimento contendo glicose e metais (GM), é possível observar um pequeno

crescimento celular, indicando que os microrganismos do consórcio encontram-se mais adaptados à presença dos metais pesados no meio. Díaz-Raviña e Bååth (1996) realizaram experimentos com adição de zinco a solos, e observaram um aumento na tolerância a esse metal após dois dias de exposição, e a variação nas concentrações de zinco adicionadas não afetou significativamente essa tolerância. O efeito imediato foi atribuído à morte rápida de espécies microbiológicas sensíveis e tal efeito, em longo prazo, atribuído a diferenças na habilidade competitiva e de adaptação das bactérias sobreviventes.

A presença de EPS no meio contendo glicose e metais resultou em uma curva de crescimento identificada como GMEPS na Figura 4.9. É possível observar que o crescimento não foi tão acentuado como na curva G, onde só havia glicose no meio, mas por outro lado não foi tão baixo quanto na curva GM, onde encontravam-se os metais no meio. Esse crescimento intermediário indica que a presença da EPS de alguma forma atenuou o efeito inibitório causado pelos metais no metabolismo microbiano, provavelmente pela adsorção ou complexação dos mesmos, diminuindo sua biodisponibilidade à biomassa.

Sandrin e colaboradores (2000) obtiveram resultados semelhantes quando adicionaram um ramnolipídeo em meio contendo naftaleno e cádmio, tendo sido observado um aumento no crescimento de *Burkholderia* sp. em relação a meios contendo o hidrocarboneto e o metal.

Os resultados de consumo de glicose apresentados na Figura 4.10 confirmam o que foi discutido acima.

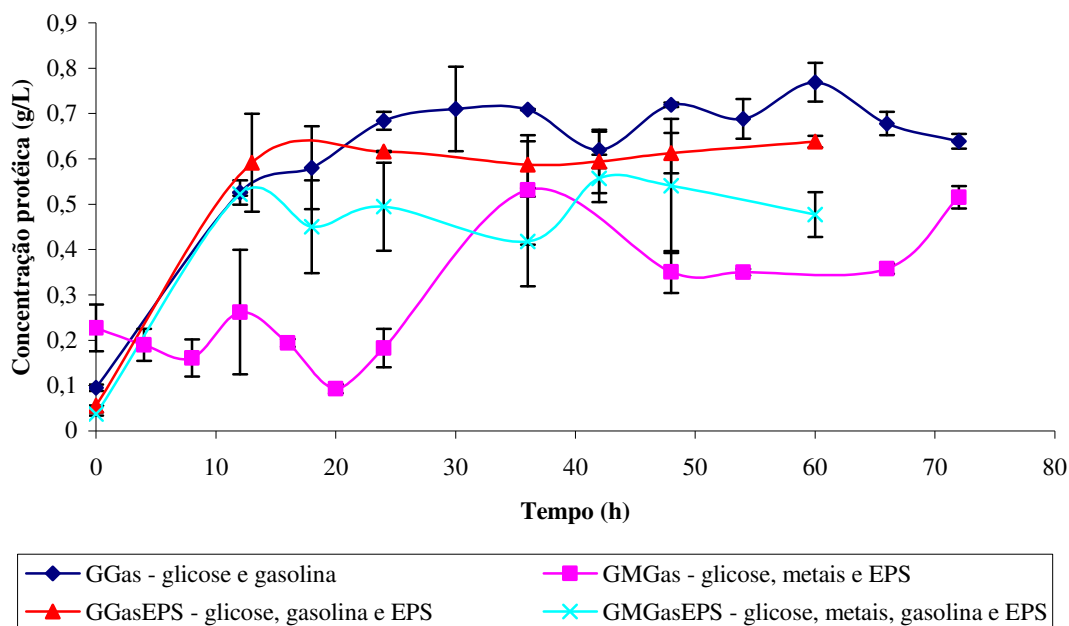


**Figura 4.10.** Consumo de glicose em meios contendo glicose, glicose e metais, e glicose, metais e EPS.

É possível observar que o consumo de glicose foi mais lento no meio contendo metais (GM), caracterizando a inibição do metabolismo causada pela presença dessas espécies. Da mesma forma, o consumo de glicose no meio contendo metais e EPS (GMEPS) foi mais rápido, indicando a atenuação de tal efeito causado pela presença da substância polimérica, com uma pequena diferença quando comparado ao experimento contendo apenas glicose (G).

#### 4.4.4. Efeito de metais e EPS nos experimentos envolvendo glicose e gasolina como fontes de carbono

A Figura 4.11, a seguir, apresenta o perfil de crescimento do consórcio em meios que continham glicose e gasolina como fontes de carbono, além de metais e/ou EPS.



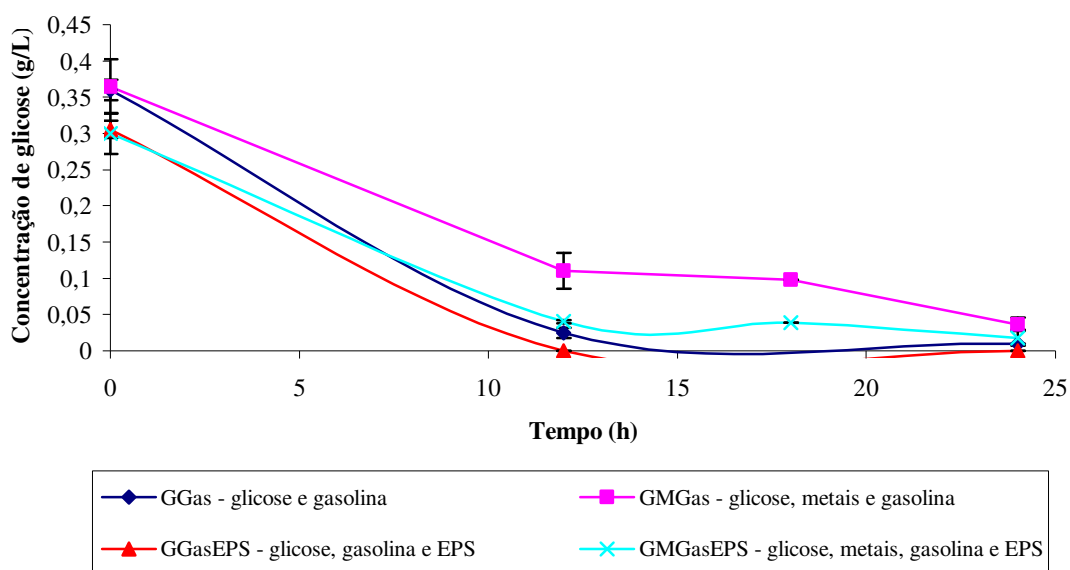
**Figura 4.11.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo glicose e gasolina como fontes de carbono, na presença ou não de metais e EPS.

O experimento envolvendo glicose, gasolina e EPS (GGasEPS) foi realizado para comparar o crescimento celular onde só havia glicose e gasolina (GGas) e verificar se havia o consumo de EPS como fonte de carbono. É possível constatar que as curvas são bastante semelhantes e, a partir desse fato, concluímos que a EPS provavelmente não foi consumida durante o processo.

Da mesma forma que os experimentos envolvendo apenas glicose, o efeito inibitório da presença de metais em solução é visível (GMGas), assim como a presença da EPS atenuou em parte tal efeito, verificado por uma taxa de crescimento maior (GMGasEPS).

Por outro lado, a presença de gasolina associada à glicose causou um menor efeito da inibição causada pelos metais (GMGas), quando comparado ao experimento

sem gasolina (GM), apresentado na Figura 4.9, e os experimentos contendo metais e/ou EPS (GMGas e GMGasEPS) apresentaram resultados similares ao crescimento máximo obtido com o meio contendo glicose e gasolina (GGas) e contendo apenas glicose (G), apresentado na Figura 4.9. De acordo com a hipótese de Sandrin e colaboradores (2000), a presença de metais pode acabar conferindo certa proteção às bactérias, retardando a perda da viabilidade celular na presença de hidrocarbonetos.

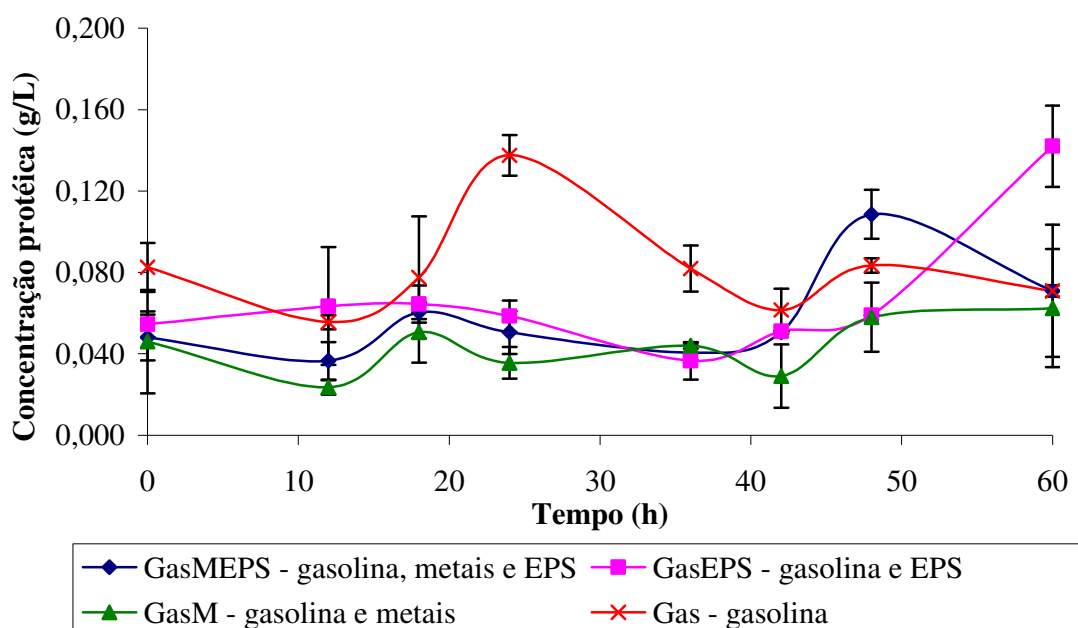


**Figura 4.12.** Consumo de glicose em meios contendo glicose e gasolina, além de metais e EPS.

Analogamente ao observado na Figura 4.10, a presença de metais retarda o consumo de glicose pelo consórcio, da mesma forma que a presença da EPS atenua esse efeito.

#### 4.4.5. Efeito de metais e EPS nos experimentos envolvendo gasolina como única fonte de carbono

Foram realizados experimentos contendo, como única fonte de carbono, a gasolina, em meios contendo ou não metais e/ou EPS. As curvas de crescimento são apresentadas na Figura 4.13.



**Figura 4.13.** Curvas de crescimento do consórcio 1 em meios contendo glicose e gasolina como fontes de carbono, na presença ou não de metais e EPS.

Quando a única fonte de carbono utilizada foi a gasolina, o crescimento foi muito mais baixo do que nos meios contendo glicose (Figuras 4.9 e 4.11). É possível observar que a fase lag em todos os experimentos foi mais extensa, indicando o maior tempo que os microrganismos precisaram para se adaptar às condições de crescimento. As concentrações protéicas iniciais se devem à falta de homogeneidade das células do pré inóculo.

O experimento envolvendo gasolina e EPS (GasEPS) foi realizado para verificar se a presença de EPS de alguma forma favoreceria o consumo de gasolina, quando comparado ao experimento envolvendo apenas gasolina (Gas), uma vez que da Cunha (2004) relata que as substâncias poliméricas extracelulares, quando possuem propriedades surfactantes, auxiliam a biodegradação de hidrocarbonetos, por aumentar sua disponibilidade para os microrganismos.

Novamente, a presença da EPS minimizou o efeito inibitório causado pela presença dos metais no metabolismo microbiano, uma vez que a adição da substância favoreceu o crescimento (GasMEPS), quando comparado com o experimento onde ela não se encontrava presente (GasM).

As flutuações que geraram picos de concentração de proteínas celulares em todos os experimentos podem ter sido devidas à adaptação dos microrganismos para utilização dos diversos hidrocarbonetos da gasolina como substrato (benzeno, tolueno, xileno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc.) ou, ainda, a erros experimentais de quantificação em função dos baixos valores observados.

De forma geral, a utilização do consórcio 1 nos experimentos explicitou a importância da utilização da EPS microbiana para diminuir os efeitos tóxicos causados pela presença de metais pesados no sistema, uma vez que provavelmente o composto atua indisponibilizando essas espécies para os microrganismos, devido a possíveis fenômenos de adsorção ou complexação (Marçano, 2004; Sandrin *et al.*, 2000).

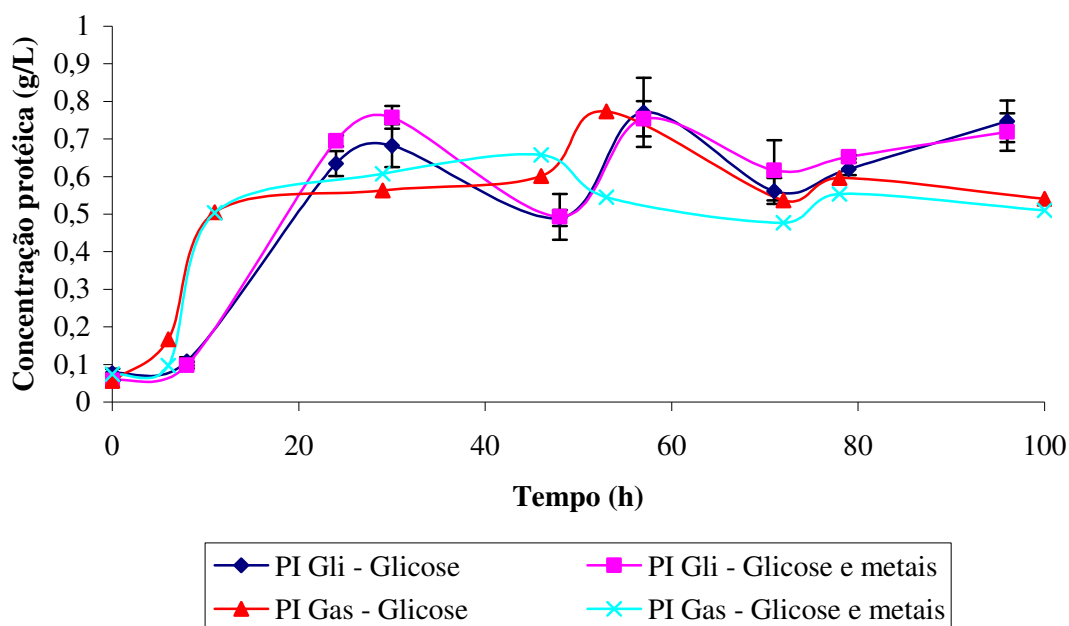
#### **4.5. Experimentos com variação do pré-inóculo envolvendo o consórcio 2**

Os plaqueamentos em meios mineral e TSA (Tabela 3.4) para caracterização macroscópica do consórcio apresentaram pouca diversidade, com duas culturas diferentes de bactérias (uma de coloração rosada e outra de coloração branca), e uma

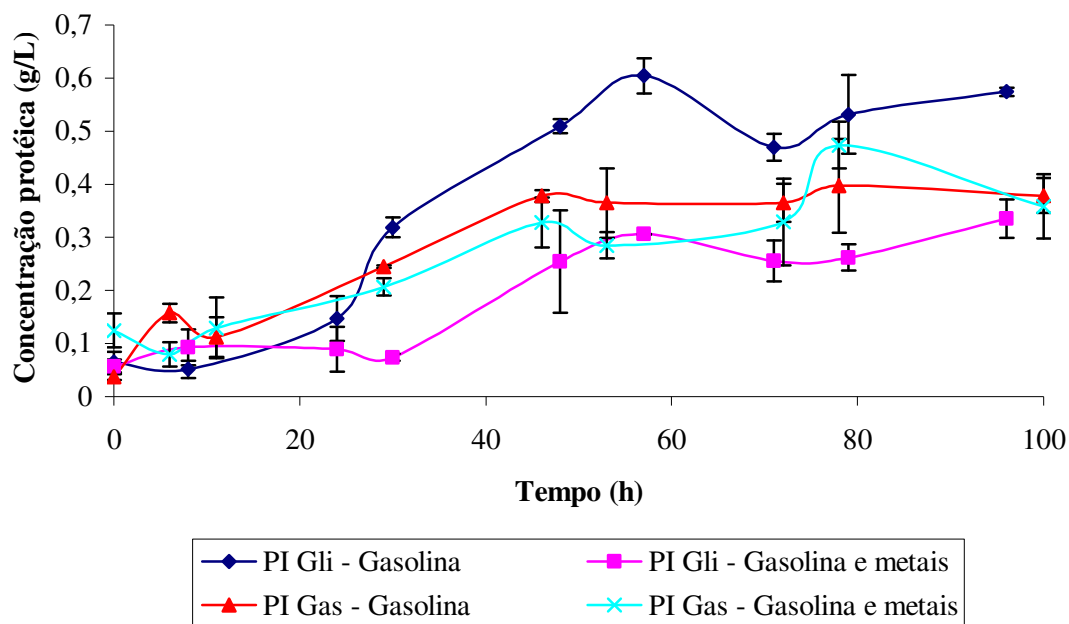


espécie de fungo filamentososo de esporulação em cor branca. Essas culturas pareceram ser dominantes ao longo de todos os experimentos.

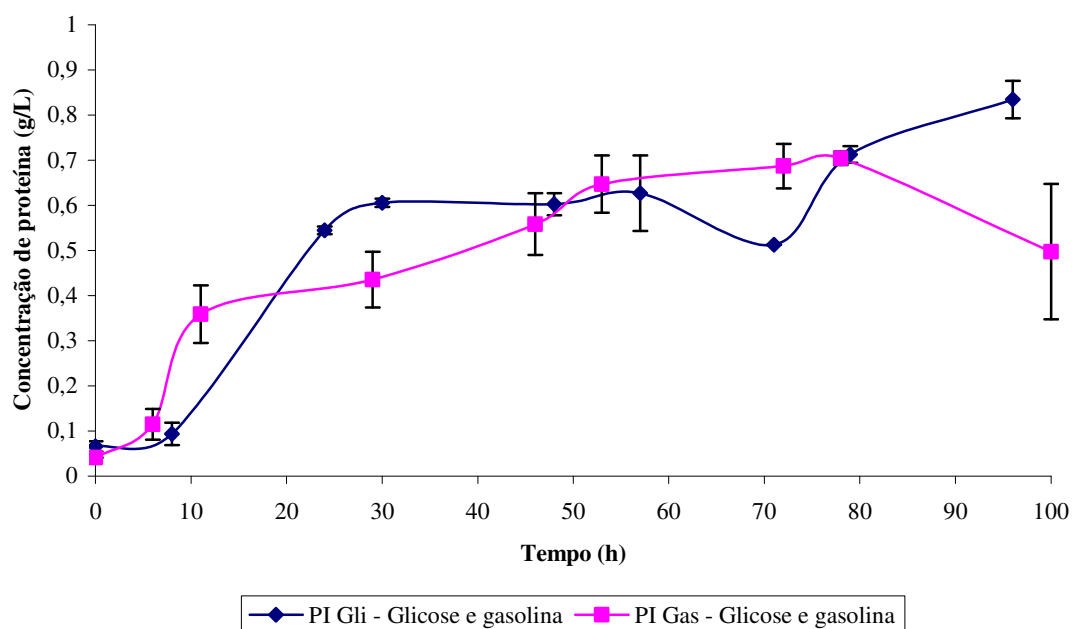
As Figuras 4.14, 4.15 e 4.16, a seguir, apresentam as curvas de crescimento do consórcio 2 em meios contendo glicose e/ou gasolina, a partir de diferentes pré-inóculos (PI Gli – pré-inóculo com glicose; PI Gas – pré-inóculo com gasolina).



**Figura 4.14.** Curvas de crescimento do consórcio 2 em meio contendo glicose com ou sem metais, a partir de diferentes pré-inóculos.



**Figura 4.15.** Curvas de crescimento do consórcio 2 em meios contendo gasolina com ou sem metais, a partir de diferentes pré-inóculos.



**Figura 4.16.** Curvas de crescimento do consórcio 2 em meios contendo glicose e gasolina, a partir de diferentes pré-inóculos.

Os resultados apresentados acima (Figuras 4.14, 4.15 e 4.16) mostram que o crescimento microbiano é mais acentuado no meio contendo glicose do que no que contém gasolina, o que é justificado facilmente pelo fato de a primeira ser uma substância bem menos complexa que a segunda, e conseqüentemente mais facilmente assimilável ao metabolismo dos microrganismos. Entretanto, independente da fonte de carbono, o crescimento foi ligeiramente favorecido, nas primeiras horas de contato, nos experimentos onde o inóculo foi obtido a partir de pré-inóculo contendo gasolina. Uma vez que o consórcio microbiano foi propagado a partir de uma amostra de solo em meio mineral contendo apenas gasolina como fonte de carbono, é possível que ele estivesse adaptado ao crescimento com os hidrocarbonetos da gasolina, o que justificaria tal comportamento na fase inicial da curva.

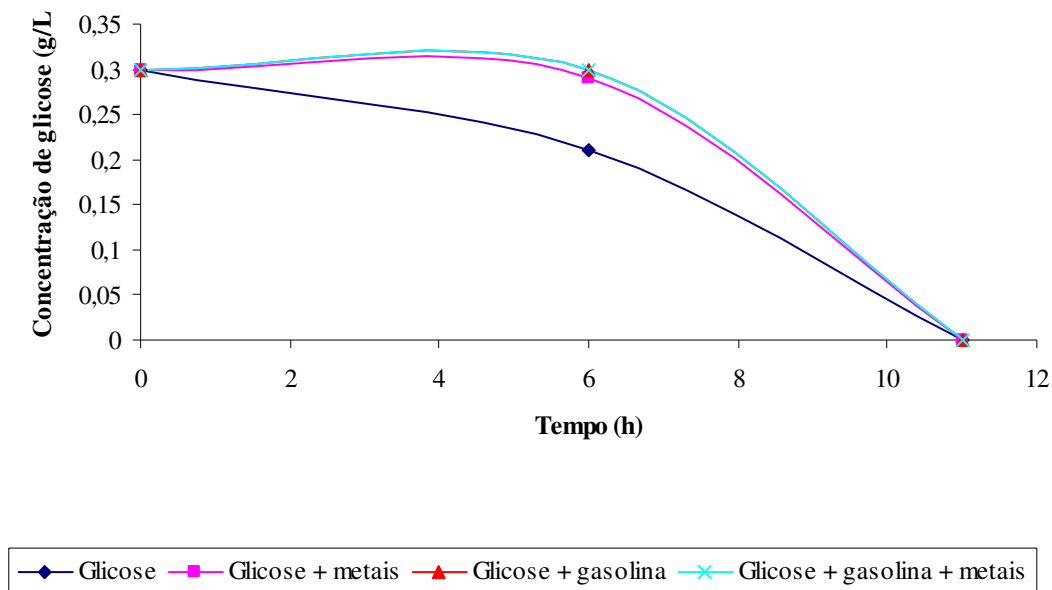
A presença de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , nas concentrações usadas nesses experimentos, causaram uma pequena mudança na fase inicial do crescimento celular, provavelmente devido a um período de adaptação dos microrganismos aos metais. Essa mudança não parece afetar muito o crescimento após 10 horas de cultivo, e as curvas alcançam quase os mesmos valores finais de biomassa. Segundo Malik (2004), várias bactérias isoladas de efluentes exibiram resistência a condições extremas, como picos de pH ou altas concentrações de metais pesados. Hassen e colaboradores (1998) reportam que, a concentrações relativamente baixas, alguns metais como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  são essenciais ao metabolismo microbiano, uma vez que eles provêm co-fatores vitais para metalo-proteínas e enzimas. Em ambientes poluídos, a resposta de comunidades microbianas a metais pesados depende da concentração e disponibilidade desses metais, e é dependente também de processos complexos, controlados por múltiplos fatores, como tipo de metal, natureza do meio e espécies microbianas.

Os experimentos realizados com glicose e gasolina como fontes de carbono simultâneas, independentemente do pré-inóculo, mostram que houve uma ligeira inibição do crescimento, quando comparados aos obtidos onde a única fonte de carbono era glicose; entretanto, quando comparados aos resultados dos experimentos com somente gasolina, o crescimento foi mais acentuado.

É possível observar, de forma contrária aos experimentos análogos de Lee e colaboradores (2003), que usaram piruvato como fonte de carbono adicional na biodegradação de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7, que os resultados não indicam que há um consumo simultâneo de glicose e gasolina pelo consórcio, o que seria demonstrado por uma curva de crescimento mais acentuada que a obtida somente com glicose. Embora o consórcio se mostre mais adaptado ao meio contendo gasolina, a presença desta, concomitantemente com a glicose, inibe o crescimento microbiano.

Em relação aos experimentos envolvendo metais pesados, nota-se que a presença de metais praticamente não alterou o crescimento nos meios onde havia glicose. Entretanto, houve inibição mais acentuada do crescimento onde gasolina encontrava-se presente, refletido em um aumento da fase lag. Esse efeito é menos visível nos experimentos provenientes do pré-inóculo com gasolina, provavelmente devido à adaptação sofrida pelo consórcio durante o pré-cultivo. Riis e colaboradores (2002) reportam, em seus experimentos, que esse aumento da fase lag deve-se à adaptação e seleção de processos pela comunidade microbiana.

A Figura 4.17, a seguir, apresenta as curvas de consumo de glicose nos experimentos realizados a partir de pré-inóculo com gasolina.



**Figura 4.17.** Consumo de glicose nos experimentos a partir de pré-inóculo contendo gasolina.

Como era de se esperar, o consumo de glicose foi ligeiramente mais rápido onde não havia gasolina e/ou metais presentes no meio, que provavelmente causaram um efeito inibitório nos microrganismos, como mostrado nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16. Devido a problemas técnicos, as amostras contendo glicose, coletadas durante os experimentos a partir de pré-inóculo com glicose, foram prejudicadas, inviabilizando suas análises.

#### **4.6. Experimentos para localização dos metais durante o cultivo em sistemas co-contaminados**

Visto que o consórcio 1 não apresentou crescimento em meio contendo somente gasolina, de forma contrária ao consórcio 2, decidimos utilizar apenas este nos experimentos posteriores.

#### 4.6.1. Influência da presença de EPS no crescimento

Os experimentos realizados com a mistura de metais na presença ou ausência de EPS resultaram em valores finais de biomassa similares, como mostrado na Tabela 4.5, a seguir.

**Tabela 4.5.** Efeito da presença de EPS no crescimento do consórcio 2 em um meio contendo metais pesados e gasolina, após 30 horas de cultivo.

Tempo (h)	Concentração de proteína no meio 1 (g/L)	Concentração de proteína no meio 2 (g/L)	Concentração de proteína no meio 3 (g/L)
0	0.10 ± 0.013	0.11 ± 0.010	0.10 ± 0.011
30	0.11 ± 0.009	0.19 ± 0.015	0.17 ± 0.020

1. Contendo apenas EPS 0,05 g/L
2. Contendo gasolina (0,1 % (v/v)) e metais pesados (1 ppm de cada)
3. Contendo gasolina (0,1 % (v/v)), metais pesados (1 ppm de cada) e EPS (0,05 g/L)

Os resultados apresentados na Tabela 4.5 confirmam que o consórcio 2 realmente parece estar adaptado às concentrações de metais pesados usadas nos experimentos, e que a EPS, na concentração utilizada, não promoveu uma melhora no crescimento, em concordância com o descrito por Malik (2004). De acordo com o autor, consórcios de multi-espécies são considerados mais eficientes que culturas puras, devido à grande resistência contra flutuações ambientais e às relações metabólicas entre seus membros.

De acordo com Congeevaram e colaboradores (2007), populações microbianas em ambientes poluídos com metais se adaptam às concentrações tóxicas destes, e se tornam resistentes. Os autores reportam que diferentes espécies de *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Sporophyticus*, *Bacillus* e *Phanerochaete* são redutores eficientes de Cr<sup>3+</sup> e Ni<sup>2+</sup>. Haq e colaboradores (1999) descreveram que três espécies isoladas de efluentes industriais (uma de *Enterobacter cloacae* e duas de *Klebsiella* spp.) mostraram resistência a altas concentrações de Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Cr<sup>3+</sup>, e foram capazes de remover

aproximadamente 85 % de cádmio do meio. Roane e Pepper (2000) reportaram que uma redução significativa de cádmio solúvel foi observado durante o crescimento de *Bacillus* H9 e *Pseudomonas* H1. Por outro lado, Riser-Roberts (1998) observou que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas paucimobilis* e *Proteus mirabilis* são espécies comumente encontradas em sistemas contaminados com hidrocarbonetos. De acordo com Saxena e colaboradores (2001), *Pseudomonas putida* S4, isolada de drenagens minas de cobre, foram capazes de acumular metais de meios de crescimento suplementados com metais, e também de remover  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  de efluentes de minas e outros efluentes.

Em contrapartida, Sandrin e colaboradores (2000) observaram uma melhora no crescimento de *Bulkholderia* sp. na presença de meio saturado de cádmio, causada pela adição de um ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Eles confirmaram que a presença do ramnolipídeo reduziu significativamente o efeito tóxico causado pelas altas concentrações de cádmio e naftaleno no meio de cultivo.

#### 4.6.2. Biorremediação de metais pesados

A Tabela 4.6 apresenta dados referentes à eficiência de remoção de metais ( $\eta$ ) pela superfície celular, pela interiorização pelas células, e pela EPS.

**Tabela 4.6.** Eficiência de remoção dos metais.

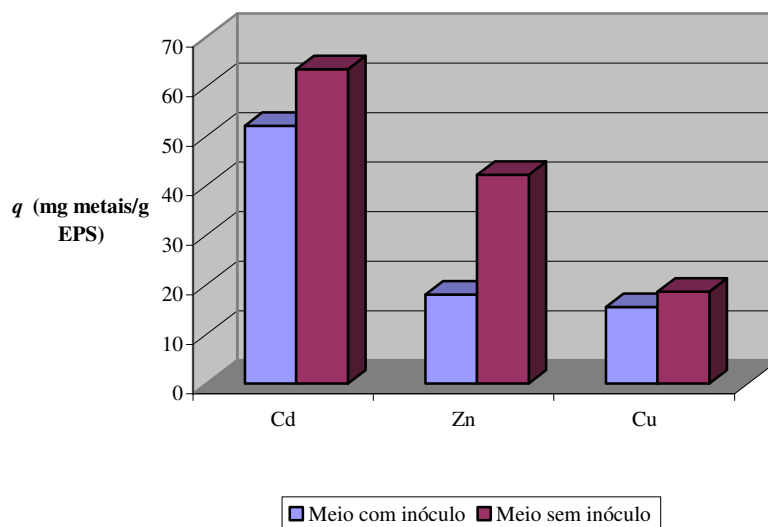
<b>Experimentos na ausência de EPS</b>	<b>Eficiência de remoção</b>		
	<b>Cd<sup>2+</sup></b>	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>Cu<sup>2+</sup></b>
Metais adsorvidos na superfície celular	4,33 %	39,05 %	12,36 %
Metais interiorizados pelas células	1,77 %	15,78 %	9,36 %
<b>Experimentos na presença de EPS</b>	<b>Cd<sup>2+</sup></b>	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>Cu<sup>2+</sup></b>
Metais adsorvidos na superfície celular	3,51 %	30,33 %	14,57 %
Metais interiorizados pelas células	1,84 %	17,02 %	10,36 %
Metais adsorvidos na EPS	87,12 %	19,82 %	37,64 %
<b>Experimentos na presença de EPS e sem inóculo</b>	<b>Cd<sup>2+</sup></b>	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>Cu<sup>2+</sup></b>
Metais adsorvidos na EPS	98,00 %	53,25 %	51,69 %

É possível notar, nos experimentos contendo ou não EPS, que nas condições experimentais de crescimento em gasolina e durante o tempo de cultivo, a maior parte de Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> foi adsorvida pela superfície celular, e não interiorizada pelas células. A quantidade de Cd<sup>2+</sup> que é interiorizada pelas células e também adsorvida é menor do que a de Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, e pode ser explicada pela alta toxicidade do cádmio aos microrganismos (Roane *et al.* 2001; Hughes e Poole, 1989). Uma vez que zinco é um metal essencial para as células, assim como o cobre, a quantidade de ambos metais que foi interiorizada foi relativamente alta, e a quantidade de zinco foi maior provavelmente porque está envolvido em várias atividades enzimáticas das células (Hughes e Poole, 1989).

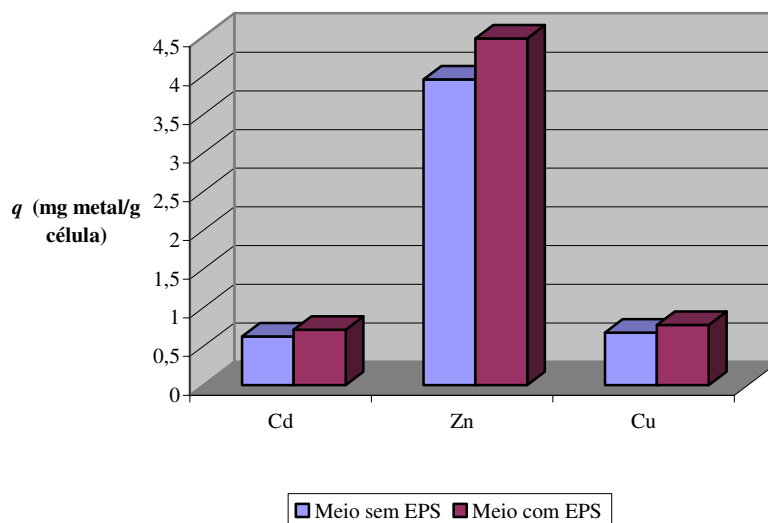
Hassen e colaboradores (1998) apresentaram resultados envolvendo uma ordem decrescente de toxicidade de metais no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas paucimobilis* e *Proteus mirabilis*: Hg<sup>2+</sup>>Co<sup>2+</sup>>Cd<sup>2+</sup>>Cu<sup>2+</sup>=Cr<sup>3+</sup>>Zn<sup>2+</sup>.



No que diz respeito à remoção de metais pela EPS, é possível verificar que a eficiência de remoção de cádmio foi maior do que a de zinco e cobre, nos meios contendo ou não inóculo. Esse fato pode ser justificado por uma maior afinidade à EPS do que à superfície celular. As Figuras 4.18 e 4.19 mostram a capacidade de captação de metais ( $q$ ) pela superfície celular e pela EPS.



**Figura 4.18.** Capacidade de captação de metais pela EPS.



**Figura 4.19.** Capacidade de captação de metais pela superfície celular.

A capacidade de captação de metais pela EPS solúvel foi afetada pela presença de células (Figura 4.18), provavelmente devido à formação de um biofilme protetor em torno delas, reduzindo a quantidade de EPS livre disponível para adsorção dos íons metálicos. De acordo com Priester e colaboradores (2007) e Ramey e colaboradores (2004), biofilmes bacterianos são estruturas tri-dimensionais que consistem em substâncias poliméricas extracelulares. Os estudos de crescimento (Tabela 4.5) mostraram que o consórcio não usa a EPS como fonte de carbono. Desta forma, é também possível explicar porque a adsorção pela superfície celular foi um pouco maior no meio contendo EPS (Figura 4.19). Uma vez que a superfície celular está envolvida pela EPS, a quantidade de metais pesados adsorvidos seria maior.

### 4.6.3. Consumo dos hidrocarbonetos da gasolina

Para avaliar o consumo de hidrocarbonetos da gasolina nos experimentos na ausência ou presença de EPS, as frações de benzeno, tolueno, etilbenzeno, meta- e para-

xilenos, e orto-xileno foram quantificadas. Os resultados são apresentados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7.** Consumo das frações de gasolina.

<b>Consumo de frações de gasolina em meios contendo metais pesados</b>	<b>Tolueno</b>	<b>Etilbenzeno</b>
Experimento sem EPS	38,4 %	67,2%
Experimento com EPS	39,2%	91,0%

OBS.: Benzeno e xilenos não apresentaram variação, e por isso não constam na tabela.

Esses resultados foram calculados deduzindo-se as perdas por evaporação em relação ao controle realizado na ausência de biomassa. No que diz respeito ao benzeno e xilenos, não foi observado nenhuma diminuição nos picos do cromatograma, sugerindo que a presença de EPS não afetou o consumo desses hidrocarbonetos, e houve apenas uma pequena diminuição no pico do tolueno no cromatograma, indicando que a presença de EPS causou um pequeno aumento no consumo dessa fração. Por outro lado, é possível observar que, embora o crescimento celular tenha sido quase o mesmo nos meios contendo ou não EPS, ao fim de 30 horas, a presença de EPS levou a um alto consumo de etilbenzeno e, conseqüentemente, a uma melhor resposta de biodegradação, que pode ser justificada pelo provável efeito protetor que a EPS causa nas células. Merroun e colaboradores (2003) reportaram que os metais pesados tóxicos acumulam principalmente na EPS em experimentos realizados com *Myxococcus xanthus*, e esse fato sugeriria que os polímeros extracelulares podem proteger essa mixobactéria em seu habitat porque fixam metais pesados em torno das células, evitando sua interiorização. De acordo com Tsuneda e colaboradores (2003), uma EPS cobrindo a superfície celular altera suas características físico-químicas, como propriedades poliméricas, hidrofobicidade e carga, o que poderia favorecer a troca iônica. Uma vez que a

concentração de EPS utilizada nos experimentos não foi otimizada, é possível prever que esses resultados poderiam ser melhorados pelo emprego de concentrações adequadas de EPS, de acordo com sua concentração micelar crítica (CMC). Em sua revisão, Mulligan (2005) relatou que concentrações de ramnolípídeos abaixo da CMC melhoram a mineralização de hidrocarbonetos, enquanto concentrações acima da CMC aumentam sua mobilidade.

O uso de alguns hidrocarbonetos preferenciais pelo metabolismo dos microrganismos foi detectado em outras pesquisas. Alguns autores empregaram gasolina e derivados complexos em seus experimentos, e também verificaram uma diminuição significativa na concentração de alguns hidrocarbonetos quando comparado com outras frações (Cunha e Leite, 2000). Vieira e colaboradores (2007) mostraram que os compostos aromáticos da gasolina (benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m*-xileno e *o*-xileno) apresentaram baixa biodegradabilidade em face ao ataque microbiano quando comparado com as frações parafínicas e isoparafínicas, em experimentos conduzidos em meio líquido.

As concentrações de metais pesados e gasolina usadas neste trabalho foram baixas; entretanto, são maiores que as concentrações permitidas pelas leis brasileiras para diversas classes de águas doces e salgadas (Resolução CONAMA nº 357). É possível observar que tais concentrações não afetam significativamente o crescimento microbiano, sugerindo que a atenuação natural do sistema é uma alternativa apropriada para casos onde a contaminação com hidrocarbonetos e metais pesados não alcança altos níveis. Embora as concentrações residuais de metais ainda estejam mais altas do que as permitidas pela legislação, o pequeno intervalo de tempo nos quais os experimentos foram realizados e a possibilidade do crescimento celular contínuo observado na Figura 4.15, permite supor que seria possível ocorrer um maior consumo dos compostos orgânicos, e o sistema poderia atingir os limites de descarte para ambos poluentes.

De acordo com Malik (2004), muitas vezes a bioissorção sozinha pode não ser suficiente para uma remediação de metais efetiva. Nessa situação, a aplicação de células

ativas e em crescimento poderia ser uma opção mais adequada devido à habilidade das células em se auto-restabelecer, promovendo uma captação metabólica contínua dos metais após a adsorção física, e o potencial de otimização por meio do desenvolvimento de espécies resistentes e modificação da superfície celular. Assim, esse fato reforça a possibilidade na qual o sistema seria naturalmente auto-depurado dos componentes orgânicos na presença de metais pesados.

Por outro lado, ainda há a possibilidade de produção de EPS pelo consórcio usado, o que poderia justificar sua maior resistência aos metais pesados. Roane e colaboradores (2001) reportaram que espécies de *Pseudomonas* H1 e *Bacillus* H9, isoladas de solo, mostraram evidências de produção de EPS, e foram resistentes a altas concentrações de cádmio.

Esses resultados também mostraram que a captação de metais e a eficiência de remoção pela EPS foram relativamente altas, e poderiam representar uma aplicação potencial em sistemas co-contaminados com altas concentrações de hidrocarbonetos e metais, evitando o efeito negativo causado pelos metais pesados na biodegradação de poluentes orgânicos, conforme relatado por Lin e colaboradores (2006), Hoffman e colaboradores (2005) e Sandrin e colaboradores (2000).

#### **4.7. Experimentos para determinação da melhor concentração de EPS para favorecer o crescimento celular**

A tabela a seguir (Tabela 4.8) apresenta os dados de crescimento dos diversos experimentos realizados.

**Tabela 4.8.** Resultados de crescimento do consórcio 2 nos experimentos utilizados para o planejamento experimental.

Tempo (h)	Concentração protéica (mg/L)								
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9
0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	18	19	11	17	14	0	18	18	20
14	41	20	23	19	37	41	46	37	34
24	30	29	20	16	27	15	27	35	32
30	22	35	10	35	9	0	53	55	24

Exp. 1: gasolina 0,1 % v/v; metais 1 ppm cada; EPS 0,01 g/L.

Exp. 2: gasolina 0,1 % v/v; metais 1 ppm cada; EPS 0,05 g/L.

Exp. 3: gasolina 0,1 % v/v; metais 5 ppm cada; EPS 0,01 g/L.

Exp. 4: gasolina 0,1 % v/v; metais 5 ppm cada; EPS 0,05 g/L.

Exp. 5: gasolina 1,0 % v/v; metais 1 ppm cada; EPS 0,01 g/L.

Exp. 6: gasolina 1,0 % v/v; metais 1 ppm cada; EPS 0,05 g/L.

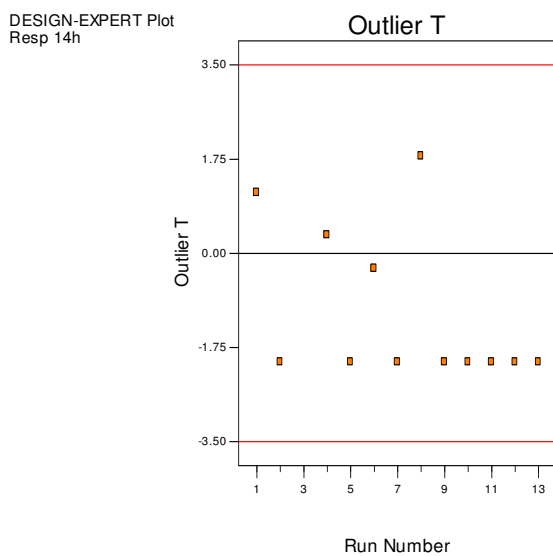
Exp. 7: gasolina 1,0 % v/v; metais 5 ppm cada; EPS 0,01 g/L.

Exp. 8: gasolina 1,0 % v/v; metais 5 ppm cada; EPS 0,05 g/L.

Exp. 9: gasolina 0,55 % v/v; metais 3 ppm cada; EPS 0,03 g/L, média de 5 experimentos.

De acordo com os resultados acima, o tempo de 14 horas foi escolhido como variável de resposta, e os valores de concentração protéica correspondentes foram utilizados para a geração do modelo.

A Figura 4.20 apresenta o gráfico *Outlier T* para o crescimento celular em 14 horas. É possível observar que todos os dados estão inseridos no intervalo de confiança.



**Figura 4.20.** Gráfico *Outlier T* para o crescimento celular do consórcio 2 em 14 horas.

A Tabela 4.9, a seguir, apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo mais adequado para o crescimento em 14 horas, relacionado às concentrações de gasolina, metais e EPS ( $C_{Gas}$ ,  $C_M$  e  $C_{EPS}$ , respectivamente).

**Tabela 4.9.** Análise de variância – Modelo cúbico reduzido para crescimento do consórcio 2 em 14 horas.

Fator	Estatísticas					
	Graus de liberdade	Média quadrada	Valor de F	Prob>F	Coefficiente estimado	Erro padrão
Modelo	7	2,552E-004	12,99	0,0130		
Interseção	1				0,051	1,279E-003
$C_{EPS}$ (A)	1	9,461E-004	48,17	0,0023	0,011	1,567E-003
$C_M$ (B)	1	5,513E-005	2,81	0,1692	-2,625E-003	1,567E-003
$C_{Gas}$ (C)	1	4,050E-005	2,06	0,2243	-2,250E-003	1,567E-003
AB	1	1,620E-004	8,25	0,0454	4,500E-003	1,567E-003
AC	1	4,061E-004	20,68	0,0104	7,125E-003	1,567E-003
BC		1,361E-004	6,93	0,0580	4,125E-003	1,567E-003
ABC		4,050E-005	2,06	0,2243	-2,250E-003	1,567E-003
Resíduo	4	1,964E-005				
Lack of fit	1	4,537E-005	4,10	0,1360		
Erro puro	3	1,106E-005				

$R^2 = 0,9579$

Valores de Prob > F menores que 0,0500 indicam que os termos do modelo são significantes, e valores maiores que 0,1000 indicam que os termos não são significantes. Nesse caso, o termo concentração de EPS (A) e suas combinações (concentração de EPS e concentração de metais – AB, e concentração de EPS e concentração de gasolina – AC) são significantes. Também é possível notar que o efeito da concentração de metais combinado com a concentração de gasolina é relativamente significativo, uma vez que o valor de Prob > F se situou entre 0,0500 e 0,1000. O valor de Prob > F para o teste *lack*



*of fit* indica que ele não é significativo relativamente ao erro puro, o que é uma indicação favorável, uma vez que é de interesse que o modelo se ajuste.

Os coeficientes estimados dos efeitos concentração de metais (*B*), concentração de gasolina (*C*), e na combinação desses efeitos com a concentração de EPS (*ABC*) são menores que seus erros, indicando que esses fatores não são estatisticamente significantes. Assim, o modelo matemático codificado simplificado empregado para o crescimento do consórcio em 14 horas ( $\chi$ ) – expresso em concentração protéica – é dado pela Equação 4.9:

$$\chi = 0,051 + 0,011A + 4,500 \cdot 10^{-3} AB + 7,125 \cdot 10^{-3} AC + 4,125 \cdot 10^{-3} BC \quad (4.9)$$

A equação final em termos de fatores reais é:

$$\chi = 0,078 - 0,435C_{EPS} + 0,181C_{EPS}C_M + 1,167C_{EPS}C_{Gas} + 8,333 \cdot 10^{-3}C_M C_{Gas} \quad (4.10)$$

Com as ferramentas oferecidas pelo *software*, é possível determinar como variará o crescimento celular (dentro do intervalo obtido no planejamento) se as concentrações de metais e gasolina forem máximas, variando-se a concentração de EPS dentro do máximo e mínimo. Esses dados são apresentados na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10.** Valores máximos do crescimento celular ( $\chi$ ) obtidos quando as concentrações de metais e gasolina são máximas, variando-se a concentração de EPS.

	$C_{EPS}$ (g/L)	$C_M$ (ppm)	$C_{Gas}$ (%v/v)	$\chi$ (g/L)
Menor concentração de EPS oferecida pela otimização	0,03	5,0	1,0	0,0508
Maior concentração de EPS oferecida pela otimização	0,05	5,0	1,0	0,0704

É possível observar, por meio da avaliação do planejamento experimental empregado que, em condições onde as concentrações de metais e gasolina são mais elevadas, um aumento na concentração de EPS de 0,03 para 0,05 g/L causa um acréscimo no crescimento de cerca de 39 %. Ou seja, aumentando a concentração dessa substância, o crescimento é favorecido, com a diminuição de um possível efeito tóxico causado pela presença de metais no sistema. Sendo assim, esses resultados são indicativos de que uma otimização da concentração de EPS, de acordo com o sistema contaminado, pode levar a uma intensificação no processo de biorremediação.

# ***Capítulo 5***

## ***Conclusões e Sugestões***

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1. Conclusões

- A bactéria *Paenibacillus polymyxa* produziu uma substância polimérica extracelular com concentração máxima de 0,35 g/L, após 20 horas de crescimento, quando já não havia substrato no meio de cultivo. Após esse tempo, a concentração de EPS diminuiu, possivelmente indicando que está sendo consumida pelo microrganismo;
- A EPS produzida por *Paenibacillus polymyxa* foi capaz de captar os íons  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  de uma solução aquosa. O planejamento experimental mostrou que os tempos usados na adsorção (8, 16 e 24 horas) não influenciaram as respostas (eficiência de remoção –  $\eta$  e capacidade de captação –  $q$ ), indicando que o equilíbrio de adsorção foi atingido antes de 8 horas. Os melhores resultados para a capacidade de captação de metais ( $q$ ) foram conseguidos com uma concentração de EPS ( $C_{EPS}$ ) igual a 0,01 g/L, o que era previsível, devido à fórmula geral de  $q$ , que é inversamente proporcional à concentração da substância;
- Para uma concentração de EPS igual a 0,01 g/L, os valores máximos de eficiência de remoção obtidos foram, em %: 64,6 ( $\text{Cd}^{2+}$ ); 63,0 ( $\text{Zn}^{2+}$ ); e 68,4 ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Para uma concentração de EPS igual a 0,25 g/L, os valores de eficiência de remoção encontrados foram, em %: 67,3 ( $\text{Cd}^{2+}$ ); 68,7 ( $\text{Zn}^{2+}$ ); e 70,1 ( $\text{Cu}^{2+}$ ). As diferenças nos valores de  $\eta$  foram de apenas 4,2 % para  $\text{Cd}^{2+}$ , 9,0 % para  $\text{Zn}^{2+}$  e 2,5 % para  $\text{Cu}^{2+}$ ;
- A técnica de propagação do consórcio a partir de glicose resultou em um consórcio que não apresentou crescimento celular significativo na presença de gasolina (consórcio 1); entretanto, ele se mostrou mais sensível à presença de metais no meio, refletido no aumento da fase lag da curva de crescimento nos

meios onde os íons metálicos estavam disponíveis. A adição da EPS diminuiu o efeito inibitório dos metais, provavelmente devido a um fenômeno de adsorção destes, indisponibilizando-os aos microrganismos, que tiveram uma melhora no crescimento, refletida na diminuição da fase lag do crescimento, anteriormente ampliada pela presença dos metais;

- Quando diferentes pré-inóculos foram realizados – utilizando glicose ou gasolina como fontes de carbono – o crescimento nas primeiras horas de contato foi ligeiramente favorecido (para o consórcio 2, propagado a partir de gasolina), nos experimentos onde o inóculo foi obtido do pré-inóculo contendo gasolina, provavelmente devido ao fato de esse consórcio estar adaptado ao crescimento na presença dos hidrocarbonetos;
- A presença de metais no meio inibiu levemente o crescimento do consórcio 2, mas após algum tempo os experimentos envolvendo ou não metais alcançaram praticamente os mesmos valores de biomassa, e uma explicação provável para esse fato é que possivelmente tal consórcio, propagado sob condições desfavoráveis (presença de hidrocarbonetos), pode ter desenvolvido uma resistência maior aos metais no meio;
- Nos experimentos para localização dos metais pesados, é possível observar que a aplicação da EPS no sistema co-contaminado não pareceu influenciar o crescimento microbiano, até porque a presença de baixas concentrações de metais pesados não pareceu afetar tal crescimento. Por outro lado, a presença da substância aumentou em cerca de 24 % a degradação de etilbenzeno. A EPS também apresentou boa capacidade de sorção dos íons metálicos, demonstrando aplicação potencial na desintoxicação de ambientes contaminados por metais, permitindo uma melhora da atividade microbiana sobre os hidrocarbonetos da gasolina;
- Os resultados demonstraram que um sistema com baixas concentrações de poluentes orgânicos (0,1 % (v/v) de gasolina) e inorgânicos (1 ppm de cada

metal) poderia ser susceptível à atenuação natural, se o processo fosse conduzido em um maior intervalo de tempo, sem a necessidade de intervenção;

- Um aumento na concentração de EPS num sistema contendo 1,0 % (v/v) de gasolina e 5 ppm de cada metal levou a uma melhora no crescimento do consórcio, indicando que ocorre uma redução do efeito inibitório causado pelos metais sobre o metabolismo microbiano.

## 5.2. Sugestões

Este foi um trabalho para avaliar o efeito causado pela presença de uma substância polimérica extracelular na biorremediação de sistemas co-contaminados. Desta forma, existem várias sugestões para trabalhos futuros.

No que diz respeito à EPS em si, pode-se procurar caracterizar essa substância, além de se determinar sua CMC (concentração micelar crítica). Uma técnica alternativa para a quantificação de metais pode ser a análise térmica, em substituição à espectrometria de absorção atômica.

Sabe-se que temperatura, pH e competição entre íons são fatores bastante importantes e que influenciam consideravelmente o processo de bioadsorção. Sendo assim, um planejamento experimental envolvendo esses três fatores seria bastante interessante, a fim de se observar as variações encontradas nas respostas eficiência de remoção e capacidade de captação. Ainda, é importante construir as isotermas de captação dos metais a fim de se determinar os valores de  $q_{máx}$ .

Pode-se, também, propor novos métodos de propagação de consórcios microbianos a partir de amostras do solo, e otimizar as condições para tal.

Os experimentos conduzidos nesse trabalho envolveram intervalos de tempo pequenos, quando comparados aos empregados nos processos de biorremediação de sistemas contaminados. Desta forma, para uma avaliação mais precisa, uma alternativa é avaliar por um intervalo de tempo mais longo, de semanas ou até meses, o comportamento do consórcio em um sistema aquoso contendo gasolina e metais pesados, com a realização de amostragens periódicas para determinação do crescimento celular, consumo de hidrocarbonetos e biodisponibilidade dos metais, na presença ou não de EPS.

Por fim, visto que os experimentos foram realizados em sistemas sintéticos, a aplicação da EPS em um sistema real contaminado é de grande interesse, como forma de se avaliar seu efeito no metabolismo de um consórcio microbiano em um ambiente naturalmente contaminado.

# ***Capítulo 6***

## ***Referências Bibliográficas***



## CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBONDANZI, F.; CAMPISI, T.; FOCANTI, M.; GUERRA, R.; IACONDINI, A. Assessing degradation capability of aerobic indigenous microflora in PAH-contaminated brackish sediments. **Marine Environmental Research**, n. 59, p. 419-434, 2005.
2. ACOSTA, M. P.; VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F.; BATTAGLINI, F.; RUZAL, S. M. Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 21, p. 1157-1163, 2005.
3. ADENIYI, A. A.; AFOLABI, J. A. Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in Lagos metropolis. **Environment International**, n. 28, p. 79-82, 2002.
4. AICHBERGER, H; HASINGER, M.; BRAUN, R.; LOIBNER, A.P. Potencial of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil. **Biodegradation**, v. 16, n. 02, p. 115-125, 2005.
5. AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption performance of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd(II) and Cu(II) ions from aqueous solutions. **Minerals Engineering**, n. 18, p. 1099-1109, 2005.
6. ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. San Diego, USA: American Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1999, 453 p.
7. AL-SALEH, E.S.; OBUEKWE, C. Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 56, p. 1-7, 2005.
8. AMOR, L.; KENNES, C.; VEIGA, M.C. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals.

- Bioresource Technology**, n. 78, p. 181-185, 2001.
9. ATLAS, R.M. Microbial degradation of hydrocarbons of petroleum: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, n. 01, p. 180-209, 1981.
  10. BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, n. 96, p. 1049-1055, 2005.
  11. BERNOTH, L.; FIRTH, I.; McALLISTER, P.; RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Minerals & Metallurgical Processing**, v. 17, n. 02, p. 105-111, 2000.
  12. BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, n. 74, p. 63-67, 2000.
  13. CARMONA, M. E. R.; SILVA, M. A. P.; LEITE, S. G. F. Biosorption of chromium using factorial experimental design. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 779-788, 2005.
  14. CHAÎNEAU, C.H.; ROUGEUX, G.; YÉPRÉMIAN, C.; OUDOT, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 37, p. 1490-1497, 2005.
  15. CHEN, X.C.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; SHI, L.Y.; WU, W.X.; CHEN, Y.X. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. **Colloids and Surfaces**, n. 46, p. 101-107, 2005.
  16. COLLINA, E.; BESTETTI, G.; DI GENNARO, P.; FRANZETTI, A.; GUGLIERSI, F.; LASAGNI, M.; PITEA, D. Naphtalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor. **Environmental International**, n. 31,

- p. 167-171, 2005.
17. COMTE, S.; GUIBAUD, G.; BAUDU, M. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. **Journal of Hazardous Materials**, 151(1), p. 185-193, 2008.
  18. CONGEEVARAM, S.; DHANARANI, S.; PARK, J.; DEXILIN, M.; THAMARAISELVI, K. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials**, n. 146, p. 270-277, 2007.
  19. CORDEIRO, C.M.M. **Caracterização de um biossurfactante produzido pela cepa *Serratia sp.* obtido a partir de diferentes condições de meio de cultivo visando sua aplicação na redução da tensão superficial e captação de metais pesados**. 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
  20. CORSEUIL, H.X.; MARINS, M.M. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave? **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 02, n. 02, p. 50-54, 1997.
  21. CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 31, p. 45-49, 2000.
  22. 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 with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, n. 39, p. 2277-2282, 2004.
  23. DA CUNHA, C.D. **Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade microbiana presente**. 2004. 176 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química,

- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
24. DÍAZ-RAVINA, M.; BÅÅTH, E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 08, p. 2970-2977, 1996.
25. DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, n. 87, p. 113-120, 2003.
26. FONSECA, R. R.; SILVA, A. J. R.; CARDOSO, V. L.; DE FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* isolated strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 136, n. 14, p. 471-486, 2007.
27. FURTADO, M.R. Remediação de solos – Estudo das condições naturais do solo define técnica ideal para recuperar área contaminada e seu potencial de biorremediação. **Revista Química e Derivados on line**, Maio 2007. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd446/remediacao1.htm>. Acesso em: 17 ago. 2007.
28. GILLER, K.E.; WITTER, E; MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 10, p. 1389-1414, 1998.
29. GUIBAUD, G; COMTE, S.; BORDAS, F.; BAUDU, M. Metal removal from single and multimetallic equimolar systems by extracellular polymers extracted from activated sludges as evaluated by SMDE polarography. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 661-668, 2005a.
30. GUIBAUD, G.; COMTE, S.; BORDAS, F.; DUPUY, S.; BAUDU, M. Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains,

- for cadmium, lead and nickel. **Chemosphere**, n. 59, p. 629-638, 2005b.
31. GUIBAUD, G.; TIXIER, N.; BOUJU, A.; BAUDU, M. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. **Chemosphere**, n. 52, p. 1701-1710, 2003.
32. GUTNICK, D.L.; BACH, H. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals: new products and novel formulations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 04, p. 451-460, 2000.
33. HAQ, R.; ZAIDI, S.K.; SHAKOORI, A.R. Cadmium resistant *Enterobacter cloacae* and *Kleisiella* sp. isolated from industrial effluents and their possible role in cadmium detoxification. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 15, p. 283-290, 1999.
34. HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, n. 68, p. 73-82, 1998.
35. HOFFMAN, D.R.; OKON, J.L.; SANDRIN, T.R. Medium composition affects the degree and pattern of cadmium inhibition of naphthalene biodegradation. **Chemosphere**, n. 59, p. 919-927, 2005.
36. HORSFALL JR., M.; ABIA, A.A.; SPIFF, A.I. Kinetics studies on the adsorption of Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions from aqueous solutions by cassava (*Manihot sculenta* Cranz) tuber bark waste. **Bioresource Technology**, n. 97, p. 283-291, 2006.
37. HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. **Metals and microorganisms**. USA: Springer, 1989, 424 p.
38. JÉZÉQUEL, K.; PERRIN, J.; LEBEAU, T. Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula. **Chemosphere**, n. 59, p. 1323-1331, 2005.

39. JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, n. 133, p. 71-84, 2005.
40. KACHLANY, S.C.; LEVERY, S.B.; KIM, J.S.; REHUS, B.L.; LION, L.W.; GHIORSE, W.C. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 03, p. 774-784, 2001.
41. LEE, K.; PARK, J-W; AHN, I-S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. **Journal of Hazardous Materials B**, n. 105, p. 157-167, 2003.
42. LIN, C.; CHEN, S.; CHENG, Y. Effect of metal in biodegradation kinetics for methyl-*tert*-butyl ether. **Biochemical Engineering Journal**, n. 32, p. 25-32, 2006.
43. LIU, H.; FANG, H.H.P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. **Journal of Biotechnology**, n. 95, p. 249-256, 2002.
44. LIU, Y; ZHANG, J.; ZHANG, Z. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas sp.* strain ZL5. **Biodegradation**, v. 15, n. 03, p. 205-212, 2004.
45. LOAËC, M.; OLIER, R.; GUEZENNEC, J. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolisaccharide. **Water Research**, v. 31, n. 05, p. 1171-1179, 1997.
46. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265-275, 1951.
47. MALIK, A. Metal remediation through growing cells. **Environmental International**, n. 30, p. 261-278, 2004.
48. MARÇANO, M.M. **Efeito da presença de cádmio e/ou biossurfactantes na**

- biodegradação de naftaleno.** 2004, 110 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
49. MASLIN, P.; MAIER, R.M. Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenantrene in organic-metal co-contaminated soils. **Bioremediation Journal**, v. 04, n. 04, p. 295-308, 2000.
50. MERROUN, M.L.; CHEKROUN, K.B.; ARIAS, J.M.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.T. Lanthanum fixation by *Myxococcus xanthus*: cellular location and extracellular polysaccharide observation. **Chemosphere**, n. 52, p. 113-120, 2003.
51. MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, n. 133, p. 183-198, 2005.
52. MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, n. 60, p. 371-380, 2001.
53. NICHOLSON, C.A.; FATHEPURE, B.Z. Aerobic degradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. **FEMS Microbiology Letters**, n. 245, p. 257-269, 2005.
54. NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 05, p. 772-776, 2002.
55. NOBRE, M.M.; NOBRE, R.C.M. Remediação de solos: técnicas alternativas melhoram desempenho. **Revista Química e Derivados on line**, Maio 2007. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd417/solo3.htm>. Acesso em: 17 ago. 2007.
56. PEREIRA, C.B. **População bacteriana associada à degradação de hidrocarbonetos de petróleo: uma abordagem molecular.** 2006. 177 p.

- Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
57. PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, n. 27, p. 9-13, 1998.
58. POTIN, O.; VEIGNIE, E.; RAFIN, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 51, p. 71-78, 2004.
59. PRIESTER, J.H.; HORST, A.M.; VAN DE WERFHORST, L.C.; SALETA, J.L.; MERTES, L.A.K.; HOLDEN, P.A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. **Journal of Microbiological Methods**, n. 06, p. 577-587, 2007.
60. RAHMAN, K.S.M; BANAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHAMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, n. 81, p. 25-32, 2002.
61. RAMEY, B.E.; KOUTSOUDIS, M.; VON BODMANN, S.B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, n. 07, p. 602-609, 2004.
62. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.
63. RIIS, V.; BABEL, W.; PUCCI, O.H. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. **Chemosphere**, n. 49, p. 559-568, 2002.
64. RISER-ROBERTS, E. **Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes**. USA: CRC Press LLC, 1998, 542 p.
65. ROANE, T.M.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. Dual bioaugmentation strategy



- to enhance remediation of cocontaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 07, p. 3208-3215, 2001.
66. ROANE, T.M; PEPPER, I.L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial Ecology**, n. 38, p. 358-364, 2000.
67. ROSS, D. Slurry-phase bioremediation: case studies and cost comparisons. **Remediation**, v. 01, n. 01, p. 61-74, 1991.
68. RYU, J-H.; BEUCHAT, L.R. Factors affecting production of extracellular carbohydrate complexes by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, n. 95, p. 189-204, 2004.
69. SALEHIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. **Water Research**, n. 37, p. 4231-4235, 2003.
70. SALMINEN, J.M.; TUOMI, P.M.; SUORTTI, A.; JØRGENSEN, K.S. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. **Biodegradation**, v. 15, n. 01, p. 29-39, 2004.
71. SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4585-4588, 2000.
72. SANNASI, P.; KADER, J.; ISMAIL, B.S.; SALMIJAH, S. Sorption of Cr(VI), Cu(II) and Pb(II) by growing and non-growing cells of a bacterial consortium. **Bioresource Technology**, n. 97, p. 740-747, 2006.
73. SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, n. 136, p. 187-195, 2005.
74. SAXENA, D.; GOWRY, P.M.; MAGO, R.; SRIVASTAVA, S. Removal of

- copper by *Pseudomonas putida* strain S4 isolated from copper mines. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 06, p. 590-593, 2001.
75. SERRANO, A.; GALLEGO, M.; GONZÁLEZ, J.L.; TEJADA, M. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. **Environmental Pollution**, n. 151, p. 494-502, 2008.
76. SHARMA, P.K.; RAO, K.H.; FORSSBERG, K.S.E.; NATARAJAN, K.A. Surface chemical characterization of *Paenibacillus polymyxa* before and after adaption to sulfide minerals. **International Journal of Mineral Processing**, n. 62, p. 3-25, 2001.
77. SHEN, G.; LU, Y.; HONG, J. Combined effects of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on urease activity in soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 63, p. 474-480, 2006.
78. SHU, C-H; LUNG, M-Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, n. 39, p. 931-937, 2004.
79. SRINATH, T.; VERMA, T.; RAMTEKE, P.W.; GARG, S.K. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere**, n. 48, p. 427-435, 2002.
80. TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M.C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 705-712, 2003.
81. THOMPSON, I.P.; VAN DER GAST, C.J.; CIRIC, L.; SINGER, A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. **Environmental Microbiology**, v. 07, n. 07, p. 909-915, 2005.
82. TRINDADE, P.V.O.; SOBRAL, L.G.; RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U. Bioremediation of a weathered and recently oil-contaminated

- soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, n. 58, p. 515-522, 2005.
83. TSUNEDA, S.; AIKAWA, H.; HAYASHI, H.; YUASA, A.; HIRATA, A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, n. 223, p. 287-292, 2003.
84. VAN STEMPOORT, D.R.; ARMSTRONG, J.; MAYER, B. Microbial reduction of sulfate injected to gas condensate plumes in cold groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**, n. 92, p. 184-207, 2007.
85. VIEIRA, P.A.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal of Hazardous Materials**, n. 140, p. 52-59, 2007.
86. VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1990, 396 p.
87. \_\_\_\_\_. **Sorption and biosorption**. Quebec, Canada: BV Sorbex, Inc., 2003, 315 p.
88. WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 12, p. 237-241, 2001.
89. WIEDEMANN, L.S.M.; D'AVILA, L.A.; AZEVEDO, D.A. Adulteration detection of Brazilian gasoline samples by statistical analysis. **Fuel**, n. 84, p. 467-473, 2005.
90. YILMAZ, E.I. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 409-415, 2003.
91. YU, S.H; KE, L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environmental International**, n. 31, p. 149-154, 2005.
92. ZHANG, D.; WANG, J.; PAN, X. Cadmium sorption by EPSs produced by

anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. **Journal of Hazardous Materials B**, n. 138, p. 589-593, 2006.

93. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Petr%C3%B3leo>. Acesso em: 05 nov. 2007.

94. <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/estatisticas/revenda.asp>. Acesso em: 05 nov. 2007.

95. [http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia\\_03.htm](http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_03.htm). Acesso em: 17 ago. 2007.