



**KELLY CRISTINA DOS REIS**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A  
Fe<sup>3+</sup> COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM  
BIORREMEDIAÇÃO**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**KELLY CRISTINA DOS REIS**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A  
Fe<sup>3+</sup> COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM  
BIORREMEDIAÇÃO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, área  
de concentração em  
Microbiologia Agrícola,  
para a obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Coorientador

Dr. Whasley Ferreira Duarte

**LAVRAS – MG**

**2013**

Reis, Kelly Cristina dos.

Seleção de bactérias resistentes a Fe<sup>3+</sup> com potencial aplicação em biorremediação / Kelly Cristina dos Reis. – Lavras : UFLA, 2013.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Cristina Ferreira Silva e Batista.

Bibliografia.

1. Solos contaminados. 2. Metais no solo. 3. Elementos-traço. 4. *Bacillus subtilis*. 5. Ferro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.9

**KELLY CRISTINA DOS REIS**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A  
Fe<sup>3+</sup> COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM  
BIORREMEDIAÇÃO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, área  
de concentração em  
Microbiologia Agrícola,  
para a obtenção do título de  
Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dra. Carla Luiza Ávila UFLA

Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada UEM

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2013**

À DEUS

Ao meu amado pai, Vitor

A minha amada mãe, Maria

Aos meus irmãos e sobrinhos

Aos meus pastores e 3ª igreja SNT

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, a oportunidade de realizar mais um sonho e por me proporcionar a paz que excede o entendimento em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia.

À professora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, por ser minha primeira porta de entrada na microbiologia e por desde o princípio acreditar que eu seria capaz, pela orientação, compreensão, dedicação, conselhos e amizade.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela amizade, companheirismo e ensinamentos, que foram de grande valia para a realização deste trabalho e para o meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte, pelo apoio e pelas orientações na etapa final desse trabalho e pela paciência.



À Doutora Carla Luiza da Silva Ávila, pelo apoio e conhecimentos repassados e por se dispor a participar como membro na banca examinadora.

A professora Dra. Katia Regina Freitas Schwan-Estrada da Universidade Estadual de Maringá por todo apoio e disposição em participar da banca examinadora.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela amizade e ensinamentos e por aceitar participação da banca examinadora.

Aos professores doutores Eustáquio, Romildo e Patrícia, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, pelo apoio nas análises de absorção atômica.

À FAPEMIG, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos colegas de laboratório Angélica, Suzana, Fernanda, Andréia, Cíntia, Gabi, Carol, Karla, Alenir, Monique, Janaira, Emerson, Maiara, Thiago, Bia,

Mariana Dias, Mariana Rabelo, Igor, Claudia Auler, Claudia Puerari, William, Ana Luiza, Noelly, Noelly Alves, Juliana, Roberta, Mariana Lino, pelo carinho e pelos momentos de descontração. Aos estagiários Mateus e Maria Luiza pela força. Em especial às queridas Stefanie Crivelari e Vanessa Mesquita, por todo apoio no decorrer desse trabalho e pela amizade.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho. Especialmente à Ivani, Cidinha, Paulinho, Rose, Dona Iron e Du.

Agradeço aos meus amadíssimos pais Vitor e Maria, fundamentais em minha vida, pelo amor incondicional; aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados, tios, que sempre estiveram ao meu lado, por todo amor e carinho.

Aos meus amados pastores, por toda força em oração e todo cuidado e à minha igreja 3ª Sara Nossa Terra, que sempre esteve presente em oração, em todos os momentos.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

*“Ao homem pertencem os planos do coração, mas do Senhor vem a resposta da língua.”*

*Provérbios 16:1*

*“E a paz de Deus, que  
excede todo o entendimento,  
guardará os vossos corações  
e os vossos sentimentos em  
Cristo Jesus.”*

*Filipenses 4:7*

*“Um pouco de ciência  
nos afasta de Deus. Muito,  
nos aproxima.”*

*Louis Pasteur*

## RESUMO GERAL

A biorremediação é uma técnica que utiliza o metabolismo de microrganismos no tratamento de áreas impactadas com compostos orgânicos tóxicos ou inorgânicos, como os elementos-traços. O uso de bactérias como agentes em processos de biorremediação de solos contaminados com elementos traços como ferro, manganês entre outros é uma alternativa promissora para recuperação desses ambientes. Objetivou-se, neste trabalho, selecionar bactérias isoladas de solos preservados do Cerrado e de frutos de café e cacau capazes de crescer em diferentes concentrações de  $Fe^{3+}$ . Os isolados pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da UFLA. A avaliação da capacidade de crescimento a altas concentrações de ferro foi realizada e o meio utilizado para crescimento foi o Quimicamente Definido (QD), contendo concentrações da solução de ferro de 5, 500 e 1000 mg/L e o controle sem adição de Ferro. Os isolados UFLACESB 127 (*Bacillus simplex*), bactérias do solo do Cerrado, UFLASCF 590 (*Bacillus subtilis*) bactérias do café e UFLADR 6.12 (*Acetobacter tropicalis*) bactérias do cacau, destacaram-se por apresentarem melhor crescimento, quando cultivado em QD, com a concentração máxima de ferro. A seleção dos fatores

físicos foi realizada utilizando o planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB), seguido de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As variáveis estudadas foram: pH, concentração de glicose, concentração de ferro, concentração do inóculo, concentração de nitrogênio, concentração de potássio, concentração de fosfato e coenzima, sendo que a variável resposta analisada foi a absorção de ferro em 7 dias de cultivo e a interpretação dos resultados foi realizada com o auxílio do programa Design-Expert 8.0. Dentre as variáveis testadas no PB, as que apresentaram resultados significativos foram pH 3,5 e concentração de ferro 0,750 g/L, sendo essas as condições otimizadas pelo programa estatístico para o processo de absorção de ferro da bactéria selecionada. Após a etapa de otimização, obteve-se um rendimento de 99,22%, sendo a validação realizada para confirmação do modelo para os resultados experimentais. Esses resultados indicam que há um potencial no uso desses isolados na remoção de ferro quando as condições são ajustadas, podendo ser uma alternativa promissora aos métodos de tratamento convencionais de solos contaminados. No entanto é necessário entender os mecanismos e a capacidade de remoção do ferro, por esses isolados, em diferentes tipos de solos.

Palavras-chave: Elementos-traço. Solo. *Bacillus subtilis*.

#### GENERAL ABSTRACT

Bioremediation is a technique which uses the metabolism of microorganisms in the treatment of areas impacted with organic or inorganic toxic compounds, such as trace elements. The use of bacteria as agents in bioremediation processes of soil contaminated with trace elements, such as iron, manganese among others, is a promising alternative for recovering these environments. The objective of this work was to select bacteria isolated from preserved soils in the Cerrado region and of coffee and cocoa fruits capable of growing in different concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$ . The isolates belong to the Culture Collection of the Microorganism Physiology and Genetic Laboratory of the Biology Department of UFLA. The evaluation of growth capacity at high concentrations of iron was performed using the Chemically Defined (CD) medium, containing iron solution concentrations of 5, 500 and 1000 mg/L and the control with no addition of iron. The UFLACESB 127 (*Bacillus simplex*) bacteria of the Cerrado soil, UFLASCF 590 (*Bacillus subtilis*) coffee bacteria and UFLADR 6.12 (*Acetobacter tropicalis*) cocoa bacteria isolated were highlighted for presenting better growth when cultivated in CD with



the maximum concentration of iron. The selection of the physical factors was performed using the Plackett-Burman (PB) type experimental planning, followed by a central rotatable composite design (CRCd). The studied variables were: pH, glucose concentration, iron concentration, inoculum concentration, nitrogen concentration, potassium concentration, phosphate concentration and coenzyme, with the response variable analyzed being iron absorption in 7 days of cultivating and the interpretation of the results done with the Design-Expert 8.0 program. Among the variables tested in the PB, those which presented significant results were pH 3.5 and iron concentration of 0.750 g/L, with these conditions optimized by the statistical program for the iron absorption process of the selected bacteria. After the optimization stage we obtained the efficiency of 99.22%, with validation performed in order to confirm the model for the experimental results. These results indicate that there is potential for the use of these isolates in removing iron when the conditions are adjusted, and may be a promising alternative to the conventional treatment methods of contaminated soils. However, it is necessary to understand the mechanisms and the capacity of iron removal of these isolated in different types of soil.

**Keywords:** Trace elements. Soil. *Bacillus subtilis*.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Cepas isoladas da coleção de bactérias do Cerrado de Minas Gerais – MG (COBA et al., 2012).....	68
Tabela 2	Cepas isoladas do café em diferentes etapas de fermentação (SCF) (SILVA et al., 2008).....	70
Tabela 3	Bactérias acéticas isoladas do cacau (PEREIRA et al., 2012).....	71
Tabela 4	Condições das variáveis em diferentes níveis usando Plackett-Burman para produção de biomassa e avaliação do teor de ferro residual em diferentes concentrações de ferro.....	75
Tabela 5	Projeto experimental de Plackett-Burman para 15 ensaios e 8 variáveis utilizados para selecionar os microrganismos UFLACESB127, UFLACSF590 E UFLADR 6.12 para otimização .....	76
Tabela 6	Condições das variáveis em diferentes níveis utilizando (DCCR) para produção de biomassa e avaliação da remoção de ferro residual do isolado selecionado.....	77
Tabela 7	Projeto experimental de DCCR para 8 ensaios e 2 variáveis utilizados para otimização do isolado selecionado no PB (matriz codificada).....	78
Tabela 8	Resultado qualitativo da avaliação da capacidade de crescimento dos isolados de bactérias incubadas por 48hs à 28°C.....	81
Tabela 9	Variáveis interrelacionadas e seus efeitos significativos na resposta referentes à absorção de ferro (g/L), durante 7 dias de cultivo à 28°C.....	85

Tabela 10 Tabela de análise de variância apresentando cada variável descrita para remoção de ferro, em 7 dias de cultivo, no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman .....	88
Tabela 11 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e suas respostas em relação ao ferro absorvido e biomassa produzida do isolado UFLASCF590 ( <i>Bacillus subtilis</i> ).....	91
Tabela 12 Tabela de análise de variância para os resultados experimentais do DCCR do isolado UFLASCF590, em 7 dias de cultivo .....	94

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução Geral .....	14
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Teores de metais no solo</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Solo</b> .....	21
<b>2.3</b>	<b>Comunidade Microbiana nos Solos</b> .....	23
<b>2.4</b>	<b>Elementos- Traços</b> .....	26
<b>2.4.1</b>	<b>Elementos-Traço presentes no Solo</b> .....	27
<b>2.4.2</b>	<b>Elementos- Traços e os Microrganismos</b> .....	30
<b>2.5</b>	<b>Remediação do Solo</b> .....	35
<b>2.5.1</b>	<b>Biorremediação</b> .....	38
<b>2.5.2</b>	<b>Biorremediação de elementos- traços</b> .....	42
<b>2.5.3</b>	<b>Biorremediação de Elementos -Traços utilizando bactérias</b> .....	43
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
	<b>CAPÍTULO 2</b> Otimização das condições de crescimento de bactérias isoladas de solo de Cerrado, fruto do café e fermentação do cacau no processo de biorremediação ambiental .....	57
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
<b>2.1</b>	<b>Microrganismos</b> .....	67
<b>2.2</b>	<b>Cultivo dos isolados</b> .....	71
<b>2.3</b>	<b>Seleção dos isolados de bactérias sob diferentes condições de ferro</b> .....	73
<b>2.4</b>	<b>Delineamento Experimental</b> .....	74
<b>2.4.1</b>	<b>Identificação das variáveis importantes para o crescimento do microrganismo: Delineamento Plackett-Burman</b> .....	74
<b>2.4.2</b>	<b>Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)</b> .....	77
<b>2.4.3</b>	<b>Determinação do ferro residual</b> .....	79
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>3.1</b>	<b>Seleção dos isolados de bactérias sob diferentes condições de ferro</b> .....	81
<b>3.2</b>	<b>Identificação das variáveis importantes para o crescimento do microrganismo: Delineamento Experimental Plackett-Burman</b> .....	84
<b>3.3</b>	<b>Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)</b> .....	90
<b>3.3.1</b>	<b>Análise de Variância</b> .....	90
<b>3.3.2</b>	<b>Interpretação gráfica do modelo de superfície de resposta: Otimização dos fatores significativos</b> .....	96
<b>3.3.3</b>	<b>Validação das condições de otimização</b> .....	99
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	100

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
--------------------------	------------

## CAPÍTULO 1 Introdução Geral

### 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional aliado à necessidade de atividades agropecuárias e industriais tem produzido diversos efeitos negativos sobre o meio ambiente. A poluição e degradação dos recursos naturais podem gerar desequilíbrios irreversíveis nos diferentes ecossistemas.

O minério de ferro é um metal essencial na indústria extrativa no Brasil, tanto em relação ao volume da produção quanto aos investimentos financeiros. O ferro, dentre os vários elementos existentes, tem despertado muito interesse, uma vez que, em concentrações acima do permitido, ou seja,  $5\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , é extremamente tóxico especialmente por não ser biodegradável.

Os métodos de tratamentos convencionais de solos contaminados por ferro, como a escavação dos solos contaminados, seguida de tratamento ou

disposição em aterros, têm sido utilizados para efetuar a remediação de locais contaminados. Esses métodos podem possibilitar impactos adicionais ao ambiente e gerar subprodutos com características recalcitrantes, além de constituir técnicas caras, e de baixa reprodutividade. Entre os métodos de tratamento alternativos, um dos mais promissores é a biorremediação, um processo em que se utilizam microrganismos autóctones sem qualquer interferência de tecnologias ativas (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes e oxigênio e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos. Esse método mostra-se interessante devido principalmente aos baixos custos, por serem técnicas com mínima intervenção.

O uso de microrganismos em tratamento de solos contaminados por ferro através da biorremediação, principalmente com bactérias, tem se destacado em relação aos outros métodos tradicionais, pois tais

microrganismos apresentam maior resistência a esse metal, o que proporciona seu crescimento e desenvolvimento em meios que contêm altas concentrações desses poluentes.

É no contexto da busca por métodos alternativos de tratamento de solos contaminados com minério de ferro que surge a necessidade da seleção de bactérias tolerantes a ferro férrico com potencial de biorremediação, visando à otimização dos processos de tratamento de solo contaminados com esse elemento-traço.

Objetivou-se, neste trabalho, selecionar bactérias resistentes a Ferro férrico, em escala laboratorial, visando verificar sua eficiência na absorção desse elemento-traço, a partir de uma prévia exposição da bactéria ao ferro.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Teores de metais no solo

Os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Dessa maneira, os problemas devido à ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados por meio de alterações na qualidade do solo, ar e água (KUNZ; ZAMORA; DURÁN, 2002).

O subsolo brasileiro possui importantes depósitos minerais, sendo parte dessa reserva considerada expressiva quando comparada ao restante do mundo. O Brasil produz cerca de 70 substâncias, sendo 21 dos grupos de minerais metálicos como Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Chumbo (Pb), Cobre (Cu) entre outros, 45 dos não metálicos entre os quais estão argila, gipsita entre outros e quatro dos energéticos (BARRETO, 2001). Em termos de

participação no mercado mundial em 2010, ressalta-se a posição do minério de ferro (82%), nióbio (4,7%), cobre (4,1%), manganês (0,6%), bauxita (0,7%) entre outros (PENNA, 2011).

O minério de ferro é um elemento essencial na indústria extrativista no Brasil, tanto em relação ao volume da produção quanto nos investimentos financeiros. Ele é utilizado na fabricação de aço e ferro fundido, possui aplicações na indústria de ferro-liga e de cimento e, utilizado também na construção e manutenção de estradas. O ferro é um metal de grande incidência na crosta terrestre, representando 5,1% em massa. Os principais minerais que contêm ferro são hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), goethita ( $\text{FeO}/\text{OH}$ ) e siderita ( $\text{FeCO}_3$ ). As formações ferríferas compostas de hematita e sílica, conhecidas como itabiritos, estão presentes nos maiores depósitos de ferro (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL - DNMP, 2009). Devido à

grande utilização dos depósitos de minérios de altos teores de ferro (>64% de Fe) (ROSIÈRE; CHEMALE JÚNIOR, 2000) torna-se de fundamental importância a extração de jazidas de minério que são de interesse, conhecidas como ganga (FARNESE; BARROSO, 2006).

Ferro (Fe) é o quarto mais abundante elemento na crosta (oxigênio, silício e alumínio) e por massa compõe cerca de 5,1% da crosta. No subsolo, a redução do Fe III está ligado à oxidação do carbono orgânico (C) e exerce uma forte influência na geoquímica terrestre e aquática (DONG et al., 2006; LEHOURS et al., 2009; LOVLEY, 1997).

As fontes de contaminação por Ferro podem ser naturais e antropogênicas. As primeiras resultam dos processos de intemperismo de minerais e, como fontes antropogênicas pode-se mencionar emissões associadas às atividades de mineração, fundição, polimento de

metais, fertilizantes agrícolas, efluentes industriais entre outros (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Nas plantas, os danos causados pela toxicidade do ferro podem ser diretos, por meio da absorção e acúmulo excessivo do elemento, ou indiretos, quando altos teores de Ferro na solução do solo resultam na sua precipitação sobre as raízes, formando uma crosta de ácido férrico, que altera a absorção de outros nutrientes como fósforo, potássio e zinco (HANSEL et al., 2001). Em situações de excesso de ferro nos tecidos, ocorre a potencialização da geração de radicais hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ). A ação desse radical livre, juntamente com outros intermediários de oxigênio reativos, podem causar danos irreversíveis às membranas celulares, ocasionando o colapso celular e consequente deterioração do tecido, fenômeno denominado de estresse oxidativo (BARTAKOVA et al., 2001).

## 2.2 Solo

O solo é um sistema complexo cujos processos e mecanismos de funcionamento são de difícil compreensão. Muitas técnicas analíticas convencionais têm sido utilizadas para tentar estabelecer relações entre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e de seus componentes individuais (VISCARRA ROSSEL et al., 2006). O solo é formado a partir da ação do intemperismo sobre rochas e minerais, cujo processo é conhecido por pedogênese. Dentre os fatores responsáveis por esse processo estão o clima, o relevo, o tempo e os microrganismos que agem sobre a rocha matriz originando o solo (JORDÃO et al., 2001).

A fração orgânica do solo é uma mistura complexa de tecidos vivos ou mortos e de substâncias orgânicas transformadas ou em seu estado original. São materiais complexos e em constante transformação, mas que podem ser separados em frações distintas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). O solo atua como um

filtro, capaz de reter, em sua maioria, as impurezas presentes nele, contudo possui também a capacidade retornar ao equilíbrio dinâmico após ser perturbado, assim como a capacidade de recuperação devido à contaminação (FRANCO et al., 2004).

O solo não degradado apresenta muita importância para o crescimento e o desenvolvimento de plantas, pois elas além de consumirem água, oxigênio e gás carbônico, retiram do solo alguns elementos essenciais, sendo que seis são absorvidos em grande quantidade, são os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e os outros nove igualmente essenciais, mas utilizados em quantidade muito pequenas, denominados micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Co e Zn) (LUCHESE; FÁVERO; LENZI, 2001).

A contaminação do solo é resultado de atividades antrópicas, incluindo processos industriais, atividade de mineração, sendo que essa causa maior impacto nos ecossistemas devido às alterações nas propriedades

físicas, químicas e principalmente na redução da atividade biológica do solo (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Essas atividades lançam diversos poluentes na água, no ar e no solo fazendo com que haja alteração nas características desses meios, restringindo seus usos e oferecendo riscos ao meio ambiente- o que inclui os microrganismos presentes- e à saúde da população (MELLO, 2007). Em razão dos possíveis riscos ao ambiente e à saúde que alguns metais podem causar, muitos esforços têm sido despendidos para evitar poluição dos solos em diversos países. No Brasil, muitas ocorrências de contaminação de solos por esse elemento nas proximidades de áreas industriais ou de mineração têm sido relatadas (ARTAXO et al., 2000; MATSCHULLAT et al., 2000).

### **2.3 Comunidade Microbiana nos Solos**

A comunidade microbiana tem sido relacionada com a qualidade do solo, porém existe a necessidade de investigação das interações e atividades metabólicas dos microrganismos nos processos ecológicos do solo (TAYLOR; WILSON; BURNS, 2002).

No solo podem ser encontrados vários tipos de organismos, e dentre eles estão bactérias, fungos, bem como protozoários de vida livre. Os microrganismos do solo são componentes essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, sendo fundamentais no processo de fragmentação e decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). As atividades dos microrganismos estão baseadas em sua diversidade metabólica e adaptabilidade genética, o que torna esses microrganismos uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico (KUTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004).



Comunidades microbianas podem ser afetadas qualitativa e quantitativamente quando em contato com metais pesados. Alguns estudos demonstraram que os metais influenciam os microrganismos afetando o seu crescimento, morfologia e metabolismo, resultando num decréscimo da biomassa e diversidade (ELLIS et al., 2003; MALIK; AHMAD, 2002). Os metais exercem uma ação inibitória nos microrganismos através do bloqueio de enzimas, do sistema de transporte de nutrientes e substituição de íons essenciais ou alteração da estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

Além dos efeitos tóxicos diretos, os metais podem exercer uma seleção na comunidade microbiana, resultando na presença de microrganismos mais tolerantes nas áreas impactadas quando comparados com os presentes em solos não contaminados, sendo que esta seleção pode conduzir ao

estabelecimento de populações resistentes aos metais (PEREIRA; LIMA; FIGUEIRA, 2006). Nos últimos anos, alguns trabalhos foram referenciados a respeito do aumento da tolerância a metais pesados de bactérias isoladas de locais contaminados (CARRASCO et al., 2005; PEREIRA; LIMA; FIGUEIRA, 2006).

#### **2.4 Elementos- Traços**

O termo elemento-traço tem sido usado para definir metais catiônicos e oxiânions, presentes em baixas concentrações (usualmente  $< 0,1 \text{ dag kg}^{-1}$ ) em solos e plantas. Diversas publicações têm preferido tratar desse assunto em detrimento da expressão “metal pesado”, a qual nunca foi definida por nenhum órgão oficial na área de química sendo assim, pouco usual (GUILHERME et al., 2005). Esse termo tem sido utilizado como substituto de "metais pesados", caracterizados como metais presentes em pequenas concentrações no ambiente e nos seres vivos, sendo

alguns considerados essenciais do ponto de vista biológico, enquanto outros não o são. Porém, mesmo os essenciais, em excesso, causam danos a ecossistemas terrestres e aquáticos (LANDRIGAN et al., 2007).

De acordo com Volesky (2001), alguns metais como: Cádmio, Chumbo, Ferro, Manganês, Molibdênio, Mercúrio, Cromo, Cobalto, Cobre, Níquel, Zinco e Alumínio, são essenciais em quantidades de traço, mas, quando em excesso, preocupam e representam um risco ambiental. Esses elementos quando dispostos indevidamente, ou seja, em altas concentrações no meio ambiente, podem interferir no funcionamento das plantas e da biota do solo e afetar a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

#### **2.4.1 Elementos-Traço presentes no Solo**

A presença de elementos- traço nos solos pode ter origem natural, dependendo do material de origem sobre o qual o solo se formou dos processos de formação e da composição e proporção dos componentes da fase sólida do solo. A origem antrópica vem sendo discutida com a principal razão do aumento dos elementos-traços nos solos, provocando distúrbios muitas vezes de difícil recuperação do ambiente (ABREU; ABREU; ANDRADE, 2001). A atividade industrial junto com o rápido crescimento populacional contribuiu para um aumento natural na concentração de íons metálicos, passando a representar uma importante fonte de contaminação de solos (BISINOTI; YABE; GIMENEZ, 2004).

Os principais elementos- traços presentes no solo e nos produtos utilizados na agricultura são Co, Cd, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn (ABREU; ABREU; ANDRADE, 2001). Muitos desses elementos podem causar prejuízos a animais e plantas devido à formação

de complexos estáveis com biomoléculas, porém alguns elementos como Cr, Cu e Zn, são importantes componentes funcionais e estruturais dos seres vivos por serem propensos a perder elétrons com facilidade, formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluídos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas (BISINOTI; YABE; GIMENEZ, 2004).

A presença dos elementos-traços no solo é um dos fatores que influencia negativamente o processo de degradação da matéria orgânica existente, pois essa representa um papel fundamental na fertilidade do solo (PAGANINI; SOUZA; BOCCHIGLIERI, 2004). Os elementos- traços podem expressar seu potencial poluente diretamente sobre os organismos do solo, pela disponibilidade às plantas e contaminação de águas superficiais, via erosão do solo, e de águas subsuperficiais, por movimentação vertical descendente no perfil do solo (OLIVEIRA et al., 2002).

O ferro, um elemento- traço presente em grande quantidade na crosta, é considerado de extrema importância, porém quando em grande quantidade causa risco para o meio ambiente. As principais formas do elemento- traço ferro presente no solo são hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), limonita ( $\text{FeO}(\text{OH})$ ) e a siderita ( $\text{FeCO}_3$ ). As características desses minérios de ferro estão relacionadas com seus estados de oxidação e seu comportamento ligado ao ciclo do carbono, oxigênio e enxofre. Devido a essas características tornou-se um elemento indispensável à indústria, sendo utilizado formando ligas com outros metais (LIMA; PEDROZO, 2001).

#### **2.4.2 Elementos- Traços e os Microrganismos**

Os elementos traços, quando em excesso, são tóxicos à maioria dos microrganismos, devido à sua natureza fortemente iônica, que os torna capazes de se ligar a muitos constituintes celulares deslocando assim,

alguns metais essenciais à célula microbiana de seus sítios de ligação. Esses elementos podem romper proteínas por meio da ligação aos grupos sulfidril, e ácidos nucléicos, aos grupos hidroxil e fosfato. Os microrganismos geralmente utilizam vias de transporte específicas para levar esses elementos da membrana celular ao citoplasma (MELO; AZEVEDO, 2008).

A adaptação microbiana é um importante mecanismo de resposta à presença de contaminantes no solo, e pode resultar na compensação de um efeito adverso por meio do aumento na atividade da microbiota restante. Isso também ocorre na presença de metais, quando os microrganismos os transformam em formas menos tóxicas, imobilizando-os na superfície das células ou em polímeros intracelulares, por precipitação ou biometilação (MELO; AZEVEDO, 2008).

Alguns microrganismos são capazes de afetar a especiação dos metais, devido à sua capacidade efetora

ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização, que influencia no equilíbrio das espécies metálicas entre as fases solúveis e insolúveis. A mobilização dos metais é a passagem de um estado insolúvel inicial, ou seja, metais na forma de sulfetos ou óxidos metálicos, correspondente a uma fase sólida, para um estado solúvel final aquosa (PÉREZ, 2006). Os microrganismos podem mobilizar os metais através da lixiviação autotrófica e heterotrófica, quelação **(substâncias que se ligam a cátions formando uma ligação "provisória" impedindo reações indesejadas)** por metabólitos e sideróforos, metilação, que pode resultar em volatilização. Esses processos podem levar a uma dissolução de componentes metálicos e minerais insolúveis, incluindo os óxidos, fosfatos e sulfetos (GADD, 2004).

Os sideróforos são definidos como uma molécula de baixo peso molecular, considerados agentes quelantes, íon-férrico específicos, elaborados por



microrganismos que crescem em ambientes de baixa concentração de ferro (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). Essas moléculas são excretadas pelos microrganismos para auxiliar na assimilação do ferro (GADD, 2004). O papel dos sideróforos é de recolher ferro do ambiente e torná-lo um elemento químico essencial, disponível para a célula microbiana (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). A assimilação pode ser melhorada pela ligação a minerais de ferro sólidos, como por exemplo, óxidos de ferro, para facilitar o contato com o substrato de ferro. Embora sejam agentes quelantes de ferro, os sideróforos também são capazes de ligar-se a outros metais, como o magnésio, manganês, cromo (III) entre outros (GADD, 2004).

A imobilização é definida como a passagem de um estado solúvel em fase aquosa para um insolúvel final em fase sólida (PÉREZ, 2006). Existem inúmeros processos que levam à imobilização dos metais,

embora a imobilização reduza metais livres mais extremos, também pode promover a solubilização em algumas circunstâncias, causando um deslocamento de equilíbrio para liberar mais metal na solução. Ela pode ocorrer por: precipitação ou cristalização de componentes insolúveis orgânicos e inorgânicos, ou por absorção sequestro intracelular. As reações redox podem mobilizar ou imobilizar os metais, dependendo do tipo de metal envolvido (GADD, 2004).

A maioria das interações metais-microrganismos têm sido significativas para remoção, recuperação ou detoxificação de compostos orgânicos e inorgânicos poluidores. Nesse contexto, a solubilização pode tornar possível a remoção desses compostos de matrizes sólidas, como solos, sedimentos, lixo e rejeitos industriais. Alternativamente, os processos de imobilização podem tornar possível que metais sejam transformados *in situ*, numa forma insolúvel e

quimicamente inerte, e também são aplicáveis para remover metais em soluções aquosas (GADD, 2004).

Outro importante mecanismo de resposta à presença de contaminantes é a oxidação do elemento-traço presente no solo. Já se sabe que ela pode ocorrer de forma química ou biológica. Existem estudos em que foram observadas bactérias capazes de promover essa oxidação, na presença de matéria orgânica, sem obtenção de energia nesse processo (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992).

Existem microrganismos que oxidam matéria orgânica para reduzir óxidos férricos e de manganês tanto em ambientes de sedimentação recentes como os antigos (LOVLEY, 1992). Nealson e Myers (1992) estudaram a redução microbiana de metais por um grupo de microrganismos redutores, e sua habilidade foi sugerida para reduzir óxidos de Mn (IV) e de Fe (III).

## **2.5 Remediação do Solo**

O procedimento para remediação e consequente recuperação de áreas degradadas é lento e está relacionado à capacidade de restabelecimento do solo, onde se recompõem as características químicas, físicas e biológicas a um nível mínimo, que permita o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana, tão importante para o estabelecimento e sucessão da macrobiota (MENDES FILHO et al., 2010). Algumas técnicas de remediação de solos contaminados vêm sendo propostas no decorrer das últimas décadas, incluindo tratamentos térmicos, físico-químico e biológico. Esses métodos têm como objetivo imobilizar os metais e retirá-los do solo utilizando um dos seguintes processos: separação mecânica, eletrocinética (passagem de uma corrente elétrica de baixa intensidade entre os eletrodos envolvidos pelos contaminantes do solo), tratamento químico (processos oxidativos ou redutores), separação pirometalúrgica (fornalhas de altas temperaturas para volatilizar os

metais) e biorremediação (o uso de agentes biológicos, tais como bactérias e plantas para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água) e tratamento *in situ* (NAVARRO; CARVALHO, 2003).

Dentre as inúmeras tecnologias para remediação, destaca-se a biorremediação, como uma opção para promover a desintoxicação do local ou a remoção de elementos contaminantes do solo. A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (microrganismos e plantas), que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes (JACQUES et al., 2010). Essa biotecnologia vem sendo utilizada há anos em vários países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizada em

escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

### **2.5.1 Biorremediação**

A biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processos biológicos, aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas. Para isso, em geral, utilizam-se microrganismos, plantas ou produtos biológicos, como enzimas e componentes celulares, com a finalidade de realizar uma mineralização, a qual, possivelmente, resulta em gás carbônico e água como produtos finais (OLIVEIRA et al., 2008). A biorremediação baseia-se num processo biológico de remoção da poluição e restauração da qualidade ambiental por meio de degradação dos poluentes utilizando microrganismos de ocorrência natural, como bactérias e fungos (ESPÓSITO; AZEREDO, 2004). Várias técnicas de

biorremediação têm sido desenvolvidas, e essas técnicas podem ser classificadas segundo o tratamento e a fase utilizada. De acordo com o tipo de tratamento, as técnicas de biorremediação são denominadas biorremediação *in situ* e biorremediação *ex situ*. Essas técnicas devem levar em conta os poluentes, o custo dos processos e, principalmente, a concentração final do contaminante, no término do tratamento, como aceitável para o uso futuro da área (OLIVEIRA et al., 2008).

As técnicas de biorremediação *in situ* são aquelas em que não há necessidade de remoção do material, sendo a biorremediação realizada no próprio local contaminado. Isso evita custos e distúrbios ambientais associados ao movimento do material contaminado para o local de tratamento, entre as formas de biorremediação *in situ* estão a bioestimulação, bioaugmentação entre outros (JACQUES et al., 2005).

A técnica de biorremediação *ex situ*, em que se incluem a compostagem e biorreatores, é uma tecnologia em que o material contaminado é retirado do local de origem e encaminhado para outro adequado. Esta técnica é necessária para evitar o alastramento do contaminante e é muito utilizada em contaminações de cursos de água e lençóis freáticos (JACQUES et al., 2005).

Estudos vêm demonstrando a existência de uma grande diversidade de microrganismos degradadores de metais pesados como Ferro, Cádmio, Manganês, Zinco, entre outros, presentes em amostras de solo, sedimentos, água doce ou marinha que ocorrem naturalmente nesses ambientes. Esses microrganismos são encontrados com maior frequência nos locais contaminados previamente com o metal pesado. As vias de degradação desses compostos e a organização genética desses microrganismos envolvidos na sua degradação têm sido muito estudadas (BARKAY;



SCHAEFFER, 2001; CHEW; OBBARD;  
STANFORTH, 2001; COLLA et al., 2008; GADD,  
2000; XIANG; CHAN; WONG, 2000).

### 2.5.2 Biorremediação de elementos- traços

O desenvolvimento industrial gera diversos produtos e subprodutos, como produtos químicos (p. ex. Cianureto), pesticidas (p.ex. DDT) e metais (p. ex. Cádmio, Mercúrio, Níquel entre outros), que se tornam poluidores pela sua resistência, afetando os mais variados ambientes. Entre esses poluentes, os elementos-traços são considerados causadores de impactos negativos ao ecossistema terrestre, sendo que a redução da exposição é a única maneira efetiva de se diminuir o risco ambiental (GUILHERME, 2004).

Existem vários microrganismos responsáveis por diminuir a contaminação do ambiente, tais como bactérias, fungos e leveduras. Muitos deles metabolizam substâncias como metais pesados, enxofre e mercúrio, petróleo entre outros (ABBAS, 2003).

Microrganismos como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e, ainda, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* exibem resistência a metais tóxicos, o que

proporciona o seu desenvolvimento em meios com altas concentrações desses elementos (BLUMER, 2002).

### 2.5.3 Biorremediação de Elementos -Traços utilizando bactérias

A biorremediação pode ser aplicada em processos de redução de um metal para um estado redox menor, bem como a mobilidade e a redução da toxicidade desse metal. Esses processos também podem ser associados a outros mecanismos indiretos de precipitação do metal reduzido indiretamente, como por exemplo, em sistemas sulfato-redutores de bactérias em que a redução de Cr(IV) pode ser um resultado indireto da redução por  $\text{Fe}^{2+}$  e o sulfeto produzido. A redução aeróbica ou anaeróbica de Cr(IV) para Cr(III) tem sido desenvolvida por vários microrganismos. Algumas bactérias sulfato-redutoras, como a *Desulfotomaculum reducens*, compartilham algumas propriedades fisiológicas de ambos os grupos

de bactéria, sulfato-redutoras e metais redutoras e podem crescer com Cr(IV), Mn(IV), Fe(III) e U(IV) como aceptores de elétrons únicos (GADD, 2004).

Vários estudos vêm demonstrando a existência de bactérias biodegradadoras presentes em amostras de solo, como é o caso da aplicação de *Bacillus subtilis* na remoção de metais como Cobre, Prata, Zinco e Cádmio (COSTA; DUTRA, 2001), Magnésio, Ferro, Sódio, Potássio, Manganês, Mercúrio, Cobalto, Bário e Alumínio (BEVERIDGE; MURRAY, 1976). Outras bactérias têm apresentado um crescente interesse como organismo modelo, devido à sua resistência, para detoxicação de elementos-traços e para fins biotecnológicos (ROZYCKI; NIES, 2009). Estão relatadas na literatura resistências da bactéria *Cupriavidus metallidurans* a diversos elementos sendo que, nessa bactéria, foram identificados genes de resistência em elementos traços como Ni (II), Cu (II), Zn (II), entre outros. Cepas da bactéria *Ochrobactrum*

*anthropi*, apresentam interesse particular para biorremediação, pois são capazes de degradar solventes tóxicos, resíduos de petróleo e, também de remover Cr, Cd, Cu e outros metais tóxicos do ambiente (CHENG et al., 2010).

A bactéria *Geobacter metallireducens* é uma das mais estudadas, pois foi um dos primeiros microrganismos que mostrou capacidade de oxidar, completamente, compostos orgânicos a dióxido de carbono, utilizando óxido de Fe(III) como acceptor de elétrons (LLOYD, 2003). *Shewanella oneidensis* MR-1, considerado também um modelo de estudo, essa é uma bactéria anaeróbica facultativa encontrada em solos, sedimentos e meios aquosos (doces e marinhos), com capacidade para conservar energia para o crescimento utilizando oxigênio ou Fe (III) como acceptor final de elétrons (LOWER; HOCELLA JUNIOR; BEVERIDGE, 2001). Essa bactéria *Shewanella oneidensis* é um microrganismo de uso

potencial na biorremediação de sítios contaminados com metal pesado e metalóides, devido sua versatilidade metabólica, bem como sua capacidade de afetar o estado redox dos metais (MARSHALL et al., 2006).

Em alguns ambientes aquáticos, sedimentos e solos são ricos em manganês e óxidos de ferro, e *S. oneidensis* pode contribuir para a solubilização redutiva dos metais presentes (MYERS; MYERS, 2003). Estudos feitos relatam que várias espécies de *Clostridium* têm sido descritas como um eficiente coletor de elétrons utilizando Fe III como é o caso do *C. beijerinckii* e *C. butyricum* a fim de coletar mais energia livre por unidade de carbono (LIN et al., 2007).

Microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* são amplamente distribuídos em sistemas naturais como solos, águas e sedimentos marinhos, sendo que alguns deles foram relatados como potenciais redutores de Fe III (SCHEID; STUBNER; CONRAD, 2004).

Estirpes como *Bacillus* sp. e *Lysinibacillus* sp. foram coletadas de solos enriquecidos com acetato, no entanto, não houve relato sobre a função de redutor de ferro dessas duas populações, embora estudos relatem que membros dessa comunidade foram encontrados catalisando a redução de ferro (HUMAYOUN; BANO; HOLLIBAUGH, 2003), e por isso, mais caracterização da sua capacidade de redução do ferro férrico é necessária.

### 3 CONCLUSÃO

De maneira geral, essa pesquisa mostrou que apesar de muitos estudos referentes à biorremediação de ambiente contaminado com elemento-traço, ainda se faz necessário estudos mais elaborados relacionados à seleção de bactérias tolerantes a ferro férrico, visando a otimização dos processos de tratamento de solo contaminados com esse elemento-traço.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. Z. M. A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003. 56 p.
- ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; ANDRADE, J. C. Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando a solução de DTPA em pH 7,3. In: RAIJ, B. van et al. (Ed.). Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. p. 240-250.
- ARTAXO, P. et al. Large scale mercury and trace element measurements in the Amazon basin. *Atmospheric Environment*, Oxford, v. 34, n. 24, p. 4085-4096, 2000.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. Metais: gerenciamento e toxicidade. São Paulo: Atheneu, 2003. 554 p.
- BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, London, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.
- BARKAY, T.; SCHAEFER, J. Metal and radionuclide bioremediation: issue, considerations and potentials. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 4, n. 3, p. 318-323, 2001.
- BARRETO, M. L. Mineração e desenvolvimento sustentável: desafios para o Brasil. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001. 215 p.
- BARTAKOVA, I. et al. Phytotoxicity of iron in relation to its solubility conditions and the effect of ionic strength. *Plant and Soil*, The Hague, v. 235, n. 1, p. 45-51, 2001.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, nov./dez. 2002.

BEVERIDGE, J. T.; MURRAY, R. G. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 127, n. 3, p. 1502-1518, 1976.

BISINOTI, M. C.; YABE, M. J. S.; GIMENEZ, S. M. N. Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina, PR. *Revista Analytica*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 28, p. 22-27, jan. 2004.

BLUMER, S. A. G. Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. 2002. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 45, n. 3, p. 198-207, May 2000.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. 360 p.

CARRASCO, J. A. et al. Isolation and a characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllaspyrete mine. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v. 37, n. 6, p. 1131-1140, June 2005.

CHENG, Y. et al. Bioremediation of Cr (IV) and Immobilization as Cr (III) by *Ochrobactrum anthropic*. *Environmental Science & Technology*, Easton, v. 44, n. 16, p. 6357-6363, July 2010.

CHEW, I.; OBBARD, J. P.; STANFORTH, R. R. Microbial cellulose decompositions in soil from a rifle range contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution*, Barking, v. 111, n. 3, p. 367-375, Feb. 2001.

COLLA, L. M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio/jun. 2008.

COSTA, A. C. A.; DUTRA, F. P. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 1-5, Mar. 2001.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. Anuário brasileiro: parte 1, estatística Brasil. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

DONG, J. et al. Study on redox zones of landfill leachate plume in subsurface environment. Environmental Earth Sciences, Heidelberg, v. 27, n. 9, p. 1901-1905, Sept. 2006.

ELLIS, R. J. et al. Cultivation dependent approaches for determining bacterial diversity in heavy metal contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n. 6, p. 3223-3230, Apr. 2003.

ESPÓSITO, E.; AZEREDO, J. L. de. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 638 p.

FARNESE, A. C.; BARROZO, M. A. S. Estudo da influência do tamanho das partículas minerais na flotação da apatita. Uberlândia: UFU, 2006. 20 p.

FRANCO, I. et al. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. Geoderma, Amsterdam, v. 121, n. 1/2, p. 17-30, July 2004.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. Current Opinion in Biotechnology, London, v. 11, n. 3, p. 271-279, June 2000.

\_\_\_\_\_. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma, Amsterdam, v. 122, n. 2/4, p. 109-119, Feb. 2004.

GUILHERME, L. R. G. Fundamentos da análise de risco. In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia e meio ambiente. Viçosa, MG: UFV, 2004. p. 119-146.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos traços em solos e ecossistemas aquáticos. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 345-382.

HANSEL, C. M. et al. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impact aquatic plants. *Environmental Science and Technology*, Easton, v. 35, n. 19, p. 3863-3868, Oct. 2001.

HUMAYOUN, S. B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J. T. Depth distribution of microbial diversity in Mono lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n. 2, p. 1030-1042, Feb. 2003.

JACQUES, R. J. S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Birmingham, v. 56, n. 3, p. 143-150, Oct. 2005.

\_\_\_\_\_. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 310-317, fev. 2010.

JORDÃO, C. P. et al. Adsorção de ions  $\text{Cu}^{2+}$  em latossolo vermelho-amarelo húmico. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 5-11, jan./fev. 2001.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: CRC, 2001. 413 p.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa, MG: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 85-144.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P.; DURÁN, S. G. M. N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 78-82, jan./fev. 2002.

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. *Microbial genetic resources and biodescovery*. London: WFCC, 2004. 400 p.

LANDRIGAN, P. J. et al. Principles for prevention of the toxic effects of metals. In: NORDBERG, G. F. et al. (Ed.). *Handbook on the toxicology of metals*. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Elsevier, 2007. p. 319-337.

LEHOURS, A. C. et al. Diversity of culturable bacteria, from the anaerobic zone of the meromictic lake Pavin, able to perform dissimilatory-iron reduction in different *in vitro* conditions. *Geomicrobiology Journal*, London, v. 26, n. 3, p. 212-223, 2009.

LIMA, I. V.; PEDROZO, M. F. M. *Ecotoxicologia do ferro e seus compostos*. Salvador: CRA, 2001. 112 p.

LIN, B. et al. Phylogenetic and physiological diversity of dissimilatory ferric iron reducers in sediments of the polluted Scheld estuary, Northwest Europe. *Environmental Microbiology*, Wageningen, v. 9, n. 8, p. 1956-1968, Aug. 2007.

LLOYD, J. J. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews*, Blackwell, v. 27, n. 2/3, p. 411-425, June 2003.

LOVLEY, D. R. Microbial Fe (III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiology Reviews*, Blackwell, v. 20, n. 2/3, p. 305-313, June 1997.

\_\_\_\_\_. Microbial oxidation of organic matter coupled to the reduction of Fe (III) and Mn (IV) oxides. *Catena*, Cremlingen, v. 21, n. 3/4, p. 101-114, July 1992.

LOWER, S. K.; HOHELLA JÚNIOR, M. F.; BEVERIDGE, T. J. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and FeOOH. *Science*, New York, v. 292, n. 5520, p. 1360-1363, May 2001.

LUCHESE, E. B.; FÁVERO, L. O. B.; LENZI, E. *Fundamentos da química do solo*. Rio de Janeiro: F. Bastos, 2001. 264 p.

MALIK, A.; AHMAD, M. Seasonal variation in bacterial flora of the wastewater and soil in the vicinity of industrial area. *Environmental Monitoring and Assessment*, Dordrecht, v. 73, n. 3, p. 263-273, June 2002.

MARSHALL, M. J. et al. C-type cytochrome-dependent formation of U (IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*. *Plos Biology*, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1324-1333, Aug. 2006.

MATSCHULLAT, J. et al. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Applied Geochemistry*, Oxford, v. 15, n. 2, p. 181-190, Feb. 2000.

MELLO, G. S. L. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 71-78, jan./mar. 2007.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia ambiental*. 2. ed. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2008. 647 p.

MENDES FILHO, P. F. et al. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. *Water, Air and Soil Pollution*, Dordrecht, v. 208, n. 1, p. 79-89, 2010.

**MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.** *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, 2002. 625 p.

MYERS, C. R.; MYERS, J. M. Cell surface exposure of outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 37, n. 3, p. 254-258, July 2003.

NAVARRO, S.; CARVALHO, W. A. Remediação de solos contaminados por metais pesados. In: *SEMANA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA*, 1., 2003, Campinas. Anais... Campinas: PUC, 2003. 1 CD-ROM.

NEALSON, K. H.; MYERS, C. R. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, n. 2, p. 439-443, 1992.

OLIVEIRA, F. C. et al. Alterações em atributos químicos de um Latossolo pela aplicação de composto de lixo urbano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 4, p. 529-538, abr. 2002.

OLIVEIRA, S. D. de et al. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: estado da arte. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 67 p.

PAGANINI, S. W.; SOUZA, A.; BOCCHIGLIERI, A. Avaliação do comportamento de metais pesados no tratamento de esgotos por disposição no solo. Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 225-239, 2004.

PENNA, P. C. V. Informações e análises da economia mineral brasileira. 6. ed. Brasília: IBRAM, 2011. 20 p.

PEREIRA, S. I. A.; LIMA, A. I. G.; FIGUEIRA, E. M. A. P. Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* Isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: effects on protein expression. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 286-293, Oct. 2006.

PÉREZ, O. C. Atenuación natural de suelos contaminados con residuos tóxicos de origen minero: aislamiento y caracterización microbiana: relatório interno de atividades da Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Habana: Universidad de La Habana, 2006. 35 p.

ROSIÈRE, C. A.; CHEMALE JÚNIOR, F. Itabiritos e minérios de ferro de alto teor do quadrilátero ferrífero: uma visão geral e discussão. Genomos, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 27-43, jan. 2000.

ROZYCKI, T. V.; NIES, D. H. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 115-139, 2009.

SCHEID, D.; STUBNER, S.; CONRAD, R. Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 101-110, 2004.

TAYLOR, J. P.; WILSON, M. S.; BURNS, R. G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, v. 34, n. 3, p. 387-401, Mar. 2002.

VISCARRA ROSSEL, R. A. V. et al. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. Geoderma, Amsterdam, v. 131, n. 1/2, p. 59-75, Mar. 2006.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, Amsterdam, v. 59, n. 2/3, p. 203-216, Feb. 2001.

XIANG, L.; CHAN, L. C.; WONG, J. W. C. Removal of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge by isolated indigenous iron-oxidizing bacteria. *Chemosphere*, Amsterdam, v. 41, n. 1/2, p. 283-287, July 2000.



**CAPÍTULO 2 Otimização das condições de crescimento de bactérias isoladas de solo de Cerrado, fruto do café e fermentação do cacau no processo de biorremediação ambiental**

## RESUMO

Elementos-traços são constituintes presentes em diversos ambientes, como exemplo o solo. Eles estão presentes naturalmente em pequenas concentrações e englobam metais e não metais. Dentre os elementos-traços disponíveis na natureza, o ferro destaca-se como sendo o quarto mais abundante na crosta terrestre e potencialmente o maior aceptor de elétrons no local. No entanto, quando presente em concentração elevada, ele se torna tóxico, sendo que as fontes de contaminação por ferro podem ser naturais e antropogênicas. Apesar de seu excesso ser prejudicial, existem bactérias capazes de reduzir Fe III, sendo esse metal um auxílio para seu crescimento. É nesse contexto que o trabalho foi realizado objetivando a seleção de bactérias resistentes ao ferro férrico, em escala laboratorial, visando verificar sua eficiência na absorção desse elemento-traço a partir de uma prévia exposição da bactéria ao elemento. Os isolados testados são pertencentes à Coleção do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da UFLA. A avaliação da capacidade de crescimento à altas concentrações de ferro foi realizada e o meio utilizado para crescimento foi o Quimicamente Definido (QD), contendo concentrações da solução de ferro de 5, 500 e 1000 mg/L e o controle sem adição de ferro. Os isolados UFLACESB 127 (*Bacillus simplex*) bactérias do solo

do Cerrado, UFLASCF 590 (*Bacillus subtilis*) bactérias do café e UFLADR 6.12 (*Acetobacter tropicalis*) bactérias do cacau, destacaram-se por apresentarem melhor crescimento, quando crescido em QD com a concentração máxima de ferro. A seleção dos fatores físicos foi realizada utilizando o planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB), seguido de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As variáveis estudadas foram: pH, concentração de glicose, concentração de ferro, concentração do inóculo, concentração de nitrogênio, concentração de potássio, concentração de fosfato e coenzima, sendo que a variável resposta analisada foi a absorção de ferro em 7 dias de cultivo e a interpretação dos resultados foi realizada com o auxílio do programa Design-Expert 8.0. Dentre as variáveis testadas no PB, os que apresentaram resultados significativos foram pH 3,5 e concentração de ferro 0,750 g/L, sendo essas as condições otimizadas pelo programa estatístico para o processo de absorção de ferro da bactéria selecionada. Após a etapa de otimização obteve-se um rendimento de 99,22%, sendo a validação realizada para confirmação do modelo para os resultados experimentais. Esses resultados indicam que há um potencial no uso desses isolados na remoção de ferro quando as condições são ajustadas, podendo ser uma alternativa promissora aos métodos de tratamento convencionais de solos contaminados. No entanto é necessário entender os mecanismos e a

capacidade de remoção do ferro por esses isolados em diferentes tipos de solos.

Palavras-chave: Biorremediação. Ferro férrico. Remoção. Bactérias.

#### ABSTRACT

Trace elements are constituents present in various environments, such as the soil. They are naturally present in small concentrations and encompass metal and non-metal. Among the trace elements available in nature, iron is highlighted as being the fourth most abundant in the Earth's crust and potentially the largest electron receiver. However, when present in high concentrations, it becomes toxic, given that the sources of iron contamination may be natural or anthropological. Despite its excess being prejudicial, there are bacteria capable of reducing Fe III, given that it is helpful to their growth. It is in this context which the work was performed with the objective of selecting bacteria resistant to ferric iron, in laboratorial scale, aiming at verifying its efficiency in the absorption of this trace element from a previous exposition of the bacteria to the element. The tested isolated belong to the Collection of the Microorganism Physiology and Genetics Laboratory of the Biology Department of UFLA. The evaluation of growth capacity at high concentration of iron was performed using the Chemically Defined (CD) medium containing iron solution concentration of 5, 500 and 1000 mg/L and the

control with no addition of iron. The UFLACESB 127 (*Bacillus simplex*) Cerrado soil bacteria, UFLASCF 590 (*Bacillus subtilis*) coffee bacteria and UFLADR 6.12 (*Acetobacter tropicalis*) cocoa bacteria isolates were highlighted for presenting better growth when grown in CD with the maximum iron concentration. The selection of physical factors was performed using the Plackett-Burman (PB) type experimental planning, followed by a central rotational composite design (CRCD). The studied variables were: pH, glucose concentration, iron concentration, inoculum concentration, nitrogen concentration, potassium concentration, phosphate concentration and coenzyme, with the response variable analyzed being iron absorption in 7 days of cultivation and the interpretation of the results done with the Design-Expert 8.0 program. Among the variables tested in the PB, those which presented significant results were pH 3.5 and the iron concentration of 0.750 mg/L, with the conditions optimized by the statistical program for the iron absorption process of the selected bacteria. After the optimization stage we obtained the efficiency of 99.22%, with a validation performed in order to the model for the experimental results. These results indicate that there is potential in using these isolates in removing iron when the conditions are adjusted, and may be a promising alternative to the conventional treatment methods of contaminated soils. However, it is necessary to understand the mechanisms and the

capacity for iron removal of these isolated in different types of soil.

**Keywords:** Bioremediation. Ferric iron. Removal. Bacteria.

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação de ambientes com elementos traço tem se tornado um grave problema mundial. Tais elementos são encontrados em solos e efluentes frequentemente acima das concentrações permitidas pelos órgãos de fiscalização (LODEIRO; BARRIADA; HERRERO, 2006). Sua disposição no ambiente, sem um tratamento adequado, tem ocasionado diversos problemas ambientais devido à sua alta toxicidade e potencial bioacumulativo.

Os elementos-traço são constituintes presentes em diversos ambientes, como exemplo o solo. Eles estão presentes naturalmente em concentrações menores que  $5\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  e englobam metais e metalóides. Alguns desses elementos, quando em concentrações mais elevadas do que as tidas como naturais, devido ao processo de industrialização e o acelerado crescimento populacional, a produção de rejeitos antrópicos, biossólidos e agroquímicos, tornam-se contaminantes

com capacidade de poluir o meio em que se encontram, afetando água, solo e assim a vida animal e vegetal (SPARKS, 2003).

Dentre os elementos-traços disponíveis na natureza, o ferro destaca-se como sendo o quarto mais abundante elemento na crosta terrestre. É um micronutriente essencial para a manutenção da vida (DONG et al., 2009; MARSCHNER; CROWLEY; RENGEL, 2011; STUCKI; KOSTKA, 2006). O ferro, muito abundante no subsolo, é potencialmente o maior aceptor de elétrons no local. Assim, a redução desse metal dever ser uma característica comum compartilhada por uma grande quantidade dos microrganismos presentes (RÖLING; HEAD; LATER, 2003). No entanto, quando presente em concentração acima do que é dado como natural, ou seja,  $5 \text{ g.cm}^{-3}$ , o ferro torna-se prejudicial, sendo que as fontes de contaminação por ferro podem ser naturais e antropogênicas.



As primeiras fontes de contaminação resultam dos processos de intemperismo de minerais e, como fontes antropogênicas mencionam-se emissões associadas às atividades de mineração, fundição, polimento de metais, fertilizantes agrícolas, efluentes industriais entre outros (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Apesar de o ferro em excesso ser prejudicial aos microrganismos, existem bactérias que apresentam a capacidade de reduzir ferro férrico, como as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são amplamente distribuídos em sistemas naturais como solos, águas e sedimentos marinhos, sendo alguns deles potencialmente redutores de Fe III (LIU et al., 2011; LOVLEY, 2000; SCHEID; STUBNER; CONRAD, 2004). Bactérias como *Geobacter metallireducens* e *Shewanella oneidensis* MR-1 são consideradas modelos de estudos por terem sido os primeiros microrganismos com capacidade de oxidar completamente compostos orgânicos e CO<sub>2</sub>, a primeira

por utilizar o ferro férrico como acceptor de elétrons e a segunda pela capacidade de conservação de energia para seu crescimento utilizando  $O_2$  e ferro férrico como acceptor final de elétrons (LLOYD, 2003; LOWER; HOHELLA JUNIOR; BEVERIDGE, 2001). Dessa forma, diante da busca de maiores esclarecimentos a respeito da caracterização da capacidade de redução do ferro férrico se faz necessária. É no contexto da busca por métodos alternativos de tratamento de solos contaminados com minério de ferro que surge a necessidade da seleção de bactérias tolerantes a ferro férrico com potencial de biorremediação, visando à otimização dos processos de tratamento de solo contaminados com esse elemento- traço.

Realizou-se, este trabalho, com o objetivo de selecionar bactérias capazes de utilizar o ferro férrico, em escala laboratorial, visando verificar sua eficiência na remoção desse elemento-traço, a partir de uma prévia exposição da bactéria ao ferro e a otimização

das melhores condições de crescimento dos isolados selecionados com potencial para aplicação em biorremediação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismos**

Os isolados de bactérias testados pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Essas bactérias foram isoladas de solos de cerrado de Minas Gerais, de frutos do cafeeiro e da fermentação do cacau (Tabelas 1,2 e 3).

Tabela 1 Cepas isoladas da coleção de bactérias do Cerrado de Minas Gerais – MG (COBA et al., 2012)

NOME	Nº UFLACESB	NOME	Nº UFLACESB
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	003, 008, 016, 018, 033, 036, 049, 067, 075, 110, 129,142	<i>Bacillus</i> sp.	006, 019, 041, 046, 051, 058(5), 062, 063, 064, 071, 073, 074, 078, 080, 085, 087, 089, 090, 101, 107, 108, 115, 120, 126, 131, 146, 149, 154, 155, 157, 159, 162, 163, 167, 170, 174, 177, 180
<i>Lysinibacillus</i> sp.	005, 021, 057, 103, 105, 113, 116(5), 136, 138, 147, 152, 173, 179	<i>Bacillus pumilus</i>	027, 030
<i>Bacillus megaterium</i>	098, 102	<i>Paenibacillus</i> sp.	092, 097, 112, 148
<i>Streptomyces</i> sp.	028, 047, 144(5)	<i>Bacillus simplex</i>	011, 012, 024, 044, 061, 081, 127, 134, 135, 182
<i>Arthrobacter</i> sp.	029, 048, 055, 059(3), 091, 095, 104, 124, 139	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	133

“Tabela 1, conclusão”

<b>NOME</b>	<b>Nº UFLACESB</b>	<b>NOME</b>	<b>Nº UFLACESB</b>
<i>Bacillus drentensis</i>	037	<i>Paenibacillus apiarius</i>	145
<i>Bacillus thuringiensis</i>	039, 166	<i>Bacillus aciditicer</i>	153, 171
<i>Rizobium</i> sp.	053	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	069
<i>Microbacterium</i> sp.	054	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	172
<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	015	<i>Bacillus subtilis</i>	182

Tabela 2 Cepas isoladas do café em diferentes etapas de fermentação (SCF)  
(SILVA et al., 2008)

NOME	N° UFLASCF	NOME	N° UFLASCF
<i>Bacillus subtilis</i>	314, 460, 492, 501, 590, 622, 747, 866, 1011, 1012, 1087	<i>Bacillus megaterium</i>	610, 885, 953, 966, 989,999,1007, 1015, 1042, 1067, 1077, 1108
<i>Bacillus polymyxa</i>	345, 379, 405, 472	<i>Acinetobacter</i>	378, 500, 1070, 1099
<i>Bacillus macerans</i>	333, 351, 376, 418, 419, 533, 760, 1026	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	536

Tabela 3 Bactérias acéticas isoladas do cacau (PEREIRA et al., 2012)

NOME	Nº ISOLADOS UFLA	NOME	Nº ISOLADOS UFLA
<i>Acetobacter ghanensis</i>	BR2.11, BR3.7, BR2.8, AR 3.1	<i>Acetobacter syzygii</i>	DR2.31
<i>Acetobacter</i> sp.	ER5.15, DR3.21, ER10.2, DR13.10, DR2.28, ER2.34, DR13.9, ER5.26, DR15.1, ER12.5, DR13.1, DR13.5, DR5.6, DR4.13, ER6.16, ER17.1, DR7.5	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CR1.16, CR2.13
<i>Acetobacter tropicalis</i>	DR6.12	<i>Acetobacter malorum</i>	CR2.13
<i>Acetobacter cerevisae</i>	BR1.7, BR3.5, BR1.8, AR1.3	<i>Gluconobacter cerinu</i>	DR4.9
<i>Acetobacter orientalis</i>	ER2.47, ER2.35	<i>Gluconobacter</i> sp.	DR8.11, DR3.11, ER3.15, ER11.1

## 2.2 Cultivo dos isolados

As bactérias foram reativadas em caldo nutriente e plaqueadas no meio sólido ágar nutriente para posterior verificação de pureza. Estrias compostas foram feitas até obter pureza dessas bactérias, a partir

da observação microscópica com lâminas preparadas pela técnica de coloração de Gram.



### 2.3 Seleção dos isolados de bactérias sob diferentes condições de ferro

A avaliação do crescimento das bactérias em diferentes concentrações de ferro foi realizado o meio de cultura Quimicamente Definido (QD) (PAS et al., 2004), sem a adição de vitaminas no estado sólido. O meio QD consistiu (g/L): 10 de glicose, 4.5  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 KCl, 0.1 NaCl, 0.5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.002  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.01  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.001 KI, 15 Agar (pH 5). Foi realizada a padronização do inóculo com o auxílio da escala de n°5 de Mc Farland ( $1,5 \times 10^9$  UFC/mL) e, posteriormente, adicionado 10 $\mu$ l da suspensão bacteriana em placas de Petri, contendo meio QD acrescido das diferentes concentrações de Fe (5, 500 e 1000 mg/L). Meio sem adição de ferro foi utilizado como controle positivo para cada um dos isolados testados. A medição da colônia foi realizada após 48h de incubação a 28°C, sendo que os isolados

que apresentaram diâmetro maior ou igual à 0,2mm foram selecionados para o delineamento experimental.

#### **2.4 Delineamento Experimental**

Um Delineamento Experimental foi executado para determinar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, isso foi indispensável para que os resultados confiáveis fossem obtidos e para que análises estatísticas consistentes pudessem ser realizadas.

##### **2.4.1 Identificação das variáveis importantes para o crescimento do microrganismo: Delineamento Plackett-Burman**

Após a avaliação das bactérias que apresentaram maior crescimento (item 2.3), quinze experimentos foram gerados a partir de 8 variáveis independentes: pH (3,5, 4,5 e 5,5), concentração de glicose (5, 10 e 15 g/L), concentração de ferro (0,005, 0,5 e 0,995 g/L), concentração do inóculo ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL),

concentração de nitrogênio (0,0, 1,0 e 2 g/L), concentração de potássio (0,0, 1,0 e 2,0 g/L), concentração de fosfato (0,0, 4,0 e 8,0 g/L) e coenzima (complexo enzimático cuja função é o efeito tampão da solução) (0,0, 5,0 e 10,0 g/L) (Tabela 4). O meio de cultura utilizado nessa etapa do experimento foi o quimicamente definido QD (PAS et al., 2004). O ferro residual, para verificação da quantidade de ferro absorvido, foi analisado em espectrofotômetro de absorção atômica.

A análise das 8 variáveis interrelacionadas foi feita através do delineamento de Plackett e Burman (1946) com o objetivo de selecionar os fatores com efeitos significativos na sua resposta. Na Tabela 5, apresenta-se a matriz codificada de Plackett-Burman.

Tabela 4 Condições das variáveis em diferentes níveis usando Plackett-Burman para produção de biomassa e avaliação do teor de ferro residual em diferentes concentrações de ferro

VARIÁVEIS	NÍVEIS			
	CÓDIGO	-1	0	+1
pH	X1	3,5	5,5	7,5

[Glicose]	X2	5,0	10,0	15,0
[Ferro]	X3	0,005	0,5	0,995
Tamanho do Inóculo	X4	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	X5	0,0	1,0	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	X6	0,0	1,0	2,0
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	X7	0,0	4,0	8,0
Ecoenzima	X8	0,0	5,0	10,0

Tabela 5 Projeto experimental de Plackett-Burman para 15 ensaios e 8 variáveis utilizados para selecionar os microrganismos UFLACESB127, UFLACSF590 E UFLADR 6.12 para otimização

ENSAIO	VARIÁVEIS							
	pH	[Glicose]	[Ferro]	[Inóculo]	NH <sub>4</sub> N O <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HP O <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ecoenzima
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
11	1	1	1	1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

O crescimento da biomassa produzida sob diferentes concentrações de ferro foi avaliada a partir da obtenção da biomassa seca a 60°C, ao final de 7 dias

de cultivo. Após a definição das variáveis independentes que apresentaram efeito significativo na resposta através do delineamento experimental do tipo Plackett-Burman, foi realizado o delineamento composto central rotacional (DCCR), para efeito de otimização.

#### **2.4.2 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)**

Após avaliação do isolado que se destacou por apresentar melhor resultado com relação à remoção de ferro (item 2.4.1), oito experimentos foram gerados a partir de duas variáveis independentes: pH (3,295, 3,5, 4,0, 5,5, 5,705) e concentração de ferro (g/L) (0,147, 0,25, 0,5, 0,75, 0,852). Nessa etapa incluíram-se 4 ensaios nas condições axiais e mais 3 pontos centrais (Tabela6).

Tabela 6 Condições das variáveis em diferentes níveis utilizando (DCCR) para produção de biomassa e avaliação da remoção de ferro residual do isolado selecionado

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	X1	3,295	3,5	4,5	5,5	5,705
[Ferro]	X2	0,147	0,25	0,5	0,75	0,852

A análise das duas variáveis interrelacionadas foi realizada através do DCCR com o objetivo de aperfeiçoar os efeitos significativos na resposta e que podem ser ajustadas para melhorar a eficiência do método (Tabela 7).

Tabela 7 Projeto experimental de DCCR para 8 ensaios e 2 variáveis utilizados para otimização do isolado selecionado no PB (matriz codificada)

Ensaio	Níveis	
	X1 - pH	X2 - [Ferro]
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

A validação foi realizada, em triplicata, baseando-se nos cinco pontos nas condições de

interesse dentro da superfície e aplicando-se os mesmos procedimentos experimentais utilizados para construir os modelos. As análises estatísticas e os gráficos foram conduzidos utilizando o software Design Expert<sup>®</sup> versão 8.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA).

#### **2.4.3 Determinação do ferro residual**

O equipamento utilizado para as análises de espectrofotometria foi o espectrômetro de absorção atômica da Varian, modelo SpectrAA 10 Plus, comprimento de onda =320nm e fenda=0,2nm (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997; EWING, 1989). A análise foi realizada no Laboratório de Química Foliar do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras – MG.





### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Seleção dos isolados de bactérias sob diferentes condições de ferro

Dos 188 isolados reativados e crescidos em diferentes concentrações, houve uma pré-seleção com os 12 isolados que cresceram em meio QD, com 500mg/L de ferro e 3 deles apresentaram melhor resultado quando cultivados no meio QD, com 1000mg/L de Fe<sup>3+</sup> (Tabela 8).

Tabela 8 Resultado qualitativo da avaliação da capacidade de crescimento dos isolados de bactérias incubadas por 48hs à 28°C

ISOLADOS	NOME	MEIOS	
		(Ø da colônia – mm)	
		QD (Sem adição de Ferro)	QD + [1000]
<b>UFLA CESB 127</b>	<i>Bacillus simplex</i>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>
UFLA CESB 135	<i>Bacillus simplex</i>	0,5	0,3
<b>SCF 590</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>
SCF 747	<i>Bacillus subtilis</i>	0,6	---
BR 2.11	<i>Acetobacter ghanensis</i>	0,5	0,3
ER 5.15	<i>Acetobacter</i> sp	0,5	0,3
DR 2.31	<i>Acetobacter syzygii</i>	0,4	---
DR 3.11	<i>Gluconobacter</i> sp.	0,6	0,3
DR 4.13	<i>Acetobacter</i> sp	---	---
<b>DR 6.12</b>	<i>Acetobacter tropicalis</i>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>
DR 13.1	<i>Acetobacter</i> sp	---	---
DR 3.21	<i>Acetobacter</i> sp	---	---

Os isolados UFLACESB 127 (*Bacillus simplex*) bactéria do solo do Cerrado de Minas Gerais, UFLASCF 590 (*Bacillus subtilis*) bactéria de frutos do cafeeiro e UFLADR 6.12 (*Acetobacter tropicalis*) bactéria da fermentação do cacau, destacaram-se por apresentarem crescimento semelhante ao controle (diferença no crescimento entre o controle e o tratamento inferior a 0,2mm), quando crescido em QD com a concentração máxima de ferro (Figura 1).

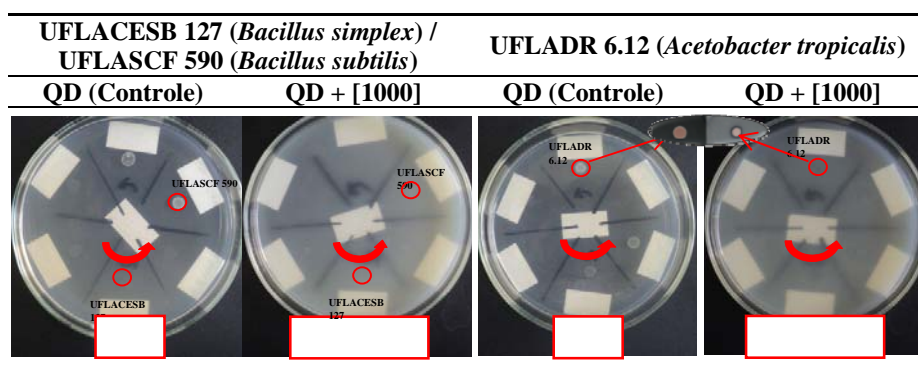


Figura 1 Resultado do teste qualitativo de crescimento de bactérias em diferentes concentrações de ferro cultivado em meio QD

Bactérias tolerantes a metal podem desenvolver vários mecanismos de resistência e detoxificação (BRUINS; KAPLL; OETME, 2000). Em alguns casos, a resistência bacteriana a metais foram mostradas, para apresentar diferenças na absorção e/ou transporte do metal tóxico, enquanto em outros casos, o metal é enzimaticamente transformado, por oxidação, redução, metilação ou desmetilação, em espécies químicas que seja menos tóxicas ou mais voláteis do que o composto do original (WILLIAMS; SILVER, 1984). Estudos relatam espécies de bactérias Gram negativas tolerantes a elemento- traço, sendo que essa tolerância ocorreu em metais variados, em vez de um metal específico (DRESSLER et al., 1991; TROJANOVSKA; BROTZ; BHAVE, 1997). Já as bactérias Gram positivas, apesar de menos tolerantes, segundo relatos em literatura, têm dominado solos contaminados com elementos- traços, como é o caso dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e outros Firmecutes (ELLIS et al., 2003).

### **3.2 Identificação das variáveis importantes para o crescimento do microrganismo: Delineamento Experimental Plackett-Burman**

Os 3 isolados que se destacaram por apresentarem melhor crescimento na presença de ferro foram submetidos a 15 ensaios, sendo que 8 variáveis interrelacionadas foram analisadas através do delineamento de Plackett e Burman (1946) e seus efeitos significativos na resposta (Tabela 9).

Tabela 9 Variáveis interrelacionadas e seus efeitos significativos na resposta referentes à absorção de ferro (g/L), durante 7 dias de cultivo à 28°C

ENSAIO	pH	[Glicose] (g/L)	[Ferro] (g/L)	[Inóculo] (UFC/mL)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Ecoenzima (g/L)	Absorção de Ferro (g/L)		
									UFLACESB127 <i>Bacillus simplex</i>	UFLASCF590 <i>Bacillus subtilis</i>	UFLADR 6.12 <i>Acetobacter tropicalis</i>
1	7,5	15	0,005	10 <sup>8</sup>	2	2	0	0	0,000	0,000	0,000
2	3,5	15	0,995	10 <sup>6</sup>	2	2	8	0	0,795	0,828	0,588
3	7,5	5	0,995	10 <sup>8</sup>	0	2	8	10	0,441	0,527	0,577
4	3,5	15	0,005	10 <sup>8</sup>	2	0	8	10	0,000	0,000	0,000
5	3,5	5	0,995	10 <sup>6</sup>	2	2	0	10	0,585	0,818	0,775
6	3,5	5	0,005	10 <sup>8</sup>	0	0	8	0	0,000	0,000	0,000
7	7,5	5	0,005	10 <sup>6</sup>	0	2	8	10	0,000	0,000	0,000
8	7,5	15	0,005	10 <sup>6</sup>	2	2	0	10	0,000	0,000	0,000
9	7,5	15	0,995	10 <sup>6</sup>	0	0	8	0	0,529	0,531	0,479
10	3,5	15	0,995	10 <sup>8</sup>	0	0	0	10	0,566	0,757	0,742
11	7,5	5	0,995	10 <sup>8</sup>	2	0	0	0	0,534	0,602	0,559
12	3,5	5	0,005	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0,000	0,000	0,000
13	5,5	10	0,5	10 <sup>7</sup>	1	1	4	5	0,533	0,557	0,554
14	5,5	10	0,5	10 <sup>7</sup>	1	1	4	5	0,526	0,572	0,558
15	5,5	10	0,5	10 <sup>7</sup>	1	1	4	5	0,603	0,569	0,559

Dos 15 ensaios efetuados, observou-se que o isolado UFLASCF590 (*Bacillus subtilis*) apresentou melhores resultados, no que diz respeito à absorção do ferro, em 9 ensaios, tendo valor máximo de Ferro removido de 0,828 mg/L, em 7 dias de cultivo. Observou-se que parece necessário manutenção de pH baixo, concentração de ferro alta para uma ótima absorção esperada.

Com relação à influência do pH escolhido neste estudo, Lemos et al. (2008) observaram que o pH ótimo para que ocorra remoção do metal sem que haja precipitação do mesmo foi de 5, acima desse valor ocorre a precipitação inviabilizando a sua remoção. O pH altera a solubilidade dos elementos -traços, além de afetar a atividade dos grupos funcionais presentes na parede celular, que são sítios de ligação a esses elementos (SANNASI et al., 2006). Um fator de fundamental importância na absorção de metais é o tipo do íon do metal presente, pois isso faz com que

haja alteração do pH presente no meio (OZDEMIR et al., 2004). Segundo Zhou et al. (2007), o pH ótimo ácido (pH 2,5) para Cr (VI) utilizando um gênero de *Bacillus*, isolados de amostra de solo contaminado, tendo uma eficiência de 85% na remoção, já Clausen (2000) exibiu eficiência de remoção de 93% e 8% para o cobre e crômio, respectivamente. Isso sugere a possível aplicação em remoção de metal, utilizando –se microrganismos desse gênero com pH entre 2,5 e 5.

A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste F e os resultados são apresentados na tabela 10. A Análise de variância (ANOVA) para a absorção de ferro mostrou que o modelo de regressão foi significativo e a falta de ajuste não significativa.

Tabela 10 Tabela de análise de variância apresentando cada variável descrita para remoção de ferro, em 7 dias de cultivo, no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman

Fatores	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Efeito	Valor F	Valor P Prob > F	Significância
Modelo	1.462X10 <sup>6</sup>	8	1.828X10 <sup>5</sup>	384.07	74.93	<0.0001	***
pH	46004.08	1	46004.08	-61.92	18.86	0.0074	**
[Glicose]	2380.08	1	2380.08	14.08	0.98	0.3686	NS
[Ferro]	1.376X10 <sup>6</sup>	1	1.376X10 <sup>6</sup>	338.58	563.97	<0.0001	***
Inóculo	7056.75	1	7056.75	-24.25	2.89	0.1497	NS
NH4NO3	15624.08	1	15624.08	36.08	6.41	0.0525	NS
K2HPO4	6674.08	1	6674.08	23.58	2.74	0.1590	NS
Na2PO4	7056.75	1	7056.75	-24.25	2.89	0.1497	NS
Ecoenzima	1656.75	1	1656.75	11.75	0.68	0.4474	NS
Resíduos	12196.25	5	2439.25				
Falta de ajuste	12070.25	3	4023.42		6.86	0.1155	NS
Erro Puro	126.00	2					
<b>Total</b>	1598X10 <sup>6</sup>	14					

(\*\*\*): Significativo ao nível de > 99,9% (para 0,0001 <valor P <0,001).

(\*\*): Significativo nos níveis compreendidos entre 99% e 99,9% (para 0,001 <valor de P <0,01).

(\*): Significativo nos níveis compreendidos entre 95% e 99% (para 0,01 <valor de P <0,05).

NS: não significativo (NS Termos foram considerados para P > 0,05).



Na tabela 10, observou-se que, em 7 dias de cultivo, dos fatores analisados, apenas pH e concentração de ferro foram significativos, esses fatores apresentaram um efeito negativo e positivo, respectivamente, o que representa, que o menor nível desse componente, no caso do pH, foi o melhor para a remoção do ferro e que o nível de concentração de ferro não necessitou diminuir para seu menor nível. Os outros fatores não apresentaram efeito significativo. Pelo delineamento Plackett-Burman foi possível observar a influência do pH e concentração de ferro na remoção de ferro do meio. Conforme observado neste trabalho, a utilização do delineamento experimental do tipo Plackett-Burman permitiu a redução do número de fatores estudados de oito para apenas dois, o que implica redução significativa de custos. Embora esse tipo de planejamento seja indicado para triagem, quando o número de fatores for acima de quatro (RODRIGUES; IEMMA, 2005), sua principal

utilização ocorre em planejamentos em que são avaliados ao menos 8 fatores (MA et al., 2008; SUN et al., 2007).

### **3.3 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)**

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é um método de pesquisa do ponto ótimo de trabalho com a realização de um planejamento completo. A otimização do processo é realizada por meio da metodologia de superfície de resposta, que é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais (RODRIGUES & IEMMA, 2005). O isolado que se destacou por apresentar melhor resultado com relação à remoção de ferro, UFLASCF590 (*Bacillus subtilis*) foi submetido ao DCCR.

#### **3.3.1 Análise de Variância**

O isolado que se destacou por apresentar melhor resultado com relação à remoção de ferro, UFLASCF590 (*Bacillus subtilis*) foi submetido ao DCCR. Um planejamento experimental do tipo composto central rotacional ( $2^2$ ), em que foram realizados através de 11 ensaios, incluindo quatro ensaios nas condições axiais e mais três pontos centrais foi empregado nesta etapa para o estudo do efeito da concentração de ferro e do pH sobre a absorção de ferro.

Pela tabela 11, pode-se observar 2 variáveis identificadas como tendo efeitos importantes na absorção de ferro pelo microrganismo. Notou-se que as melhores condições ocorreram no ensaio 3, que apresentou valor máximo de remoção de ferro de 0,771 g/L.

Tabela 11 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e suas respostas em relação ao ferro absorvido e biomassa produzida do isolado UFLASCF590 (*Bacillus subtilis*)

ENSAIOS	pH	[Ferro]	RESPOSTA
---------	----	---------	----------

		(g/L)	Absorção de Ferro (g/L)
<b>1</b>	3,5	0,25	0,255
<b>2</b>	5,5	0,25	0,204
<b>3</b>	3,5	0,75	0,771
<b>4</b>	5,5	0,75	0,652
<b>5</b>	3,295	0,5	0,582
<b>6</b>	5,705	0,5	0,519
<b>7</b>	4,5	0,1475	0,135
<b>8</b>	4,5	0,852	0,756
<b>9</b>	4,5	0,5	0,545
<b>10</b>	4,5	0,5	0,562
<b>11</b>	4,5	0,5	0,538

Rodrigues e Iemma (2005) descreveram o quanto é importante o planejamento experimental do tipo rotacional composto central (DCCR), pois através dessa ferramenta são obtidos os melhores ensaios e, conseqüentemente, os melhores resultados. Mapolelo, Torto e Prior (2005) descrevem que o acompanhamento da interação entre os metais com o metabolismo microbiano é de suma importância, através das variações do substrato a ser utilizado com o processo de bioacúmulo de micronutrientes, pois o seu rendimento altera com essas variações. Daí a importância de ser aplicado um planejamento experimental.

Os resultados experimentais foram modelados com uma equação polinomial de segunda ordem para explicar a dependência do crescimento do microrganismo sobre os diferentes fatores analisados:

$$Y=548,33-32,39X_1+230,28X_2-17,00X_1X_2-5,79X_1^2-58,29X_2^2$$

Onde Y corresponde a absorção de ferro estimada e  $X_1$  e  $X_2$  foram os valores codificados para pH e [Ferro], respectivamente. De acordo com essa equação, foi descrito que a absorção de ferro pode ser estimada em função do efeito quadrático de ambos os fatores.

A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste F e os resultados foram apresentados na tabela 12. A análise de variância (ANOVA) para a absorção de ferro mostrou que o modelo de regressão foi significativo e a falta de ajuste não significativa.

Tabela 12 Tabela de análise de variância para os resultados experimentais do DCCR do isolado UFLASCF590, em 7 dias de cultivo

Fatores	Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	Efeito	Valor F	Valor P Prob > F	Significância
Modelo de regressão	4.538X10 <sup>5</sup>	5	90751.44	548.33	127.64	<0.0001	***
X <sub>1</sub> pH	8391.31	1	8391.31	-32.39	11.80	0.0185	***
X <sub>2</sub> [Ferro]	4.242X10 <sup>5</sup>	1	4.242X10 <sup>5</sup>	230.28	596.66	<0.0001	***
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1156.00	1	1156.00	-17.00	1.63	0.2583	NS
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	189.42	1	189.42	-5.79	0.27	0.6278	NS
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	19188.25	1	19188.25	-58.29	26.99	0.0035	***
Resíduos	3554.99	5	711.00				
Falta de ajuste	3250.33	3	1083.44		7.11	0.1258	NS
Erro Puro	304.67	2	152.33				
Total	4.573X10 <sup>5</sup>	10					

(\*\*\*): Significativo ao nível de > 99,9% (para 0,0001 <valor P <0,001).

(\*\*): Significativo nos níveis compreendidos entre 99% e 99,9% (para 0,001 <valor de P <0,01).

(\*): Significativo nos níveis compreendidos entre 95% e 99% (para 0,01 <valor de P <0,05).

NS: não significativo (NS Termos foram considerados para P > 0,05).

Na tabela 12, observou-se que, em 7 dias de cultivo, dos fatores analisados, tanto pH quanto concentração de ferro foram significativos, apresentando efeitos negativo e positivo respectivamente, o que representa, que o menor nível desse componente, no caso do pH, foi o melhor para a absorção do ferro e que o nível de concentração de ferro não necessitou diminuir para seu menor nível.

O ajuste do modelo foi avaliado pela determinação do coeficiente  $R^2$ . A equação de regressão obtida indicou valor de  $R^2$  de 0,9922, sendo os seus valores preditos e ajustado de 0,9480 e 0,9845, respectivamente, sugerindo um adequado ajuste do modelo aos dados experimentais quadráticos e indicando que o modelo poderia explicar 99,22% da variabilidade na resposta, ou seja, quanto mais os valores de  $R^2$  se aproximam de 1, melhor o modelo explicaria a variabilidade entre o experimental e o modelo (SAYYAD et al., 2007).

### 3.3.2 Interpretação gráfica do modelo de superfície de resposta: Otimização dos fatores significativos

Neste estudo, as condições de operação ótimas para a absorção de ferro residual foram determinadas experimentalmente usando-se uma metodologia de superfície de resposta. O efeito da interação dos parâmetros que afetaram significativamente a absorção de ferro do isolado estudado (*Bacillus subtilis*) traçando a curva de superfície de resposta contra duas variáveis independentes. Parcelas de superfície de resposta e suas respectivas parcelas de contornos para a resposta predita Y (Absorção de Ferro), baseou-se no modelo de segunda ordem e foi apresentado na Figura 2. Esse gráfico forneceu informações sobre a interação entre as duas variáveis analisadas e permitiu uma fácil interpretação dos resultados e previsão dos valores reais.



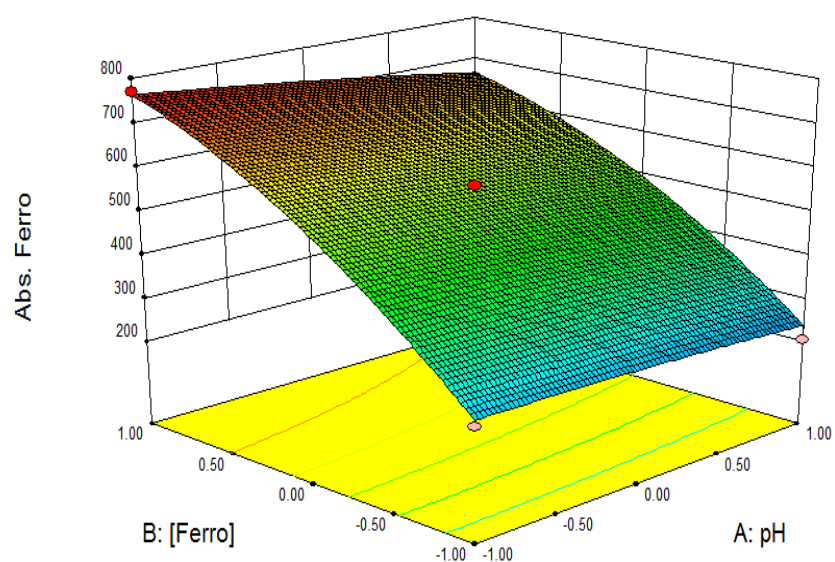


Figura 2 Efeito do pH e concentração de ferro na remoção de ferro por *Bacillus subtilis*. Superfície de resposta para absorção de ferro durante o planejamento experimental do tipo composto central rotacional – DCCR

Através da superfície de resposta obtida pelo modelo proposto para a absorção de ferro em 7 dias de ensaio (Figura 2), foi possível observar que, nos intervalos estudados, maiores valores de absorção de Ferro ocorrem em menores valores de pH (A) e em maiores valores de concentração de ferro (B) num

sistema em que se utiliza o ferro como elemento- traço em excesso. Pela análise de superfície de resposta obteve-se pH 3,5 e concentração de ferro 0,750 g/L nas suas condições ótimas resultando numa absorção de ferro de 0,771 mg/L. A faixa ótima iniciou-se a partir do nível -1 para pH e +1 para concentração de ferro. Tais resultados são interessantes, visto demonstrarem que não é necessário manter condições operacionais de pH e concentração de ferro em seus níveis mais extremos, ou seja, nos níveis -1,41 e +1,41 (pontos axiais negativo e positivo respectivamente), que correspondem à 3,295 e 5,705 referente ao pH e 0,1475 g/L e 0,852 g/L referente à concentração de ferro.

Segundo Muraleedharan, Iyengar e Venkobachar (1991), a biossorção é uma técnica que se fundamenta na ligação dos microrganismos a metais, para proporcionar a retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de determinado ambiente contaminado. Uma grande variedade de microrganismos tem sido

descrita como degradadora dos mais variados metais poluentes e tem sido testado no sentido de se aprofundar no conhecimento dos seus mecanismos que contribuem no processo de bioabsorção (VOLESKY; HOLAN, 1995). Em várias espécies, a bioabsorção pode apresentar uma retenção total para diversos metais e as variações na composição da parede celular do microrganismo podem resultar em variações consideráveis na capacidade bioabsortiva e permitir um grau elevado de acumulação de determinado metal (GADD, 1990; ZUBAIR; AHMAD, 2011). Contudo, a capacidade de absorção de metais pode ainda ser otimizada por alterações dos seus fatores tais como as condições experimentais, a constituição de biomassa, tratamentos químicos e físicos (BRADY; STOLL; DUNCAN, 1994; GADD, 1993).

### **3.3.3 Validação das condições de otimização**

Para finalizar o experimento, foi realizada a validação do DCCR na condição extrema indicada, ou seja, pH 3,5 e concentração de ferro 0,750 g/L pela análise da superfície de resposta (pH e concentração de ferro na condição -1 e +1), obtendo a absorção de ferro no valor de 0,768 g/L, confirmando a proximidade do modelo para os resultados experimentais.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir da metodologia proposta pode-se concluir que a:

- a) seleção utilizando a concentração máxima de ferro foi eficiente para pré-seleção de bactérias com potencial de crescimento a altas concentrações de ferro;
- b) as ferramentas experimentais Plackett-Burman e DCCR apresentaram eficácia no processo de

seleção e otimização com ganho de tempo e custo;

- c) as melhores condições para remoção de ferro correspondeu à pH 3,5 e concentração de ferro 0,750 g/L em 7 dias de cultivo, com rendimento equivalente à 99,22%;
- d) o processo de absorção de ferro, utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis*, foi afetado pelo pH e concentração de ferro e mostrou-se bastante promissor para aplicações ambientais futuras no que diz respeito à biorremediação.

**REFERÊNCIAS**

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16<sup>th</sup> ed. Washington, 1997. 850 p.

**AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M.** Metais: **gerenciamento e toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. 554 p.

BRADY, D.; STOLL, A.; DUNCAN, J. R. Biosorption of heavy metal cations by non-viable yeast biomass. **Environmental Technology**, London, v. 15, n. 5, p. 429-438, Feb. 1994.

BRUINS, M. R.; KAPLL, S.; OETME, F. W. Microbial resistance in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 45, n. 3, p. 198-207, Mar. 2000.

CLAUSEN, C. A. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium and arsenic from treated wood. **Waste Management & Resource**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 264-268, June 2000.

COBA, M. S. M. et al. Culturable bacteria from soils of the Brazilian Cerrado in Minas Gerais State. **Prime Journal of Microbiology Research**, London, v. 2, n. 6, p. 131-136, Nov. 2012.

DONG, H. et al. Microbe-clay mineral interactions. **American Mineralogist**, Washington, v. 94, n. 11/12, p. 1505-1519, Dec. 2009.

DRESSLER, C. et al. Determinants encoding multiple metal resistance in newly isolated copper resistant bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3079-3085, Nov. 1991.

ELLIS, R. J. et al. Cultivation dependent approaches for determining bacterial diversity in heavy metal contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3223-3230, June 2003.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: E. Blücher, 1989. v. 2, 514 p.

GADD, G. M. Fungi and yeast for metal accumulation in microbial mineral recovery. In: LEHRLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. (Ed.). **Environmental biotechnology**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 249-275.

\_\_\_\_\_. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 1, p. 25-60, May 1993.

LEMOS, J. L. S. et al. **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 65 p.

LIU, D. et al. Reduction of structural Fe(III) in nontronite by methanogen *Methanosarcina barkeri*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 75, n. 4, p. 6994-7010, Feb. 2011.

LODEIRO, P.; BARRIADA, J. L.; HERRERO, R. The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: kinetic and equilibrium studies. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, n. 2, p. 264-273, July 2006.

LOVLEY, D. R. **Environmental microbe-metal interactions**. Washington: ASM, 2000. 408 p.

LOWER, S. K.; HOHELLA JÚNIOR, M. F.; BEVERIDGE, T. J. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and FeOOH. **Science**, New York, v. 292, n. 5520, p. 1360-1363, May 2001.

MA, F. X. et al. Medium optimization for enhanced production of Rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* S699: combining a full factorial design and a statistical approach. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 9, p. 954-960, Sept. 2008.

MAPOLELO, M.; TORTO, N.; PRIOR, B. Evaluation of yeast strains as possible agents for trace enrichment of metal ions in aquatic environments. **Talanta**, London, v. 65, n. 4, p. 930-937, Feb. 2005.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis: model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 43, n. 5, p. 883-894, May 2011.

MURALEEDHARAN, T. R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Biosorption: an attractive alternative for metal removal and recovery. **Current Science**, Columbus, v. 61, n. 6, p. 379-385, Sept. 1991.

OZDEMIR, G. et al. Biosorption of chromium (VI), cadmium (II) and copper (II) by *Pantotea* sp. TEM18. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 249-253, Sept. 2004.

**PAS, M. et al. Uptake of chromium (III) and chromium (IV) compounds in the yeast cell structure. *BioMetals*, London, v. 17, n. 1, p. 25-33, Feb. 2004.**

PEREIRA, G. V. D. M. et al. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 15, p. 5395-5405, Aug. 2012.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, London, v. 33, p. 305-325, 1946.

RODIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. São Paulo: Casa do Pão, 2005. 618 p.

RÖLING, F. M.; HEAD, M. I.; LATER, R. S. The microbiology and hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 5, p. 1-8, June 2003.

SANNASI, P. et al. Sorption of Cr(VI), Cu(II) and Pb(II) by growing and non-growing cells of a bacterial consortium. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 5, p. 740-747, Mar. 2006.



SAYYAD, S. A. et al. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 73, n. 5, p. 1054-1058, Jan. 2007.

SCHEID, D.; STUBNER, S.; CONRAD, R. Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 101-110, 2004.

SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 8, p. 951-957, Dec. 2008.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic, 2003. 351 p.

STUCKI, J. W.; KOSTKA, J. E. Microbial reduction of iron in smectite. **Comptes Rendus Geoscience**, Paris, v. 338, n. 6/7, p. 468-475, June 2006.

SUN, Y. et al. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 8, p. 1548-1553, May 2007.

TROJANOVSKA, S.; BROTZ, M. L.; BHAVE, M. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 8, n. 2, p. 113-124, Apr. 1997.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, New York, v. 11, n. 3, p. 235-250, May/June 1995.

WILLIAMS, W.; SILVER, S. Bacterial detoxification and resistance to heavy metals. **Enzyme, Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 6, p. 530-537, 1984.

ZHOU, M. et al. Kinetic and equilibrium studies of Cr (VI) biosorption by dead *Bacillus Licheniformis* biomass. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 43-48, Jan. 2007.

ZUBAIR, A.; AHMAD, M. Chromium removal through biosorption and bioaccumulation by bacteria from tannery effluents contaminated soil. **CLEAN - Soil, Air, Water**, London, v. 39, n. 3, p. 226-237, Mar. 2011.