

ULISSES NUNES DA ROCHA

**TRANSPORTE ELETROCINÉTICO E DINÂMICA DOS EFEITOS DA
DESNUTRIÇÃO SOBRE A SUPERFÍCIE CELULAR E ADESÃO DE
BACTÉRIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T		
R672t	Rocha, Ulisses Nunes da, 1981-	
2005	Transporte eletrocinético e dinâmica dos efeitos da desnutrição sobre a superfície celular e adesão de bactérias / Ulisses Nunes da Rocha. – Viçosa : UFV, 2005. xii, 59f. : il. ; 29cm.	
	Orientador: Marcos Rogério Tótola. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de	Viçosa.
	Inclui bibliografia. 1. Transporte eletrocinético. 2. Bactérias - Motilidade. 3. Desnutrição bacteriana. 4. Biorremediação. 5. Bactérias - Adesão. I. Universidade Federal de Viçosa.	
	II. Título.	
		CDD 22.ed. 628.55

ULISSES NUNES DA ROCHA

**TRANSPORTE ELETROCINÉTICO E DINÂMICA DOS EFEITOS DA
DESNUTRIÇÃO SOBRE A SUPERFÍCIE CELULAR E ADESÃO DE
BACTÉRIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de setembro de 2005.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Conselheiro)

Prof. Antônio Galvão Nascimento

Prof. José Tavares Araruna Júnior

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

*Aos meus amigos,
minha verdadeira família.*

A paz é a virtude mais bela do ser humano, e por ser a mais bela é impossível ser alcançada sem autoconhecimento.

Mahatma Gandhi (1869 – 1948)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as vezes que consegui ajuda e força, mesmo quando achei que seria impossível.

À Universidade Federal de Viçosa, pela acolhida no curso de pós-graduação no Departamento de Microbiologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela concessão da minha bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, pelo apoio, pela tranquilidade e pela disposição empenhados no meu trabalho.

Ao Professor Arnaldo Chaer Borges, pelo aconselhamento, pela ajuda em decisões difíceis e pelos finais de semanas despendidos na correção da minha dissertação.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, pelo aconselhamento e opiniões no meu trabalho.

Ao Professor Júlio César Lima Neves, por me guiar nos caminhos da estatística, do SAEG e pela ajuda do planejamento experimental.

Ao Professor Antônio Galvão Nascimento, que empenhou papel de amigo, irmão e conselheiro. Pelos momentos de descontração, pela acolhida em sua casa, pelos mais diversos favores, por me ajudar a trilhar o caminho das pedras que foi meu trabalho de bancada e principalmente pela frase: “A vida é bela, o dia está lindo, vamos seguir em frente”.

À Professora Denise Maria Mano Pessoa, pelo aconselhamento e pelos longos anos que participa da minha vida profissional e pessoal, por ser uma amiga excepcional, por aceitar, apontar e tentar me ajudar a superar meus defeitos.

Ao Professor José Araruna Júnior, por ser um exemplo como pessoa e profissional.

Ao Professor Juraci Alves de Oliveira, pelos conselhos nos momentos difíceis, por ser espelho de professor e pesquisador e, acima de tudo, pela amizade.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, que ajudaram com seus ensinamentos durante esta etapa da minha formação profissional.

Ao Departamento de Engenharia Civil da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, pela cessão das células eletrocinéticas e do solo utilizado no meu trabalho.

À União de Ensino Superior de Viçosa, por apresentar minha primeira oportunidade de emprego.

A todos os funcionários da secretaria, Nilcéa, Laura e Aparecida, e do Bioagro, Danilo, José Reinaldo, Evandro, Toninho, Raimundo e Paulo, pelos sorrisos, pelo empenho e pela boa vontade, sem os quais seria impossível realizar meu trabalho.

À Anna Carolina, Mary, Tetê e Nívea, que mesmo entre as aulas e trabalhos pessoais conseguiram tempo para me auxiliar no trabalho de bancada.

A todos os colegas do Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente, pela convivência.

Aos alunos de mestrado e doutorado da Microbiologia Agrícola, em especial Simone, Flavinha, Fernanda, Roney, Irene, Marlon, Isabela, Marcelo (Dr. SIF), por me ajudarem, principalmente no meu período de adaptação em Viçosa.

Aos colegas do grupo de estudo SRS4E, Andrézim, Ana Paula, Patrícia, Marcelo e Danizinha, porque vocês me ajudaram a ultrapassar o difícil período de disciplinas, respeitando sempre nosso lema.

À república “Éramos 6”, onde consegui grandes amigas e muitos conselhos.

Aos meus grandes amigos da República “Pé-na-cova”, Serafim, Mateus (Cenoura e Concha) e André, pelos almoços de domingo, pelas conversas e por serem verdadeiros irmãos. À Ana Rita, que apesar das reclamações, sempre foi uma grande amiga.

À Lívia, Ana Paula, ao Zé Carlos e à Mariana, que mesmo do Rio sempre me apoiaram.

A todos os meus companheiros de treino, nas pessoas da Lili, Rê, Jack, Piauí, Wesley, Naty, Laila, Rangel, Gustavo, Érik, Carolzinha e Carolzona, que me ensinaram a gostar de Viçosa e me ajudaram a crescer como ser humano.

Ao Professor Tomasz Lichowki, amigo e mentor, por ser meu espelho de fé e dedicação à família.

Muitas vezes acontecem momentos preciosos que não são percebidos, mas com certeza estes foram imensamente importantes. Quando paro para pensar em todas as pessoas com quem convivi nesta época da minha vida, sei que estarão para sempre guardadas em minha memória e em meu coração.

À Priscila, que mesmo longe participou de todos os momentos que aqui passei.

BIOGRAFIA

ULISSES NUNES DA ROCHA nasceu no dia 29 de maio de 1981, no Rio de Janeiro, capital.

Em agosto de 1996, ingressou no Programa de Vocação Científica na Fundação Oswaldo Cruz sob orientação do Professor Wilson Jacinto, concluído em junho de 1997. Na mesma casa, em agosto de 1997, ingressou no Programa Avançado de Vocação Científica, concluído em março de 1999, com o estudo intitulado “Avaliação da Infecção pelo *Trypanosoma evansi* em Fêmeas de Camundongos BALBC”.

Em março de 1999, ingressou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNI-Rio), onde, em dezembro de 2002, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas.

No período de agosto de 2001 a dezembro de 2002, foi bolsista do CNPq sob orientação do Professor Tácio Mauro Pereira de Campos, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

Em agosto de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, na área de Ecologia Microbiana, com o projeto de pesquisa intitulado “Dinâmica dos efeitos da desnutrição de microrganismos sobre a superfície celular e transporte de microrganismos pela eletrocinese”, submetendo-se à defesa de tese em setembro de 2005.

Em março de 2005, foi contratado como Professor da União de Ensino Superior de Viçosa (UNIVIÇOSA), onde leciona a cadeira de Biofísica até o presente momento.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
Estudo de Características da Superfície Celular e da Adesão a um Solo Argiloso de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos de Petróleo.....	4
Resumo	4
1. Introdução.....	5
2. Material e Métodos.....	7
2.1. Isolados bacterianos.....	7
2.2. Solo.....	8
2.3. Determinação da hidrofobicidade celular superficial.....	9
2.4. Determinação da carga celular superficial	9
2.5. Adesão bacteriana ao solo	10
2.6. Análise estatística	12
3. Resultados e Discussão.....	12
4. Considerações Finais.....	14
Referências Bibliográficas.....	16
Alteração das Características de Superfície Celular e da Adesão a Um Solo Argiloso de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos de Petróleo Mediada pela Desnutrição	21
Resumo	21

	Página
1. Introdução.....	22
2. Material e Métodos.....	23
2.1. Isolados bacterianos.....	23
2.2. Obtenção de células desnutridas.....	24
2.3. Solo.....	25
2.4. Auto-agregação.....	25
2.5. Hidrofobicidade celular superficial, carga celular superficial e adesão ao solo.....	25
2.6. Determinação do comprimento celular	25
2.7. Análise estatística	26
3. Resultados e Discussão.....	26
4. Considerações Finais.....	34
Referências Bibliográficas.....	34
Transporte Eletrocinético de Bactérias através de Solo Argiloso Residual Tropical Reconstituído por Adensament	39
Resumo	39
1. Introdução.....	40
2. Material e Métodos.....	41
2.1. Isolados bacterianos.....	41
2.2. Obtenção de células desnutridas.....	42
2.3. Características de superfície dos isolados	43
2.3.1. Hidrofobicidade celular superficial, carga celular superficial, adesão ao solo e comprimento celular.....	43
2.4. Solo.....	43
2.5. Célula eletrocinética	43
2.6. Preparo do corpo-de-prova	44
2.7. Movimentação de células por eletrocinese.....	45
2.8. Outras determinações	46
2.9. Análise estatística	46
3. Resultados e Discussão.....	46
4. Considerações Finais	54
Referências Bibliográficas.....	54

RESUMO

ROCHA, Ulisses Nunes da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2005.
Transporte eletrocinético e dinâmica dos efeitos da desnutrição sobre a superfície celular e adesão de bactérias. Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Conselheiros: Arnaldo Chaer Borges, Denise Maria Mano Pessoa e Maurício Dutra Costa.

A remediação de áreas contaminadas com petróleo ou seus derivados pode ser realizada com a utilização de bactérias que apresentem características que possibilitem a degradação desses compostos ou sua transformação em formas menos tóxicas. Os processos de biorremediação requerem muitas vezes o transporte de microrganismos selecionados através de matrizes porosas com baixa condutividade hidráulica, o que pode ser alcançado pela técnica de eletrocinese. Esse processo pode resultar em condições de meio estressante para as bactérias, levando a modificações das características da superfície celular, da capacidade de adesão e, conseqüentemente, da eficiência de transporte. Este trabalho teve por objetivos estudar as propriedades da superfície celular que influenciam a adesão de isolados de bactérias a um solo franco argiloso; as alterações dessas características mediadas pela escassez de nitrogênio; e a aplicação da eletrocinese, no mesmo solo, como ferramenta para o transporte de esporos

de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e de células desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A. As bactérias com menores valores de hidrofobicidade e de cargas celulares superficiais positivas, caracterizadas como *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A e isolados LBBMA F3 e 86 (não-identificados), apresentaram também as menores tendências de adesão às partículas de solo. As propriedades da superfície celular que afetam a adesão das bactérias às partículas de solo foram alteradas durante a manutenção das células em meio com escassez de nitrogênio. As modificações apresentaram um padrão diferenciado para cada um dos isolados testados. Portanto, o emprego da desnutrição requer criteriosa avaliação para vislumbrar se as alterações resultantes atendem aos requisitos necessários para a utilização das células desnutridas em uma dada aplicação biotecnológica. No ensaio de transporte mediado pela eletrocinese, as células vegetativas desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e os esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 foram distribuídos hiperbolicamente ao longo de todo o corpo-de-prova, constituído de cilindro de solo adensado. Os esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 foram transportados com maior eficiência do que as células vegetativas desnutridas de *Pseudomonas* sp. A tendência de adesão ao solo não foi fator determinante no transporte das células. O maior transporte dos esporos de *B. subtilis* foi atribuído ao maior valor de cargas superficiais negativas nessa estrutura. Este trabalho demonstra que a eletrocinese pode ser utilizada para o transporte de bactérias em solos com baixa condutividade hidráulica.

ABSTRACT

ROCHA, Ulisses Nunes da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, september, 2005.
Bacterial electrokinetic transport and dynamic of starvation effects on cell surface and adhesion. Advisor: Marcos Rogério Tótola. Committee Members: Arnaldo Chaer Borges, Denise Maria Mano Pessoa and Maurício Dutra Costa.

The remediation of petroleum-contaminated sites can be accomplished by using bacterial strains able to degrade or to transform the compounds to less toxic forms. For some bioremediation designs, the transport of selected microorganism through porous matrix is required. The transport of bacterial cells through porous media with low hydraulic conductivity can be facilitated by electrokinesis. The change in cell surface properties in the presence of electric currents is of concern when the potential to manipulate bacterial movement with electric fields is conceived. Also, during transportation, the bacteria may be subjected to stress conditions, like nutrient limitation, which may change their physiological state. Consequently, the cell surface characteristics and adhesion capacity may be altered, affecting the transport efficiency. The aim of this work was to study the effects of cellular surface characteristics in adhesion properties and electrokinesis-facilitated transport of bacterial strains, isolated from petroleum-contaminated environment, in a silt-loam soil. Bacterial strains with low cell surface hydrophobicity and low positive charges, identified as *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A and the strains LBBMA F3 and 86 (not

identified), had the lowest adhesion to soil particles. The bacterial strains had different patterns of changes in cellular surface properties that affect the bacterial adhesion to soil particles during cultivation in nitrogen-limited medium. Nitrogen-starved vegetative cells of *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A and endospores of *Bacillus subtilis* LBBMA 155 were hyperbolically distributed through the compacted soil cylinder during the electrokinetic transportation assay. The transportation efficiency of *Bacillus subtilis* LBBMA 155 spores was higher than of *Pseudomonas* sp. starved vegetative cells. The soil adhesion property was not the determining factor for cell transportation. The higher transport efficiency of endospores was attributed to their higher negative charges values. It is concluded that the electrokinesis technique can be used for bacteria transportation in soils characterized by low hydraulic conductivity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais problemas da sociedade industrializada atual é o crescente número de sítios contaminados com uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Essa constatação tem levado ao desenvolvimento de inúmeras técnicas de remediação de ambientes contaminados, dentre elas a de biorremediação, como uma ferramenta auxiliar na descontaminação desses locais. Em ambientes onde não existem populações autóctones capazes de degradar os compostos contaminantes, ou de transformá-los em formas menos tóxicas, faz-se necessária a introdução de microrganismos alóctones selecionados.

A seleção de microrganismos para aplicação em processos de biorremediação leva em conta aspectos ligados à eficiência na degradação dos compostos-alvo, à capacidade de causarem modificações na molécula desses compostos, facilitando a posterior degradação por outras populações, e à tolerância a fatores físico-químicos do ambiente para o qual são selecionados, entre outros. No entanto, esses trabalhos não consideram a avaliação de características relacionadas à adesão microbiana como critério de seleção de organismos potencialmente aplicáveis à biorremediação. Isso é particularmente relevante em processos de biorremediação em solos, onde a efetividade da inoculação dos microrganismos selecionados depende da capacidade de transportá-los até o local da contaminação. Portanto, a eficiência do transporte das células através da matriz porosa do solo, bem como a homogeneidade da distribuição das células, são requisitos para o êxito no processo.

A adesão bacteriana a superfícies é um dos fenômenos que auxiliam no processo de predição da eficiência de transporte através da matriz porosa do solo e da distribuição

das células nesse corpo. Esse fenômeno é regulado por características como hidrofobicidade e cargas elétricas superficiais, tamanho celular, forma, arranjo, dentre outras.

A desnutrição, que simula um ambiente com escassez de nutrientes, pode ser utilizada como técnica para facilitar o transporte de células através de matrizes porosas, ao promover alterações nas características de superfície celular envolvidas no processo de adesão.

A utilização de técnicas de bombeamento para introdução de células em solos com baixa condutividade hidráulica pode criar fissuras ou fraturas, os quais funcionam como caminhos preferenciais para a suspensão percolada, impossibilitando a distribuição homogênea das células e dificultando com isso o processo de biorremediação. Nesses solos, a técnica de eletrocinese, que consiste na aplicação de campos elétricos no solo, pode ser utilizada como alternativa para a introdução e distribuição homogênea de bactérias.

Este trabalho teve por objetivos estudar as propriedades da superfície celular que influenciam a adesão de isolados de bactérias a um solo franco argiloso; as alterações dessas características mediadas pela escassez de nitrogênio; e a aplicação da eletrocinese, no mesmo solo, como ferramenta para o transporte de esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e de células desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A.

O primeiro artigo discute a correlação entre as características de superfície celular e a adesão de isolados bacterianos previamente selecionados quanto à capacidade de degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos de petróleo.

No segundo artigo, são relatadas as alterações da superfície celular em bactérias consideradas como tendo as características potenciais para uso em processos de biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, resultantes da desnutrição em meio mineral com limitação de nitrogênio. Também foram objetos de avaliação desse artigo os efeitos dessas alterações nas propriedades de adesão das bactérias a partículas de solo.

O terceiro artigo demonstra a eletromigração de bactérias através de um solo siltoso-argiloso tropical e relaciona características de superfície celular e adesão das bactérias ao solo com a distribuição das células ao longo da matriz porosa.

Por fim, o estudo apresenta dados que podem auxiliar estudos futuros sobre seleção de bactérias para transporte através de matrizes porosas do solo, bem como

demonstra a possibilidade de utilização da eletrocinese como ferramenta de introdução e distribuição de células bacterianas em solos com baixa condutividade hidráulica.

Estudo de Características da Superfície Celular e da Adesão de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos de Petróleo a um Solo Argiloso

Resumo: O conhecimento sobre a adesão de bactérias é importante para a avaliação de aplicações biotecnológicas que requerem a predição da movimentação desses organismos em matrizes porosas, como o solo e sedimentos. Neste trabalho, estudaram-se propriedades da superfície celular que influenciam a adesão de isolados de bactérias com potencial de utilização em processos de biorremediação *in-situ*, a um solo franco argiloso. As bactérias utilizadas foram identificadas por comparação dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), com os de uma biblioteca de referência armazenada em banco de dados para microrganismos aeróbios de amostras ambientais do sistema Sherlock da Microbial Identification System[®] (MIDI, Newark, DE, EVA) (TSBA, versão 4.0), como *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A, *Pseudomonas* sp. LBBMA 178 e *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A. Os isolados LBBMA F3 e LBBMA 86 não encontraram correspondentes na biblioteca TSBA 4.0[®]. Três entre os cinco isolados, LBBMA F3, LBBMA 86 e *S. maltophilia* LBBMA 105A, foram caracterizados como hidrofílicos, com baixa densidade de cargas celulares de superfície positivas e baixa capacidade de adesão ao solo; o isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A foi caracterizado como hidrofílico, com alta densidade de cargas celulares superficiais positivas e capacidade de adesão intermediária ao solo; o isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 178 foi caracterizado como hidrofóbico, com alta densidade de cargas celulares de superfície positivas e com elevada tendência de adesão ao solo. A adesão das células ao solo correlacionou-se positivamente ($p < 0,05$) com a hidrofobicidade e com as cargas superficiais positivas e negativas. Este estudo demonstrou que a intensidade de adesão de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo pode ser prevista por estudos das cargas elétricas superficiais e, principalmente, da hidrofobicidade celular.

Palavras-chave: biorremediação, seleção de microrganismos, transporte, matriz porosa.

1. Introdução

Em ambientes naturais, as populações bacterianas normalmente vivem aderidas a superfícies inertes ou constituídas por organismos vivos, a exemplo de plantas (DeFlaun et al., 1994), fungos (Cheng et al., 1984) e até mesmo animais, incluindo o homem (Bruinsma et al., 2001). Essa estratégia de colonização confere às populações bacterianas proteção contra o ressecamento (Erne et al., 1984) e predação (Kharazmi, 1991), maior tolerância a agentes antimicrobianos (Masako et al., 2005), aumento da capacidade de decomposição de substratos poliméricos (Fleming, 1998), maior facilidade de troca de informação genética (Stewart, 2002), dentre outras. A colonização de superfícies inicia-se com o processo de adesão. Esse fenômeno é regulado por fatores ligados a características de superfície da célula bacteriana, como hidrofobicidade (Vadillo-Rodríguez et al., 2005), cargas elétricas (Vadillo-Rodríguez et al., 2005), presença de adesinas (Mattos-Guaraldi et al., 2000), fimbrias (Vesper, 1987), pili (DeFlaun et al., 1994), exopolissacarídeos (Becker, 1996), flagelos (DeFlaun et al., 1990) e pela hidrofobicidade, rugosidade e cargas elétricas residuais da superfície a ser colonizada (Li e Logan, 2004).

Uma série de técnicas tem sido utilizada para mensurar a contribuição de características de superfície celular para a adesão microbiana. A hidrofobicidade tem sido avaliada por meio de métodos como aderência microbiana a hidrocarbonetos (Sorogon et al., 1991), cromatografia de interação hidrofóbica (Gusils et al., 2002), “salting-out” (Zita e Hermansson, 1997) e ângulo de contato (Li e Logan, 2004). A carga elétrica superficial da célula é geralmente avaliada pelas técnicas de mobilidade eletroforética (Rijnaarts et al., 1995), potencial zeta (Gallardo-Moreno et al., 2003) e cromatografia de interação eletrostática (van Schie e Fletcher, 1999).

A relação entre adesão e características de superfície da célula microbiana nem sempre é facilmente estabelecida (Dickson e Koochmaraie, 1989). Aparentemente, isso é atribuído à falta de padronização das técnicas, especialmente quanto à composição do sistema tampão (força iônica, pH, tensão superficial), temperatura em que são realizados os ensaios, dentre outros fatores (Jones et al., 1996; Mittelman et al., 1998; Gallardo-Moreno et al., 2003). Além disso, a maioria dos estudos relacionados à adesão bacteriana a superfícies restringe-se a poucas espécies ou isolados (Bakker et al., 2004).

A adesão bacteriana a superfícies pode ser desejável em processo de tratamento de água para consumo humano, em que a água passa por etapa de filtração em leitos de

areia (Cho et al., 1999). Essa etapa promove a retenção de inúmeros patógenos, aumentando a eficiência do processo final de desinfecção da água. A adesão microbiana é desejável também quando se vislumbra a utilização do solo como destino final de resíduos que possam conter microrganismos patogênicos (biossólidos) ou para o tratamento de efluentes (“wetlands”) (Gibbs et al., 1997). Por outro lado, a adesão microbiana a superfícies é indesejável em processos biotecnológicos que dependem do transporte das células através de sistemas porosos. Esses incluem a recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) (Kim e Fogler, 1999) e processos de biorremediação de solos contaminados em que a inoculação de microrganismos selecionados se faz necessária (Mailloux et al., 2003).

A seleção de microrganismos para aplicação em processos de biorremediação leva em conta aspectos ligados à eficiência na degradação dos compostos-alvo (Dua et al., 2002), à capacidade de causarem modificações na molécula desses compostos, facilitando a posterior degradação por outras populações (Hamby, 1996), à tolerância a fatores físico-químicos do ambiente para o qual são selecionados (Boopathy, 2000), dentre outros. No entanto, esses trabalhos não consideram a avaliação de características relacionadas à adesão microbiana como critério de seleção de organismos potencialmente aplicáveis a biorremediação. Isso é particularmente relevante em processos de biorremediação em solos, onde a efetividade da inoculação dos microrganismos selecionados depende da capacidade de transportá-los até o local da contaminação (Sanin et al., 2003).

Este trabalho descreve a avaliação de características de superfície celular ligadas à adesão de isolados bacterianos, previamente selecionados quanto à capacidade de degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos de petróleo. Demonstra-se que a adesão à de partículas de solo franco argiloso tropical correlaciona-se com a hidrofobicidade e com as cargas elétricas da superfície celular.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados bacterianos

Neste trabalho foram utilizados isolados bacterianos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) / Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil (Tabela 1). Esses isolados foram previamente caracterizados quanto à sua capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo (Oliveira, 2004).

Tabela 1 – Isolados de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo pertencentes à coleção do LBBMA do DMB/BIOAGRO, UFV, com identificação (FAME/MIDI), registro de origem e substrato de crescimento

Isolado	Identificação	Origem ^a	Substrato ^b
LBBMA F3	NI	1	F
LBBMA 81A	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	T
LBBMA 86	NI	2	P
LBBMA 105A	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	P, D, Gc
LBBMA 178	<i>Pseudomonas</i> sp	4	P, D, G, Gc e Q

NI: isolado não-pertencente à biblioteca TSBA4.0 do sistema MIDI[®].

^a – A bactéria foi isolada a partir de amostra coletada em (1) Solo de “landfarming” - Refinaria Gabriel Passos (REGAP), Minas Gerais; (2) Sedimento de mangue - Refinaria Duque de Caxias (REDUC), Rio de Janeiro; (3) Solo contaminado com óleo automotivo – oficina mecânica da UFV; (4) Região de mangue - Refinaria Duque de Caxias (REDUC), Rio de Janeiro.

^b – As letras referem-se ao crescimento em meio de cultura acrescido de melão e petróleo (T), de fenantreno (F), de petróleo bruto (P), de óleo Diesel (D), de gasolina (G), de gasolina comercial brasileira (adicionada de 25% v:v de etanol) (Gc), ou de querosene (Q).

A identificação das bactérias foi realizada por comparação dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) com os de uma biblioteca de referência do sistema Sherlock da Microbial Identification System[®] (MIDI, Newark, DE, EUA) (TSBA, versão 4.0).

O meio de cultura utilizado no experimento o meio mineral NMP (Bodour e Miller-Meier, 1998). As suspensões celulares utilizadas nos ensaios de adesão e de avaliação de características de superfície foram obtidas após incubação a 30°C e 150 rpm por 12 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, em centrífuga MR231 (JOUAN), a 6.000 g e 4°C por 10 minutos. Esse processo foi repetido

por três vezes, com ressuspensão das células em solução salina a 0,85%. Por fim, as células foram ressuspendidas em tampão fosfato salino (pH 7,0) a 100 mmol L⁻¹ (PBS) (Jones et al., 1996) e as densidades óticas ($\lambda = 600$ nm) ajustadas em espectrofotômetro SMARTSPEC3000 (BIORAD) para o valor requerido em cada experimento.

2.2. Solo

O solo utilizado nos ensaios foi proveniente de rocha metamórfica gnáissica, localizada em talude de corte na Rodovia Washington Luís no município do Rio de Janeiro, Brasil (Latitude Sul – 22° 46', Longitude Oeste – 43° 17'). A amostra de solo deformada foi coletada em perfil de intemperismo de solo residual jovem e submetida à caracterização físico-química no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (Tabela 2).

Tabela 2 – Características físico-químicas do solo utilizado nos ensaios de adesão celular

Índices Físico-Químicos	Valor
Matéria orgânica (dag kg ⁻¹)	0,05
Densidade dos grãos (g cm ⁻³)	2,7354
Densidade relativa dos grãos (g cm ⁻³)	2,7404
PH	4,9
Pedregulho grosso (%)	0
Pedregulho médio (%)	2
Pedregulho fino (%)	2
Areia grossa (%)	5
Areia média (%)	5
Areia fina (%)	13
Silte (%)	35
Argila (%)	38
Limite de liquidez (%)	61,2
Limite de plasticidade (%)	39,6
Índice de plasticidade (%)	21,6
Classificação Textural	Franco-Argiloso

2.3. Determinação da hidrofobicidade celular superficial

A hidrofobicidade das bactérias foi determinada pela medição da aderência de células a hidrocarbonetos (Teste de ABH), utilizando-se xileno como fase apolar (Jones et al., 1996). A uma alíquota de 4,8 mL das suspensões bacterianas com DO_{600} ajustada em 0,5, adicionou-se 0,4 mL de xileno. As amostras foram vigorosamente misturadas em agitador tipo Vortex por 5 min e deixadas em repouso por 15 minutos. A fase aquosa foi removida para a medição da DO_{600} , e a hidrofobicidade celular foi calculada a partir da fórmula:

$$Hfb(\%) = [100X(DO_o - DO_f)/DO_o] \quad [1]$$

em que

Hfb = hidrofobicidade celular superficial relativa;

DO_o = densidade ótica da fase aquosa antes da agitação com a fase apolar; e

DO_f = densidade ótica da fase aquosa após agitação com a fase apolar.

2.4. Determinação da carga celular superficial

A carga celular superficial foi determinada utilizando-se uma modificação da técnica de cromatografia de interação eletrostática descrita por Pedersen (1981) e Gusils et al. (2002). Colunas cromatográficas Poli-Prep Biorad (0,8 x 4,0 cm) foram preenchidas com 2 mL de resina de troca aniônica (Sephadex CM-50) ou catiônica (Sephadex DEAE-50), hidratadas em PBS. Para cada isolado bacteriano, foi utilizada uma suspensão de células em PBS com DO_{600} ajustada para 1,0 (DO_i). A cada coluna foi adicionado 0,5 mL da suspensão bacteriana, seguindo-se a eluição com 3 mL de PBS a 0,2 mL min⁻¹. A DO_{600} do eluato (DO_f) foi avaliada e o coeficiente de distribuição de bactérias entre o eluato e a coluna calculado como:

$$KdC = Cc/Ce \quad [2]$$

em que

KdC = coeficiente de distribuição de bactérias entre o eluato e a coluna

$$C_c = [DO_i - DO_f] / V_c \quad [3]$$

$$C_e = DO_f / V_e \quad [4]$$

em que

C_c = concentração de células na resina de troca iônica;

C_e = concentração de células em suspensão no eluato;

V_c = volume de resina na coluna (2 mL); e

V_e = volume do eluato (3,5 mL).

Neste trabalho, considerou-se que o coeficiente de distribuição de bactérias entre o eluato e a resina de troca iônica expressa um valor relativo de carga celular superficial (van Schie e Fletcher, 1999). O valor relativo de cargas celulares superficiais positivas é obtido na coluna de troca catiônica (KdCC) e o de cargas celulares superficiais negativas na coluna de troca aniônica (KdCA).

A partir dos valores de KdCC e KdCA foi criada uma outra grandeza, a Razão de Cargas (RC), expressa como o quociente entre o valor relativo de cargas negativas e cargas positivas (KdCA/KdCC).

2.5. Adesão bacteriana ao solo

Os ensaios de adesão dos isolados bacterianos ao solo foram realizados empregando-se a técnica de centrifugação diferencial (Ling et al., 2002), com modificações. Uma suspensão de 6 mL de PBS contendo 10^9 UFC/mL foi misturada com 6 gramas de solo seco estéril em um tubo cônico de polipropileno, sob agitação vigorosa em agitador tipo Vortex, por 1 minuto. A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos, adicionando-se em seguida 15 mL de PBS. Após agitação a 2.000 rpm em agitador orbital por 1 minuto, a mistura foi novamente deixada em repouso por 5 minutos e centrifugada em centrífuga MR23I (JOUAN), a 200 g por 3 minutos. O sobrenadante foi separado do solo e utilizado para determinação da concentração de células viáveis pelo método da microgota (Herigstad et al., 2001). Uma segunda lavagem foi realizada adicionando-se nova alíquota de 15 mL de PBS, seguindo-se o mesmo procedimento descrito, porém com o aumento do tempo de centrifugação, de 3 para 5 minutos. Considerou-se que os valores resultantes da diferença entre o número de células que permaneceram no solo após o primeiro procedimento de lavagem e o das

que permaneceram no solo após o segundo procedimento, representam a parcela da população que se encontrava fracamente aderida ao solo. O número de células que permaneceram aderidas ao solo após a segunda lavagem representa a parcela da população fortemente aderida às partículas de solo (Ling et al, 2002).

O coeficiente de distribuição das bactérias ao solo foi calculado segundo a equação:

$$KdA = C_s/C_w \quad [5]$$

em que

$$C_s = [N_t - (N_s)] / W \quad [6]$$

$$C_w = (N_s) / V \quad [7]$$

em que

KdA = coeficiente de distribuição ($mL\ g^{-1}$);

C_s = concentração de células na fase sólida ($UFC\ g^{-1}$);

C_w = concentração de células em suspensão ($UFC\ mL^{-1}$);

N_t = número total de bactérias adicionadas ao solo (UFC);

N_s = número total de bactérias no sobrenadante (UFC);

W = massa de solo utilizada (g); e

V = volume de fluido na mistura (mL).

Considerou-se, neste trabalho, a existência de dois coeficientes de distribuição de células: um relativo às células fracamente aderidas, obtido na primeira etapa de lavagem do solo ($KdA1$) e outro relativo às células fortemente aderidas, obtido na segunda etapa ($KdA2$).

O coeficiente de distribuição é um valor relativo que representa a razão entre o número de bactérias aderidas à superfície da fase sólida e o número de bactéria que permaneceu em suspensão. Este coeficiente pode agrupar ou separar os isolados microbianos com capacidades de adesão relativamente próximas, por trabalhar em uma faixa numérica que pode variar de zero ao infinito (Gannon et al., 1991), diferentemente da percentagem de adesão, que trabalha somente com valores que variam de 0 a 100%.

A partir dos coeficientes $KdA1$ e $KdA2$ foi criada a grandeza Razão de Adesão (RA), calculada pela razão $KdA2/KdA1$, que expressa a tendência da população de se aderir fortemente ($RA \gg 1,0$) ou fracamente ao solo ($RA \sim 1,0$).

2.6. Análise estatística

Em todos os ensaios foram realizadas três repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância, com delineamento inteiramente casualizado, a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. As correlações entre hidrofobicidade, carga celular superficial e adesão das bactérias ao solo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson a 1, 5 ou 10% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

A avaliação da hidrofobicidade celular superficial permitiu a separação dos isolados bacterianos em três grupos distintos, a saber: o caracterizado por extrema hidrofobicidade, representado pelo isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 178; o de hidrofobicidade média, representado pelos isolados LBBMA F3 e *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e o terceiro, de isolados extremamente hidrofílicos (LBBMA 86 e *S. maltophilia* LBBMA 105A) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de hidrofobicidade superficial celular de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo

Gênero/espécie	Isolado	Hidrofobicidade (%)
NI	LBBMA F3	26,5 (3,91) B
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	23,3 (1,02) B
NI	LBBMA 86	11,0 (3,67) C
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	5,3 (1,81) C
<i>Pseudomonas</i> sp	LBBMA 178	92,0 (2,91) A

NI - isolado não identificado.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

Os isolados bacterianos diferiram ($p < 0,05$) quanto à presença de cargas celulares superficiais catiônicas e aniônicas (Tabela 4), sendo os maiores valores para as cargas

catiônicas encontrados em isolados de *Pseudomonas* sp., LBBMA 81A e LBBMA 178, e o maior valor de cargas aniônicas em *Pseudomonas* sp. LBBMA 178. Os valores referentes à razão entre as cargas negativas e positivas (RC) (Tabela 4) indicam que os isolados NI LBBMA F3 e *S. maltophilia* LBBMA 105A possuem maiores valores de cargas negativas em relação às positivas na superfície celular ($p < 0,05$),

Tabela 4 – Valores relativos de cargas celulares superficiais positivas (KdCC) e negativas (KdCA) de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo

Gênero/espécie	Isolado	KdCC	KdCA	RC
NI	LBBMA F3	0,299 (0,34) B	6,164 (0,440) B	24,1 (2,7) A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	0,229 (0,34) A	5,530 (0,938) B	4,60 (0,6) B
NI	LBBMA 86	0,213 (0,029) C	2,075 (0,236) C	9,90 (0,9) B
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	0,188 (0,021) C	5,061 (0,341) B	27,2 (2,5) A
<i>Pseudomonas</i> sp	LBBMA 178	1,371 (0,104) A	9,233 (1,218) A	6,80 (0,8) B

NI - isolado não identificado.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

comparativamente aos três outros. As cargas celulares superficial, negativas ou positivas, é uma das características relevantes da bactéria que deve ser incluída em estudos de transporte das células até o local de contaminação, para que possa ser efetiva no processo de biorremediação. Embora se reconheça a existência de correlação entre hidrofobicidade e cargas celulares superficiais (Tabela 6), não foram encontradas na literatura informações acerca dos compostos da superfície que determinam essa correlação.

A *Pseudomonas* sp. LBBMA 178 é a degradadora de hidrocarboneto de petróleo com características distintas de hidrofobicidade e cargas elétricas superficiais ($p < 0,05$). Os maiores valores nessas características de superfície celular refletiram na capacidade de adesão das células dessa bactéria ao solo (Tabela 5). Também o isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A apresentou capacidade de adesão consideravelmente superior à dos demais isolados. Aparentemente, o maior valor de carga catiônica apresentado pelos isolados de *Pseudomonas* sp. (Tabela 4) está sendo determinante da maior capacidade de adesão dos mesmos ao solo.

A inexistência de diferenças significativas nos valores da razão RA, entre os

diferentes isolados (Tabela 5), apesar da diferença de magnitude nos valores de adesão às partículas do solo (Tabela 5), demonstra não ser a grandeza RA apropriada para discriminar a tendência da população de células de se aderir ao solo.

A adesão celular ao solo é uma característica que correlacionou positivamente com a hidrofobicidade ($p < 0,01$) e com as cargas superficiais aniônicas ($p < 0,05$ ou $0,10$) e catiônicas ($p < 0,05$ ou $0,10$) (Tabela 6). A existência de correlações positivas entre adesão celular ao solo e conteúdo relativo de cargas superficiais aniônicas é,

Tabela 5 – Valor relativo da adesão fraca (KdA1) e adesão forte (KdA2) dos isolados bacterianos a um solo siltoso argiloso

Gênero/espécie	Isolado	KdA1	KdA2	RA
NI	LBBMA F3	6,019 (1,366)	7,249 (4,377)	1,2 (0,2)* A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	94,40 (47,51)	201,7 (158,3)	2,0 (0,6)* A
NI	LBBMA 86	5,628 (1,859)	11,03 (4,025)	2,0 (0,3)* A
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	3,803 (0,908)	5,287 (1,910)	1,4 (0,1)* A
<i>Pseudomonas</i> sp	LBBMA 178	870,1 (457,2)	847,1 (339,6)	1,0 (0,3)* A

NI - isolado não-pertencente à biblioteca TSBA 4.0 do sistema MIDI[®].

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança da média.

Valores entre parênteses seguidos de asterístico representam o erro padrão da média

Tabela 6 – Coeficiente de correlação de Pearson entre características da superfície celular de isolados bacterianos e adesão a um solo siltoso-argiloso

Características		Coeficiente de Correlação
1	2	
Hfb	KdCC	0,7481 ^o
Hfb	KdCA	0,8512*
Hfb	KdA1	0,9752**
Hfb	KdA2	0,9682**
KdCC	KdCA	0,6769 ^{ns}
KdCC	KdA1	0,7537 ^o
KdCC	KdA2	0,8327*
KdCA	KdA1	0,8049 ^o
KdCA	KdA2	0,8084*
KdA1	KdA2	0,9915**

Hfb: hidrofobicidade celular superficial; KdCA: cargas celulares superficiais negativas relativas; KdCC: cargas celulares superficiais positivas relativas; KdA1: coeficiente de adesão fraca ao solo; KdA2: coeficiente de adesão forte ao solo.

^{ns} não significativo; * significativo, a 5% de probabilidade; ** significativo, a 1% de probabilidade.

aparentemente, um paradoxo, uma vez que a aproximação de superfícies de mesma carga tende a provocar repulsão (Fontes et al., 2001; Poortinga et al., 2002). Contudo, a repulsão somente se aplica a estudo de adesão de células a superfícies de sólidos quando estas se encontram em suspensão em meio com baixa força iônica, a exemplo da água pura (Bos e Busscher, 1999). Os autores demonstraram que a deposição de bactérias negativamente carregadas a superfícies ocorre proporcionalmente ao aumento da força iônica do meio circundante. As correlações positivas entre a intensidade de cargas negativas (KdCA) e a adesão celular (KdA1 e KdA2) (Tabela 6) possivelmente ocorreram em razão do método utilizado para a determinação da adesão ter incluído o emprego de uma solução com força iônica muito superior à da água pura. Além disso, sabe-se que a heterogeneidade da superfície celular das bactérias pode resultar em áreas com balanço líquido de cargas positivas superficiais, as quais facilitam o fenômeno de adesão dessas bactérias a substratos com cargas superficiais negativas (Elimelech e O'Melia, 1990).

4. Considerações Finais

Este estudo demonstrou que a intensidade da adesão de uma bactéria degradadora de hidrocarbonetos de petróleo ao solo pode ser prevista por estudos das cargas elétricas superficiais e, principalmente, da hidrofobicidade celular. Contudo, deve-se considerar que a aplicação biotecnológica de microrganismos em processos de MEOR ou de biorremediação expõe esses microrganismos a condições ambientais capazes de alterar as suas características fisiológicas. Essas, por sua vez, podem alterar características de superfície celular (Jana et al., 2000; Bruinsma et al., 2001) e, conseqüentemente, a capacidade de adesão (Dickson e Koohmaraie, 1989; Gannon et al., 1991; van Schie e Fletcher, 1999; Bruinsma et al., 2001; Stoderegger e Herndl, 2004). Assim, processos biotecnológicos que necessitam do transporte de células através de sistemas porosos devem considerar a magnitude dos efeitos dos fatores ambientais sobre as características que afetam a adesão microbiana e, também, a velocidade com que essas alterações ocorrem durante o transporte.

Atualmente, reconhece-se a necessidade da determinação de uma lei geral para

adesão de bactérias a substratos (Vadillo-Rodríguez et al., 2005). Estudos que abordem a determinação qualitativa e quantitativa dos fatores relacionados à adesão celular, juntamente com os já descritos na literatura, podem contribuir para o desenvolvimento de um modelo matemático apropriado para descrever o fenômeno de adesão bacteriana a superfícies. Por outro lado, a complexidade de respostas fisiológicas de espécies microbianas a múltiplas combinações de fatores ambientais, eventualmente, podem impossibilitar a adoção de um modelo único. Neste caso, torna-se mais importante o desenvolvimento de técnicas mais precisas e que melhor simulem as condições *in-situ* para o estudo da adesão de bactérias a substratos.

Referências Bibliográficas

- BAKKER, D. P.; POSTMUS, B. R.; BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. Bacterial strains isolated from different niches exhibit different patterns of adhesion to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3758-3760, 2004.
- BECKER, K. Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. **Microbial Ecology**, v. 32, p. 23-33, 1996.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.
- BOS, R., VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiological Reviews** v. 23, p. 179–230, 1999.
- BRUINSMA; G. M.; RUSTEMA-ABBING, M.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p. 95-101, 2001
- CHENG, K.-J.; STEWART, C. S.; DINSDALE, D.; COSTERTON, J. W. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, p. 93-120, 1984.

- CHO, J.; AMY, G.; PELLEGRINO, J. Membrane filtration of natural organic matter: initial comparison of rejection and flux decline characteristics with ultrafiltration and nanofiltration membranes. **Water Research**, v. 33, p. 2517-2526, 1995.
- DEFLAUN, M. F.; MARSHALL, B. M.; KULLE, E.-P.; LEVY, S. B. Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2637-2642, 1994.
- DEFLAUN, M. F.; TANZER, A. S.; McATEER, A. L.; MARSHALL, B.; LEVY, S. B. Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 112-119, 1990.
- DICKSON, J.S.; KOOHMARAIE, M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 832-836, 1989.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 143-152, 2002.
- ELIMELECH, M.; O'MELIA, C. R. Effect of particle size on collision efficiency in the deposition of Brownian particles with electrostatic energy barriers. **Langmuir**, v. 6, p. 1153-1163, 1990.
- ERNE, A. M.; WERNER, R. G.; REIFENRATH, R. Inhibition of bacterial adhesion by an artificial surfactant. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 205-209, 1984.
- FLEMING, H.-C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 309-315, 1998.
- FONTES, M. P. F.; CAMARGO, O. A.; SPOSITO, G. Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 627-646, 2001.
- GALLARDO-MORENO, A.M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.L.; BRUQUE, J.M., C. PÉREZ-GIRALDO, C.; SÁNCHEZ-SILOS, R.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. Influence of the growth medium, suspending liquid and measurement temperature on the physico-chemical surface properties of two enterococci strains. **Journal Adhesion Science and Technology**, v. 17, p. 1877-1887, 2003.
- GANNON, J. T.; MANILAL, V. B.; ALEXANDER, M. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 190-193, 1991.
- GIBBS, R. A.; HU, C. J.; HO, G. E.; UNKOVICH, I. Regrowth of faecal coliforms and salmonellae in stored biosolids and soil amended with biosolids. **Water Science and**

Technology, v. 35, p. 269-275, 1997.

GUSILS, C.; CUOZZO, S.; SESMA, F.; GONZALEZ, S. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 34-42, 2002.

HAMBY, D. M. Site remediation techniques supporting environmental restoration activities - a review. **The Science of Total Environment**, v. 191, p. 203-224, 1996.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

JANA, T. K.; SRIVASTAVA, A. K.; CSERY, K.; ARORA, D. K. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 28-37, 2000.

JONES, D. S.; ADAIR, C. G.; MAWHINNEY, W. M.; GORMAN, S. P. Standardisation and comparison of methods employed for microbial cell surface hydrophobicity and charge determination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, p. 83-89, 1996.

KHARAZMI, A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology Letters**, v. 30, p. 201-205, 1991.

KIM, D. S.; FOGLER, H. S. The effect of exopolymers on cell morphology and culturability of *Leuconostoc mesenteroides* during starvation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 839-844, 1999.

LI, B.; LOGAN, B. E. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 36, p. 81-90, 2004.

LING, T. Y.; ACHBERGER, E. C.; DRAPCHO, C. M.; BENGTSON, R. L. Quantifying adsorption of an indicator bacteria in a soil-water system. **Transactions of the ASAE**, v. 45, p. 669-674, 2002.

MAILLOUX, B. J.; FULLER, M. E.; ONSTOTT, T. C.; HALL, J.; DONG, H.; DEFLAUN, M. F.; STREGER, S. H.; ROTHMEL, R. K.; GREEN, M.; SWIFT, D. J. P.; RADKE, J. The role of physical, chemical, and microbial heterogeneity on the field-scale transport and attachment of bacteria. **Water Resources Research**, v. 39, p. 1142-1158, 2003.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, I. A novel method to control the balance of skin microflora: Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, p. 197-205, 2005.

MATTOS-GARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; PEREIRA, G. A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1507-1512, 2000.

MITTELMAN, M. W.; JORNITZ, M. W.; MELTZER, T. H. Bacterial cell size and surface charge characteristics relevant to filter validation studies. **Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 52, p. 37-42, 1998.

OLIVEIRA, V. B. **Bactérias para aplicação em recuperação avançada de petróleo**. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PEDERSEN, K. Electrostatic interaction chromatography, a method for assaying the relative surface charges of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 12, p. 365-367, 1981.

POORTINGA, A. T.; BOS, R.; NORDE, W. BUSSCHER, H. J. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. **Surface Science Reports**, v. 47, p. 1-32, 2002.

RIJNAARTS, H. H. M.; NORDE, W.; LYKLEMA, J.; ZEHNDER, A. J. B. 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 4, p. 191-197, 1995.

SANIN, S. L.; SANIN, F. D.; BRYERS, J. D. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 909-914, 2003.

SORONGON, M. L.; BLOODGOOD, R. A.; BURCHARD, R. P. Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3193-3199, 1991.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 107-113, 2002.

STODEREGGER, K. E.; HERNDL, G. J. Dynamics in bacterial cell surface properties assessed by fluorescent stains and confocal laser scanning microscopy. **Aquatic Microbiology and Ecology**, v. 36, p. 29-40, 2004.

VADILLO-RODRÍGUEZ, V.; BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C.; VRIES, J.; NORDE, W. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, p. 33-41, 2005.

VAN SCHIE, P. M.; FLETCHER, M. Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5082-5088, 1999.

VESPER, S. J. Production of pili (*fimbriae*) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p 1397-1405, 1987.

ZITA, A.; HERMANSSON, M. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 299-306, 1997.

Alteração das Características de Superfície Celular e da Adesão a Um Solo Argiloso de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos de Petróleo Mediada pela Desnutrição

Resumo: Características de superfície de células bacterianas envolvidas com a adesão celular podem ser alteradas pelo estado nutricional do microrganismo. Neste trabalho, foram estudadas alterações na adesão celular a partículas de solo, bem como em características celulares importantes em fenômenos de adesão e de transporte em meios porosos, mediadas pela escassez de nitrogênio. Utilizaram-se isolados de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e LBBMA 178, e *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A, previamente caracterizados como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo e potencialmente aplicáveis em processos de biorremediação. A desnutrição causou redução do tamanho celular e da hidrofobicidade em todos os isolados. As alterações foram mais significativas para o isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A, para o qual se observou ainda alteração na forma, de bacilo para cocos. Além desses efeitos, ocorreu redução na capacidade de adesão fraca ao solo das células dos dois isolados de *Pseudomonas* e também de adesão forte de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A. O isolado *S. maltophilia* LBBMA 105A, ao contrário, respondeu à desnutrição com aumento da capacidade de adesão, que ainda assim foi inferior à dos isolados de *Pseudomonas*. As alterações provocadas pela desnutrição não resultaram em padrão definido para as cargas celulares superficiais nas bactérias estudadas. Foi demonstrado que o isolado *S. maltophilia* LBBMA 105A é pouco tolerante à escassez de nitrogênio, o que limita sua aplicação em ambientes oligotróficos. Por outro lado, a desnutrição desse isolado como estratégia para redução da sua capacidade de adesão não se justifica, dada a baixa adesão natural que o mesmo apresenta. Os isolados de *Pseudomonas* sp. não sofreram alteração de viabilidade celular em resposta à limitação de nitrogênio. A menor tendência à adesão do isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A é uma característica que favorece a sua utilização em aplicações biotecnológicas que dependem do transporte através de matrizes porosas. A decisão sobre o emprego da técnica de desnutrição de células, com o objetivo de se alterar as características de adesão ou superfície, requer a criteriosa avaliação desse procedimento em promover as alterações que sirvam ao propósito para o qual se deseja utilizar a bactéria degradadora de hidrocarboneto de petróleo.

Palavras-chave: biorremediação, ultra-microbactérias, transporte, matriz porosa.

1. Introdução

As características físico-químicas da superfície das células relacionadas à adesão a substratos (van Schie e Fletcher, 1999; Vadillo-Rodríguez et al., 2005) e formação de agregados (Iwabuchi et al., 2003) são de importância em processos biotecnológicos que requerem o transporte dessas células através de matrizes porosas. Dentre esses processos, são de particular interesse os que demandam a inoculação e a distribuição homogênea de bactérias selecionadas em sistemas porosos de subsuperfície (Mailloux et al., 2003), a exemplo da recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) (Khire e Khan, 1994), da biorremediação de áreas contaminadas (Gogoi et al., 2003) ou, ainda, da biolixiviação de metais (Benmoussa et al., 1998).

As características bióticas e abióticas do ambiente afetam o estado fisiológico das células bacterianas (Heise e Gust, 1999; Stoderegger e Herndl, 2004) e influenciam as propriedades da superfície da célula relacionadas com a capacidade de adesão (Gallardo-Moreno et al., 2003). Dentre os principais fatores, mencionam-se a salinidade (Jenkins, 2003), a temperatura (Coulon et al., 2005), o pH (Castaldi e Tedesco, 2005) e a limitação de nutrientes (Kirkegaard et al., 1992).

A manutenção de culturas bacterianas em meios com limitação de nutrientes pode resultar em modificações fisiológicas, a exemplo de alterações na forma e no arranjo celular (Givskov et al., 1994), na quantidade de RNA (Givskov et al., 1994), no padrão de expressão protéica (Tandeau de Marsac e Houmard, 1993) e nas características de superfície celular importantes no fenômeno da adesão (Castellanos et al., 2000; Jana et al., 2000; Sanin et al. 2003). Relatam-se, ainda, efeitos da desnutrição nas interações das células com minerais de argila (Hwang e Tate III, 1997).

O desenvolvimento de técnicas que facilitem o transporte de bactérias através de sistemas porosos, como o solo, pode envolver estratégias de desnutrição para alterar a capacidade de adesão das bactérias a substratos (Sanin et al., 2003), em virtude das modificações fisiológicas que resultam da carência nutricional. A técnica de desnutrição, ao simular um ambiente marcado pela limitação de nutrientes (Amy et al., 1993), pode causar alterações na superfície da célula que facilite o seu transporte em sistemas porosos (Castellanos et al., 2000; Jana et al., 2000; Sanin et al. 2003). A desnutrição pode resultar ainda em aumento da sobrevivência do inóculo bacteriano (Watanabe et al., 2000), bem como da resistência a estresses diversos, como o estresse osmótico e oxidativo (Gu e Mazzola, 2001; Rosche et al., 2005).

A desnutrição de células bacterianas em meio de cultura desprovido de nitrogênio constitui uma das estratégias para se obter alterações na superfície celular, capazes de diminuir a adesão de bactérias a substratos (Sanin et al., 2003; Sanin, 2003). Neste trabalho, relatam-se alterações de superfície celular em bactérias consideradas como tendo as características potenciais para uso em processos de biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, resultantes da desnutrição em meio mineral com limitação de nitrogênio. Os efeitos dessas alterações nas propriedades de adesão desses isolados a partículas de solo foram igualmente objeto deste estudo.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados bacterianos

Neste trabalho foram utilizados isolados bacterianos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB)/ Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Tabela 1). Esses isolados foram previamente caracterizados quanto à sua capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo (Oliveira, 2004).

Tabela 1 – Isolados de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo utilizados nos ensaios de desnutrição

Isolado	Identificação	Origem ¹	Substrato ²
LBBMA 81A	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	T
LBBMA 105A	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	P, D, Gc
LBBMA 178	<i>Pseudomonas</i> sp.	3	P, D, G, Gc e Q

¹ – A bactéria foi isolada a partir de amostra coletada em (1) Solo de “landfarming” - Refinaria Gabriel Passos (REGAP), Minas Gerais; (2) Solo contaminado com óleo automotivo – oficina mecânica da UFV; (3) Região de mangue - Refinaria Duque de Caxias (REDUC), Rio de Janeiro.

² – As letras referem-se ao crescimento em meio de cultura acrescido de melaço e petróleo (T), de petróleo bruto (P), de óleo Diesel (D), de gasolina (G), de gasolina comercial brasileira (adicionada de 25% v:v de etanol) (Gc), ou de querosene (Q).

A identificação das bactérias foi realizada por comparação dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) com os de uma biblioteca de referência armazenada em banco de dados para microrganismos aeróbios de amostras ambientais do sistema Sherlock, do Microbial Identification System[®] (MIDI, Newark, DE, EUA) (TSBA, versão 4.0).

2.2. Obtenção de células desnutridas

As culturas-estoque dos isolados (Tabela 1) foram ativadas em meio mineral NMP sólido (Bodour e Miller-Meier, 1998) e inoculadas em 75 mL do mesmo meio de cultura, seguindo-se incubação a 30° C e 150 rpm, até o meio da fase de crescimento logarítmico. As células foram coletadas por centrifugação em centrífuga MR23I (JOUAN) a 6.000 g e 4°C por 10 minutos. Esse processo foi repetido por três vezes, com ressuspensão das células em solução salina a 0,85% de NaCl. As células foram então ressuspensas em meio mineral NMP desprovido da sua principal fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), o que elevou a relação C:N de 25:1 para 1.320:1. A concentração de células nesse meio foi ajustada para valores entre 10⁸ e 10⁹ UFC mL⁻¹ e culturas foram mantidas a 30° C e 150 rpm por até 10 dias após o início da desnutrição.

As modificações das características de superfície celular em resposta à desnutrição foram avaliadas quantificando-se a hidrofobicidade e carga celular superficial, além da adesão dos isolados bacterianos ao solo. As avaliações foram realizadas no início do período de desnutrição (T₀), no momento em que atingiram o equilíbrio populacional de células viáveis (T₁) e dois dias após terem atingido o equilíbrio (T₂), de acordo com a curva de variação da concentração de células viáveis ao longo do período de 10 dias de desnutrição. Em cada uma dessas avaliações, as células foram lavadas três vezes em NaCl a 0,85% e ressuspensas em tampão fosfato salino (pH 7,0) 100 mmol L⁻¹ (PBS) (Jones et al., 1996), ajustando-se os valores de densidade ótica ($\lambda = 600$ nm) em espectrofotômetro SMARTSPEC3000 (BIORAD) para o requerido em cada experimento.

2.3. Solo

As características do solo utilizado nos ensaios de adesão são as descritas no item 2.2 do artigo 1.

2.4. Auto-agregação

O ensaio de auto-agregação das células foi realizado adotando-se o procedimento descrito por Rickard et al. (2003). As células foram centrifugadas, lavadas em NaCl a 0,85% e ressuspensas em PBS. Para o teste de auto-agregação, uma alíquota de 400 μL ($\text{DO}_{600} = 1,5$) da suspensão foi acondicionada em tubos de Durham (6x50 mm). A suspensão foi agitada vigorosamente em agitador do tipo Vortex por 10s, seguindo-se homogeneização gentil por rolagem dos tubos em superfície plana por 30s. O grau de auto-agregação de cada isolado foi pontuado em ensaio semiquantitativo (Cisar et al., 1979), sendo adotados os seguintes critérios de pontuação: (0) sem agregados em suspensão; (1) agregados pequenos e uniformes em suspensão; (2) agregados facilmente visíveis em uma suspensão turbida; (3) agregados claramente visíveis em uma suspensão turbida; (4) flocos grandes de agregados que sedimentam praticamente instantaneamente, deixando o sobrenadante claro.

2.5. Hidrofobicidade celular superficial, carga celular superficial e adesão ao solo

As determinações das características de superfície celular foram realizadas segundo protocolos descritos nos itens 2.3 (hidrofobicidade) e 2.4 (carga celular) do artigo 1. A capacidade de adesão celular ao solo foi avaliada de acordo com o protocolo descrito no item 2.5 do mesmo artigo.

2.6. Comprimento celular

O comprimento celular foi determinado em micrografias das células obtidas por microscopia eletrônica de varredura, segundo metodologia descrita por Luo et al. (2005). As células foram coletadas em membrana Millipore de celulose (0,40 μm) e lavadas gentilmente com uma solução de tampão fosfato a 100 mmol L^{-1} (pH 7,0), antes do processo de fixação com glutaraldeído a 2,5% e ácido ósmico a 0,5%. A seguir,

foram desidratadas seqüencialmente, utilizando-se soluções com concentrações de etanol variando de 30 a 100%, em incrementos de 10, 15 ou 20%, com 20 minutos de exposição por concentração. Em seguida, o etanol foi substituído por acetato isoamil-éster. À desidratação, seguiu-se a secagem ao ponto crítico (Bal-Tec, CPD 030) e finalmente a metalização (Balzers, FDU 010), para posterior exame em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP1430), no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa.

2.7. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. As correlações entre hidrofobicidade, carga celular superficial e adesão das bactérias ao solo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson.

3. Resultados e Discussão

A manutenção de células de isolados bacterianos em meio de desnutrição com escassez de nitrogênio não afetou significativamente a viabilidade dos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Figura 1). Espécies desse gênero são usualmente eficientes em se adaptar a ambientes caracterizados por condições de carência nutricional (Bossolan, 2000; Jana et al., 2000). O isolado *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A, por outro lado, apresentou comportamento diverso das *Pseudomonas* (Figura 1). Doze horas após transferência para o meio de desnutrição, constatou-se um pico de concentração de células viáveis e cultiváveis desse isolado (Figura 1). Aumentos similares têm sido atribuídos a uma possível desmontagem dos agregados celulares, como resultado do consumo de substâncias poliméricas extracelulares para suportar o crescimento celular em condições de escassez nutricional (Camesano e Longan, 1998; Camesano et al., 1999; Bossolan, 2000), ou a eventos de divisão celular sem aumento de massa (Reeve et al., 1984; Nyström e Kjelleberg, 1989; Ross et al., 2001).

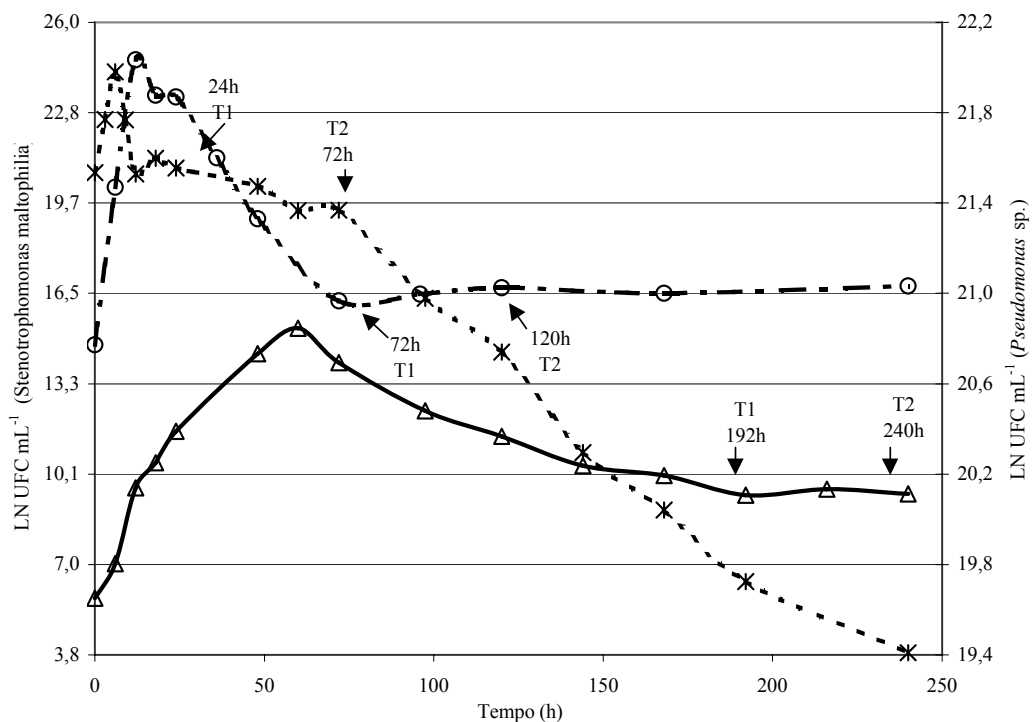


Figura 1 – Concentração de células viáveis de *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A (—○—) e LBBMA 178 (—▲—), e de *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A (-*-*) em meio com restrição de nitrogênio. As setas indicam, para cada isolado, as coletas para avaliação das alterações das características celulares durante a desnutrição.

O isolado *Pseudomonas sp.* LBBMA 178 demandou o maior tempo para alcançar a estabilização populacional, após transferência para meio de desnutrição (Figura 1). Para este isolado, foi escolhido como T₁ o período de 192 horas após o início da desnutrição e como T₂ correspondente a 240 horas. O isolado *S. maltophilia* LBBMA 105A apresentou pico populacional 12 horas após a desnutrição e uma estabilização populacional 24 horas após o início da desnutrição. Este isolado apresentou redução significativa na viabilidade celular após 72 horas. Por essa razão, para os ensaios de determinação de características superficiais e de adesão, foi escolhido como T₁ o tempo de 24 horas após o início da desnutrição e como T₂ o de 72 horas. Ao isolado *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A, definiu-se como T₁ o tempo de 72 horas e como T₂ o de 120 horas após o início da desnutrição (Figura 1).

As células dos isolados estudados não formaram agregados nas condições de cultivo utilizadas (dados não-mostrados). Portanto, o aumento na concentração de células viáveis de *S. maltophilia* LBBMA 105A (Figura 1) foi interpretado como

resultante de processos de divisão celular sem aumento de massa, a exemplo de resultados obtidos por outros autores (Reeve et al., 1984; Nyström e Kjelleberg, 1989; Ross et al., 2001). Esse aumento na concentração de células viáveis de *S. maltophilia* LBBMA 105A foi seguido por uma fase de estabilização, até 72 horas após a transferência para o meio de desnutrição, quando se iniciou nova fase de declínio acentuado na concentração de células viáveis (Figura 1). Esses dados referentes a *S. maltophilia* LBBMA 105A são indícios de que a espécie não possui mecanismos eficientes de adaptação fisiológica à escassez nutricional de nitrogênio, ao contrário do observado para os isolados de *Pseudomonas*. Portanto, o uso da desnutrição celular como estratégia de alteração de características celulares de *S. maltophilia* LBBMA 105A é limitado pela baixa sobrevivência desse isolado quando submetido à limitação de nitrogênio.

A hidrofobicidade das células dos três isolados bacterianos decresceu durante a etapa de desnutrição, sendo a redução mais acentuada em *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A (Tabela 3). Após 72 horas no meio de desnutrição, as células desse isolado passaram a apresentar característica de alta hidrofiliabilidade. As células de *S. maltophilia* LBBMA 105A mantiveram o caráter altamente hidrofílico (Tabela 3), embora os valores de hidrofobicidade tenham decaído significativamente. A pouca redução da hidrofobicidade de *Pseudomonas* sp. LBBMA 178 (Tabela 3) distinguiu esse isolado dos demais e demonstrou que as células mantiveram o caráter hidrofóbico durante a etapa de desnutrição.

Tabela 3 – Hidrofobicidade superficial celular (%) de isolados bacterianos em resposta à incubação em meio com restrição de nitrogênio

Gênero/espécie	Isolado	T0	T1*	T2*
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	24,2 (0,27) A	1,4 (0,87) B	2,7 (0,83) B
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	4,8 (0,35) A	2,4 (0,51) B	1,8 (0,78) B
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	91,0 (1,15) A	72,5 (2,84) B	76,4 (1,48) B

Valores entre parênteses representam o erro-padrão da média.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

* Referem-se ao momento em que as células foram coletadas do meio de desnutrição para análise. Para cada isolado, esses tempos são informados na Figura 1.

As alterações na hidrofobicidade celular superficial, em resposta à desnutrição, dependem do nutriente limitante e do tempo em que as células permanecem em

desnutrição. Em células mantidas em água, em PBS e em meios de cultura com limitação de carbono, a hidrofobicidade tende a aumentar (Bossolan, 2000; Castellanos et al., 2000; Jana et al., 2000). Em contrapartida, em meios de cultura com limitação de nitrogênio, têm sido relatadas reduções significativas na hidrofobicidade celular superficial (Castellanos et al., 2000, Sanin et al., 2003; Sanin, 2003), à semelhança dos resultados obtidos neste trabalho com isolados de *Pseudomonas* e *S. maltophilia*.

Os isolados diferiram ($p < 0,05$) quanto às alterações nas cargas celulares superficiais negativas e positivas ao longo da desnutrição (Tabela 4). *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A não apresentou alteração dos valores de carga celular superficial positiva

Tabela 4 – Valores relativos de cargas celulares superficiais positivas (KdCC) e negativas (KdCA) de isolados bacterianos em resposta à incubação em meio com restrição de nitrogênio

Gênero/espécie	Isolado	T0	T1*	T2*
		KdCC		
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	1,138(0,024) A	1,074(0,018)B	1,112(0,031) AB
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	0,179(0,010) C	0,359(0,023) B	0,622(0,025) A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	1,379(1,379) A	0,785(0,785) B	0,130(0,130) C
KdCA				
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	7,575(0,682) A	5,839(0,434) B	6,082(0,423) B
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	4,858(0,149) C	8,430(0,347) B	22,99(7,409) A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	6,590(0,085) C	34,15(0,076) B	156,9(0,013) A

Valores entre parênteses representam o erro-padrão da média.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* Referem-se ao momento em que as células foram coletadas do meio de desnutrição para análise. Para cada isolado, esses tempos são informados na Figura 1.

(KdCC) ($p < 0,05$), ocorrendo, contudo, uma diminuição dos valores de carga celular negativa (KdCA) durante a desnutrição, com tendência à estabilização. A manutenção do isolado *S. maltophilia* LBBMA 105A em meio de cultura com limitação de nitrogênio aumentou o número de cargas celulares superficiais positivas e negativas ($p < 0,05$). Em *Pseudomonas* sp. LBBMA 178, o valor de cargas positivas diminuiu em aproximadamente 10 vezes durante a incubação no meio de desnutrição, enquanto que o de cargas negativas aumentou em cerca de 24 vezes (Tabela 4).

As alterações na hidrofobicidade (Tabela 3) e nas cargas celulares superficiais (Tabela 4) foram atribuídas a mudanças qualitativas e quantitativas dos componentes da superfície celular. A inoculação de bactérias em meio com limitação de nutrientes

promove severas modificações fisiológicas e alterações na composição da membrana e da parede celular (Nozawa et al., 1980; Noyce e Hughes, 2003; Kabir et al. 2004). Essas alterações na composição referem-se a mudanças na quantidade, qualidade e localização dos grupos funcionais presentes, como cetonas, ácidos carboxílicos, grupos carbonila, ligações peptídicas, ligações éter, grupos etano, hidrogênio e hidroxila. Em meio com limitação de nitrogênio, podem ocorrer alterações similares àquelas encontradas durante a resposta estrigente (Chesbro et al., 1990), caracterizada pela deficiência de aminoácidos. A menor produção de aminoácidos resultante da escassez de nitrogênio pode diminuir a deposição de proteínas na parede e superfície celulares, ou aumentar a degradação de proteínas previamente existentes, para serem utilizadas como fonte de nitrogênio. Em muitos casos, as proteínas carregam os grupos hidrofóbicos na superfície celular (Sutherland, 2001); portanto, uma diminuição da concentração de proteínas na superfície celular pode acarretar em uma menor hidrofobicidade, o que condiz com os dados obtidos neste estudo.

A manutenção das bactérias em meio mineral com limitação de nitrogênio alterou ($p < 0,05$) o comprimento celular (Tabela 5). Em *S. maltophilia* LBBMA 105A, a redução correspondeu a 38,3% no comprimento das células, enquanto em *Pseudomonas* sp LBBMA 178 a redução foi de 44,1% do comprimento celular obtido em meio mineral NMP completo. Dentre os três isolados avaliados, *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A foi o que apresentou a maior redução de tamanho celular, aproximadamente 71,7% do tamanho encontrado em meio mineral completo, além de ter apresentado alteração de forma de bacilo para cocos.

Tabela 5 – Comprimento celular (μm) de isolados bacterianos em resposta à incubação em meio com restrição de nitrogênio

Gênero/espécie	Isolado	T0	T1*	T2*
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	2,12(0,06) A	0,70(0,05) B	0,60(0,04) B
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	1,93(0,08) A	1,41(0,07) B	1,19(0,09) C
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	2,05(0,08) A	1,52(0,06) B	1,37(0,05) C

Valores entre parênteses representam o erro-padrão da média.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Referem-se ao momento em que as células foram coletadas do meio de desnutrição para análise. Para cada isolado, esses tempos são informados na Figura 1.

O padrão de redução no comprimento, bem como na forma celular, tem sido documentado para outros isolados de bactérias durante a desnutrição (Bossolan, 2000;

Sanin et al., 2003; Leung et al. 2005). Para células de *Pseudomonas* sp. mantidas em meio de cultura com escassez de carbono, foi observada uma redução de 2,5 para 0,6 µm, além da alteração de forma de bastonete para cocos, após 16 dias de desnutrição (Sanin et al., 2003). Para *Shewanella alga* BrY foi observada uma redução de 2,3 para 0,6 µm após 86 dias de desnutrição em tampão fosfato salino. No mesmo estudo, foi observada uma redução de 1,6 para 0,9 µm após 70 dias de desnutrição (Bossolan, 2000). Em estudo com linhagem de *Moraxella* sp. mantida em meio de cultura com escassez de carbono foi observada redução significativa após 90 dias de desnutrição (Leung et al., 2005). Esses estudos demonstram que a redução da dimensão celular em resposta a limitação nutricional é um processo lento, comparativamente a outros mecanismos de resposta microbiana a alterações do ambiente. Neste estudo, redução significativa da dimensão celular de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A foi alcançada após 5 dias de cultivo em meio com restrição de nitrogênio. Demonstra-se, assim, que a obtenção de ultramicrobactérias pode ser otimizada pela combinação entre isolado microbiano e meio de desnutrição.

A alteração morfológica da célula em resposta à escassez nutricional é uma adaptação cuja regulação é complexa (Nyström, 2004), estando o controle da expressão gênica durante as divisões celulares, sem ganho de massa, ainda em fase de elucidação (Reeve et al., 1984; Nyström e Kjelleberg, 1989; Ross et al., 2001). A redução da dimensão celular sob escassez nutricional constitui-se em vantagem adaptativa, pois o aumento da relação superfície:volume da célula facilita a aquisição de nutrientes do meio externo e diminui o gasto metabólico com a manutenção celular (Reeve et al., 1984; Nyström e Kjelleberg, 1989; Ross et al., 2001).

A desnutrição resultou em redução da capacidade de adesão fraca dos isolados de *Pseudomonas* ao solo (Tabela 6). Comportamento inverso foi observado com o isolado de *S. maltophilia* LBBMA 105A. As variações da adesão forte ao solo seguiram o mesmo padrão das alterações da adesão fraca ao longo da desnutrição (Tabela 6), exceto para o isolado *Pseudomonas* sp. 178. Este isolado apresentou aumento ($p < 0,05$) da adesão forte ao solo, resultando em mudança acentuada ($p < 0,05$) da razão RL ao longo da desnutrição (Tabela 6).

As modificações da razão RL (Tabela 6) representam de certo modo diferentes estratégias adaptativas das células à limitação de nitrogênio. Em *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A, o aumento do número total de células em suspensão pode representar

uma vantagem adaptativa por propiciar maior dispersão celular. Ao mesmo tempo, o aumento na proporção de células aderidas de *S. maltophilia* LBBMA, bem como o aumento da razão RL, indicam que este isolado apresenta aumento na proporção de células fortemente aderidas em resposta à limitação de nitrogênio. Diferentemente, a *Pseudomonas* sp. LBBMA 178 diminuiu a quantidade de células fracamente aderidas, causando aumento do número de células em suspensão e conferindo ao mesmo tempo adesão forte àquelas que permaneceram aderidas ao substrato. Dependendo da aplicação biotecnológica que for dada ao microrganismo, os diferentes padrões de adesão forte e fraca podem resultar em diferenças significativas no que se refere ao sucesso e à eficiência da tecnologia considerada.

Tabela 6 – Adesão relativa às partículas de solo (KdA) de isolados bacterianos em resposta à incubação em meio com restrição de nitrogênio

Gênero/espécie	Isolado	T0	T1*	T2*
		KdA1		
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	221,1(4,49) A	35,6(0,55) B	34,3(7,58) B
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	6,9(0,05) C	7,8(0,35) B	9,8(0,72) A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	1427(365,4) A	414,8(35,5) B	420,6(25,9) B
KdA2				
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	328,7(53,4) A	47,9(2,65) B	58,1(13,1) B
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	10,3(0,30) C	14,4(0,66) B	18,5(2,29) A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	1045,7(90,3) B	2320,8(160,8) A	2253,0(137,9) A
RL				
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 81A	1,49(0,24) A	1,34(0,09) A	1,69(0,12) A
<i>S. maltophilia</i>	LBBMA 105A	1,49(0,03) C	1,85(0,04) B	1,90(0,13) A
<i>Pseudomonas</i> sp.	LBBMA 178	0,73(0,13) B	5,59(0,30) A	5,12(0,15) A

Valores entre parênteses representam o erro-padrão da média.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* Referem-se ao momento em que as células foram coletadas do meio de desnutrição para análise. Para cada isolado, esses tempos são informados na Figura 1.

KdA1 e KdA2: coeficiente de adesão bacteriana fraca e forte ao solo, respectivamente.

RL : razão entre a adesão forte (KdA2) e adesão fraca (KdA1).

A adesão das células de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A foi positivamente correlacionada com a hidrofobicidade celular ($p < 0,01$), com as cargas celulares superficiais positivas ($p < 0,05$), negativas ($p < 0,01$) e com o tamanho celular ($p < 0,01$) (Tabela 7). A adesão fraca das células de *Pseudomonas* sp. LBBMA 178 também apresentou correlação positiva com a hidrofobicidade celular ($p < 0,01$), com as cargas

celulares superficiais catiônicas ($p < 0,01$) e com o tamanho celular ($p < 0,01$). Contudo, ao contrário do verificado para *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A, a adesão forte foi negativamente correlacionada com a hidrofobicidade celular ($p < 0,01$), com as cargas celulares superficiais catiônicas ($p < 0,01$) e com o tamanho celular ($p < 0,01$) (Tabela 7). Finalmente, a adesão de *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 105A foi negativamente correlacionada com a hidrofobicidade celular ($p < 0,01$) e com o tamanho celular ($p < 0,01$), e positivamente correlacionada com as cargas celulares superficiais positivas e negativas (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação entre as grandezas mensuradas dentro de cada isolado ao longo do tempo de desnutrição

Parâmetros		Isolado		
		<i>P. sp. LBBMA 81A</i>	<i>S. maltophilia</i> LBBMA 105A	<i>P. sp. LBBMA 178</i>
1	2	Correlação	Correlação	correlação
Hfb	CCSC	0,6649 ns	-0,8423**	0,7201**
Hfb	CCSA	0,8694**	-0,7867**	-0,5090 ns
Hfb	KdA1	0,9942**	-0,7925**	0,9161**
Hfb	KdA2	0,9788**	-0,9072**	-0,9379**
CCSC	CCSA	0,6466 ns	0,8777**	-0,9296**
CCSC	KdA1	0,6327*	0,9297**	0,7690**
CCSC	KdA2	0,5867*	0,9352**	-0,8042**
CCSA	KdA1	0,8758**	0,9549**	-0,6229*
CCSA	KdA2	0,0875**	0,9413**	0,6428*
CC	Hfb	0,9916**	0,9041**	0,8649**
CC	CCSC	0,6125*	-0,9341**	0,9073**
CC	CCSA	0,8436**	-0,7496**	-0,7736**
CC	KdA1	0,9948**	-0,8143**	0,9083**
CC	KdA2	0,9973**	-0,8997**	-0,9450**
KdA1	KdA2	0,9803**	0,9642**	-0,8925**

Hfb: hidrofobicidade celular superficial; KdCA: cargas celulares superficiais negativas relativas; KdCC: cargas celulares superficiais positivas relativas; CC: comprimento celular; KdA1: coeficiente de adesão fraca ao solo; KdA2: coeficiente de adesão forte ao solo.
ns correlação não-significativa; * correlação significativa a 5%; ** correlação significativa a 1%.

4. Considerações Finais

Os resultados deste estudo demonstram não haver um padrão uniforme de correlação entre as alterações das características de superfície celular estudadas e as de adesão às partículas de solo dos isolados estudados, em função da desnutrição. Portanto, ao se propor a técnica de desnutrição para alterar as características de adesão ou de superfície de um isolado bacteriano, faz-se necessário o estudo individual dessas alterações e a criteriosa avaliação da eficácia da desnutrição em promover alterações que sirvam ao propósito para o qual se deseja utilizar o isolado.

A partir do universo estudado, conclui-se que o isolado de *S. maltophilia* LBBMA 105A, apesar de caracterizado como capaz de degradar hidrocarbonetos de petróleo e de apresentar baixa tendência de adesão às partículas do solo, apresenta limitações para sua utilização em ambientes com limitação de nitrogênio, em razão da significativa redução de viabilidade demonstrada ao longo da desnutrição. Infere-se também que os isolados de *Pseudomonas* possam ser utilizados em aplicações *in situ*, por serem capazes de manter a viabilidade celular em condições de carência de nitrogênio. Finalmente, a desnutrição em meios com limitação desse nutriente propicia alterações de características celulares do isolado *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A que podem favorecer sua aplicação em processos que dependem do transporte celular através de matrizes porosas.

Referências Bibliográficas

AMY, P. S.; DURHAM, C.; HALL, D.; HALDEMAN, D. L. Starvation-survival of deep subsurface isolates. **Current Microbiology**, v. 26, p. 345-352, 1993.

BENMOUSSA, H.; TYAGI, R. D.; CAMPBELL, P. G. C. Simultaneous sewage sludge digestion and metal leaching using an internal loop reactor: effect of suspended solids concentration. **Water Research**, v. 32, p. 2373-2390, 1998.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BOSSOLAN, N. R. S. **Desnutrição, transporte e crescimento de bactérias em meio poroso**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 127p., 2000.

CAMESANO, T. A.; LOGAN, B. E. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1699-1708, 1998.

CAMESANO, T. A.; UNICE, K. M.; LOGAN, B. E. Blocking and ripening of colloids in porous media and their implications for bacterial transport. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 160, p. 291-308, 1999.

CASTALDI, S.; TEDESCO, D. Methane production and consumption in an active volcanic environment of Southern Italy. **Chemosphere**, v. 58, p. 131-139, 2005.

CASTELLANOS, T.; ASCENCIO, F.; BASHAN, Y. Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p. 1-9, 2000.

CHESBRO, W.; ARBIGE, M.; EIFERT, B. When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth: metabolics, morphologic and cell cycle behavior. **FEMS Microbiology Letters**, v. 74, p. 103-119, 1990.

CISAR, J. O.; KOLENBRANDER, P. E.; MCINTIRE, F. C. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. **Infection and Immunity**, v. 24, p. 742-752, 1979.

COULON, F.; PELLETIER, E.; GOURHANT, L.; DELILLE, D. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. **Chemosphere**, v. 58, p. 1439-1448, 2005

GALLARDO-MORENO, A.M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.L.; BRUQUE, J.M., C. PÉREZ-GIRALDO, C.; SÁNCHEZ-SILOS, R.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. Influence of the growth medium, suspending liquid and measurement temperature on the physico-chemical surface properties of two enterococci strains. **Journal Adhesion Science and Technology**, v. 17, p. 1877-1887, 2003.

GANNON, J. T.; MANILAL, V. B.; ALEXANDER, M. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 190-193, 1991.

GIVSKOV, M., L. EBERL, S. MØLLER, L. KONGBAK POULSEN, AND S. MOLIN. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 7-14, 1994.

GOGOI, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; MOHAN, T. R. K. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site.

Advances in Environmental Research, v. 7, p. 767-782, 2003.

GU, Y.-H.; MAZZOLA, M. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1155-1162, 2001.

GUSILS, C.; CUOZZO, S.; SESMA, F.; GONZALEZ, S. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 34-42, 2002.

HEISE, S.; GUST, G. Influence of the physiological status of bacteria on their transport into permeable sediments. **Marine Ecology Progress Series**, v. 190, p. 141-153, 1999.

HERIGSTADA, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

HWANG, S.; TATE III, R. L. Interactions of clay minerals with *Arthrobacter crystallopoietes*: starvation, survival and 2-hydroxypyridine catabolism. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 335-340, 1997.

IWABICHI, N.; SUNAIRI, M. ANZAI, H.; MORISAKI, H.; NAKAJIMA, M. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 30, p. 51-60, 2003.

JANA, T. K.; SRIVASTAVA, A. K.; CSERY, K.; ARORA, D. K. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 28-37, 2000.

JENKINS, M. B. Rhizobial and bradyrhizobial symbionts of mesquite from the Sonoran Desert: salt tolerance, facultative halophily and nitrate respiration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1675-1682, 2003.

JONES, D. S.; ADAIR, C. G.; MAWHINNEY, W. M.; GORMAN, S. P. Standardisation and comparison of methods employed for microbial cell surface hydrophobicity and charge determination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, p. 83-89, 1996.

KABIR, M. S.; SAGARA, T.; OSHIMA, T.; KAWAGOE, Y.; MORI, H. TSUNEDOMI, R.; YAMADA, M. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 150, p. 2543-2553, 2004.

KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanism of MEOR. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 16,

p. 170-172, 1994.

KIRKEGAARD, J. A.; TROEDSON, R. J.; SO, H. B.; KUSHWAHA, B. L. The effect of compaction on the growth of pigeonpea on clay soils. II. Mechanisms of crop response and seasonal effects on an oxisol in a humid coastal environment. **Soil and Tillage Research**, v. 24, p. 129-147, 1992.

LEUNG, K. T.; MOORE, M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of carbon starvation on *p-nitrophenol* degradation by a *Moraxella* strain in buffer and river water. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 237-245, 2005.

LING, T. Y.; ACHBERGER, E. C.; DRAPCHO, C. M.; BENGTON, R. L. Quantifying adsorption of an indicator bacteria in a soil-water system. **Transactions of the ASAE**, v. 45, p. 669-674, 2002.

LUO, Q.; WANG, H.; ZHANG, X.; QIAN, Y. Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 423-427, 2005.

MAILLOUX, B. J.; FULLER, M. E.; ONSTOTT, T. C.; HALL, J.; DONG, H.; DEFLAUN, M. F.; STREGER, S. H.; ROTHMEL, R. K.; GREEN, M.; SWIFT, D. J. P.; RADKE, J. The role of physical, chemical, and microbial heterogeneity on the field-scale transport and attachment of bacteria. **Water Resources Research**, v. 39, p. 1142-1158, 2003.

NOYCE, J.; HUGHES, J. Bactericidal Effects of negative and positive ions generated in nitrogen on starved *Pseudomonas veronii*. **Journal of Electrostatics**, v. 57, p. 49-58, 2003.

NOZAWA, Y.; KASAI, R.; SEKIYA, T. Modification of membrane lipid composition following the nutritional shift-up of starved cells. A comparison with membrane biogenesis in Tetrahymena. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 603, p. 347-365, 1980.

NYSTROM, T. Stationary-phase physiology. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 161-181, 2004.

NYSTROM, T.; S. KJELLEBERG. Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marine *Vibrio* during the initial phase of starvation. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 1599-1606, 1989.

OLIVEIRA, V. B. **Bactérias para aplicação em recuperação avançada de petróleo**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 59p., 2004.

PEDERSEN, K. Electrostatic interaction chromatography, a method for assaying the relative surface charges of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 12, p. 365-367, 1981.

REEVE, C.A., BOCKMAN, A. T.; MATIN, A. Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 157, p. 758-763, 1984.

RICKARD, A. H.; MCBAIN, A. J.; LEDDER, R. G.; HANDLAY, P. S.; GILBERT, P. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 133-140, 2003.

ROSCHE, T. M.; SMITH, D. J.; PARKER, E. E.; OLIVER, J. D. RpoS involvement and requirement for exogenous nutrient for osmotically induced cross protection in *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 455-462, 2005.

ROSS, N.; VILLEMUR, R; MARCANDELLA, E.; DESCHENES, L. Assessment of Changes in Biodiversity when a Community of Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater Is Stimulated to Form a Biofilm. **Microbial Ecology**, v. 42, p. 56-68, 2001.

SANIN, S. L. Effect of starvation on resuscitation and the surface characteristics of bacteria. **Journal of Environmental Science and Health Part A – Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. A38, p – 1517-1528, 2003.

SANIN, S. L.; SANIN, F. D.; BRYERS, J. D. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 909-914, 2003.

STODEREGGER, K. E.; HERNDL, G. J. Dynamics in bacterial cell surface properties assessed by fluorescent stains and confocal laser scanning microscopy. **Aquatic Microbiology and Ecology**, v. 36, p. 29-40, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3-9, 2001.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 104, p. 119-189, 1993.

VADILLO-RODRÍGUEZ, V.; BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C.; VRIES, J.; NORDE, W. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, p. 33-41, 2005.

VAN SCHIE, P. M.; FLETCHER, M. Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5082-5088, 1999.

WATANABE, K.; MIYASHITA, M.; HARAYAMA, S. Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3905-3910, 2000.

Transporte Eletrocinético de Bactérias através de Solo Argiloso Residual Tropical Reconstituído por Adensamento

Resumo: A aplicação de campos elétricos ao solo tem sido utilizada para remoção de contaminantes iônicos. Conhecida como eletrocinese, essa técnica pode ser aplicada ao transporte de bactérias no solo, dada a presença de cargas na superfície celular bacteriana. Essa possibilidade é relevante em aplicações biotecnológicas que requeiram o transporte de bactérias através de matrizes porosas, especialmente das caracterizadas por baixa condutividade hidráulica. Neste trabalho, avaliou-se a aplicação da eletrocinese como ferramenta para o transporte de esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e de células desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A em solo franco-argiloso tropical. Os ensaios eletrocinéticos foram realizados em corpo-de-prova de solo reconstituído por adensamento, com a aplicação de uma corrente de 5 mA durante 24 h. As células das bactérias foram caracterizadas como possuindo baixa hidrofobicidade superficial, dimensão inferior a 1 µm e forma cocóide. A adesão dos esporos de *B. subtilis* ao solo foi maior do que a de células desnutridas de *Pseudomonas* sp. O conteúdo de cargas celulares superficiais positivas, para ambos os isolados, foi baixo. Contudo, nos esporos de *B. subtilis*, o conteúdo de cargas celulares superficiais negativas foi superior ao observado para as células desnutridas do isolado *Pseudomonas* sp. O sentido do fluxo eletrosmótico foi anodo-catodo. Foi observada uma pequena variação de umidade e de pH ao longo do corpo-de-prova. As células e esporos foram distribuídas hiperbolicamente ao longo do corpo-de-prova; contudo, os esporos de *B. subtilis* foram transportados mais eficientemente do que as células desnutridas de *Pseudomonas* sp. A tendência de adesão ao solo não foi fator determinante no transporte das células. O maior transporte dos esporos de *B. subtilis* foi atribuído ao maior valor de cargas superficiais negativas nessa estrutura. Este trabalho demonstra que a eletrocinese pode ser utilizada para o transporte de bactérias em solos com baixa condutividade hidráulica.

Palavras-chave: eletrocinese, bactérias, solo argiloso, desnutrição.

1. Introdução

O crescente número de sítios contaminados com uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos configura-se como um dos principais problemas da sociedade industrializada atual. A contaminação de solos subsuperficiais impõe ainda um sério risco aos aquíferos e à saúde daqueles que deles fazem uso. Essa constatação tem levado ao desenvolvimento de inúmeras técnicas de remediação de ambientes contaminados (Colten, 1998) e ao crescente uso da biorremediação como ferramenta auxiliar na descontaminação de solos contaminados por compostos orgânicos (Röling et al, 2002; Susarla et al., 2002; Van Hamme et al, 2003) e inorgânicos (Gaad, 2004). Em certos casos de poluição de solos subsuperficiais, a biorremediação *in situ* é a tecnologia de tratamento mais apropriada (Hamby, 1996).

O sucesso da biorremediação *in situ* em solos subsuperficiais depende da existência de populações autóctones com capacidade para degradar os contaminantes (Dojka et al., 1998; Boopathy, 2000), ou da introdução de microrganismos com essa característica que sejam eficientes no processo, podendo ser eles adaptados ou geneticamente modificados, exógenos ou indígenas (Mishra, 2001).

A bioaugmentação, quando realizada por tecnologias que utilizam o bombeamento de suspensão de células (Jackson et al., 1994; Johnson e Logan, 1996; Camesano e Logan, 1998, Hendry et al. 1999; Mehmannaavaz, 2002; Unc e Goss, 2003), não é efetiva em solos com baixa condutividade hidráulica (Mattson et al., 2002a). Nesses solos, as técnicas de bombeamento podem criar fissuras ou fraturas, que se constituem em caminhos preferenciais e, por isso, impedem a distribuição homogênea das células bacterianas, impossibilitando o processo de remediação (Acar et al., 1997).

A técnica de eletrocinese, que consiste na aplicação de correntes elétricas através da massa de solo, tem sido proposta como uma das estratégias para se remover contaminantes iônicos do solo (Yeung et al., 1997; Lee e Yang, 2000; Jackman et al., 2001; Sonoyama et al., 2001; Kim et al., 2002; Page e Page, 2002; Virkutyte et al., 2002; Saichek e Reddy, 2003; Sawada et al., 2003, Luo et al., 2005b), bem como para introduzir nutrientes e aceptores finais de elétrons, com o intuito de bioestimular a microbiota autóctone a degradar contaminantes orgânicos (Acar et al., 1996; Acar et al., 1997; Thevanayagam e Rishindran, 1998; Mattson et al., 2002b). A eletrocinese pode ser utilizada ainda na introdução e transporte de células bacterianas através da matriz porosa do solo (DeFlaun e Condee, 1997; Lee e Lee, 2001; Lear et al., 2004; Suni e

Romantschuk, 2004; Wick et al., 2004).

A restrição ao transporte de bactérias através do solo tem sido atribuída principalmente à adesão das bactérias às partículas que o compõem (Becker et al., 2004). Diversas características estão associadas à adesão de bactérias a substratos, a exemplo da forma, da dimensão e do arranjo celular (Fontes et al., 1991), da hidrofobicidade (Vadillo-Rodríguez et al., 2005) e das cargas celulares superficiais (Gusils et al., 2002). Além disso, a própria aplicação da corrente elétrica, com intensidade acima de 20 mA, pode alterar as características de adesão bacteriana, por modificar características de superfície celular (Luo et al., 2005a).

Em projetos de biorremediação *in situ* onde se vislumbra o emprego da bioaumentação, é necessária a predição da eficiência de transporte das células bacterianas através da matriz porosa, para que sejam avaliados os riscos e a eficiência da metodologia. Este estudo teve por objetivos verificar a eletromigração de bactérias através de um solo argiloso tropical, bem como relacionar características de superfície celular e adesão das bactérias ao solo com a distribuição das células ao longo da matriz porosa.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados bacterianos

Neste trabalho foram utilizados isolados bacterianos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) / Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil (Tabela 1). Esses isolados foram previamente caracterizados quanto à sua capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo (Oliveira, 2004).

A identificação das bactérias foi realizada por comparação dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), com os de uma biblioteca de referência armazenada em banco de dados para microrganismos aeróbios de amostras ambientais do sistema Sherlock, da Microbial Identification System[®] (MIDI, Newark, DE, EVA)

(TSBA, versão 4.0).

Tabela 1 – Isolados de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo pertencentes à coleção do LBBMA do DMB/BIOAGRO, UFV, com identificação (FAME/MIDI), registro de origem e substrato de crescimento

Isolado	Identificação	Origem ¹	Substrato ²
LBBMA 81A	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	MMMP
LBBMA 155	<i>Bacillus subtilis</i>	2	MMP

¹ – Local de origem dos isolados: (1) Solo de “landfarming” - Refinaria Gabriel Passos (REGAP), Minas Gerais; (2) Sedimento de mangue - Refinaria Duque de Caxias (REDUC), Rio de Janeiro.

² – As siglas referem-se a (MMMP) crescimento em meio mineral adicionado de melão em presença de petróleo e (MMP) crescimento em meio mineral acrescido de 1% de petróleo (p/v).

2.2. Obtenção de células desnutridas

As culturas-estoque dos isolados bacterianos (Tabela 1) foram ativadas em meio mineral NMP sólido (Bodour e Miller-Meier, 1998) e, em seguida, inoculadas em 75 mL do mesmo meio de cultura, para incubação a 30° C e 150 rpm, até o final da fase de crescimento logarítmica. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação em centrífuga MR23I (JOUAN), a 6.000 g e 4°C por 10 minutos. Esse processo foi repetido por três vezes com ressuspensão das células em solução salina a 0,85% de NaCl. As células foram ressuspensas em meio mineral NMP desprovido da sua principal fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), o que elevou a relação C:N de 25:1 para 1.320:1. A concentração celular nesse meio foi ajustada para valores entre 10⁸ e 10⁹ UFC mL⁻¹. As células de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A foram mantidas no meio de desnutrição durante 72 horas e as de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 foram mantidas no meio de desnutrição durante 2 semanas, para a obtenção de esporos.

As suspensões de células e de esporos utilizadas para a determinação das características de superfície e para os ensaios de transporte eletrocínético foram preparadas coletando-se as células por centrifugação em centrífuga MR23I (JOUAN), a 6.000 g e 4°C por 10 minutos, e lavando-as três vezes em NaCl a 0,85%. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS (Jones et al., 1996) na concentração de células requerida em cada experimento.

2.3. Características de superfície dos isolados

2.3.1. Hidrofobicidade celular superficial, carga celular superficial, adesão ao solo e comprimento celular

As determinações das características de superfície celular foram realizadas segundo protocolos descritos nos itens 2.3 (hidrofobicidade) e 2.4 (carga celular) do artigo 1. A capacidade de adesão celular ao solo foi avaliada de acordo com o protocolo descrito no item 2.5 do mesmo artigo. O comprimento celular foi determinado segundo protocolo descrito no item 2.6 do artigo 2.

2.4. Solo

As características do solo utilizado nos ensaios de adesão são as descritas no item 2.2 do artigo 1.

2.5. Célula eletrocinética

A célula eletrocinética (Figuras 1 e 2), elaborada em acrílico, foi desenvolvida no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio (Rivas, 2002). O reservatório para o corpo-de-prova consiste em um tubo com diâmetro interno de 38 mm e comprimento de 50 mm. Os eletrodos são feitos de aço inox 316, sendo situados a 88,5 mm do corpo-de-prova. As câmaras eletrolíticas são conectadas entre os eletrodos e o reservatório do corpo, e consistem de tubos com diâmetro interno de 40 mm e comprimento de 96,5 mm. No topo dessas câmaras, luvas de PVC conectam duas pipetas graduadas com 10 mL de capacidade e 0,1 mL de resolução, utilizadas para medição do fluxo eletrosmótico.

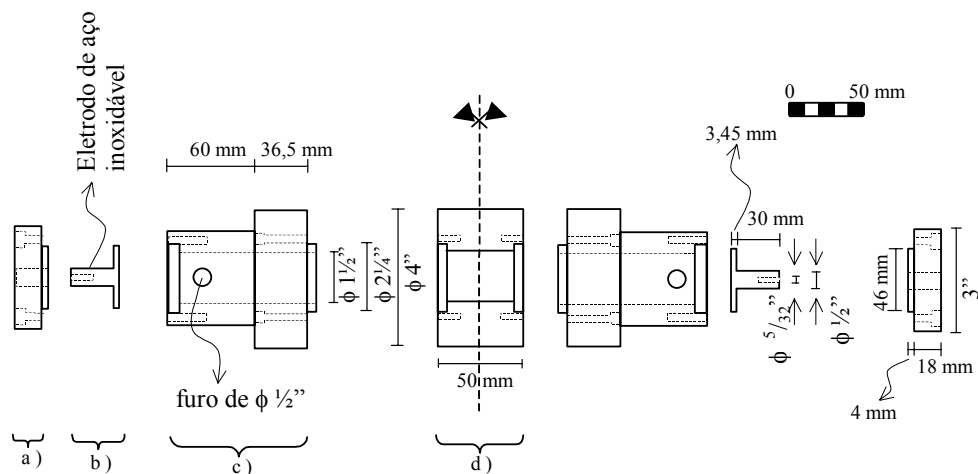


Figura 1 – Detalhes da célula electrocinética: a) fixador do eletrodo; b) eletrodo; c) reservatório (eletrólitos); d) reservatório para amostra de solo. Adaptado de Rivas (2002).

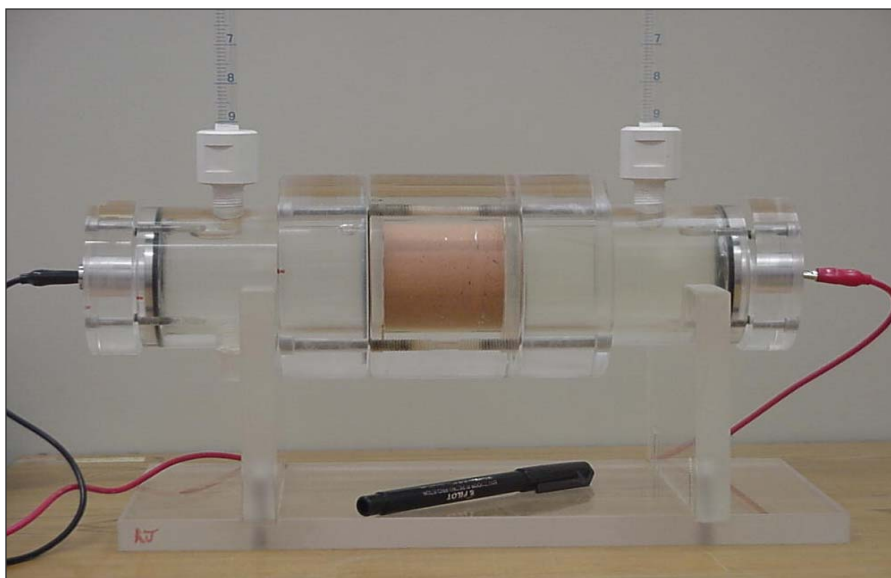


Figura 2 – Célula electrocinética, mostrando o corpo de prova na parte central.

2.6. Preparo do corpo-de-prova

O preparo do corpo-de-prova foi feito diretamente no compartimento da célula reservado para este fim, utilizando-se solo passado em peneira de malha 40 e esterilizado em autoclave. O solo foi misturado com PBS até atingir 1,25 do limite de liquidez, que consiste no valor de umidade no qual o solo passa do estado plástico para o estado fluido. Em seguida, o corpo-de-prova foi adensado com aplicação sequencial

de tensão em 3 estágios, até se atingir um total de 60 kPa. Depois do solo adensado, o reservatório foi acoplado às câmaras eletrolíticas (Figura 2), as quais foram preenchidas com PBS.

2.7. Movimentação de células por eletrocinese

Após o preparo do corpo-de-prova e da filtração de 10^7 células de bactérias mantidas em PBS através de uma membrana Millipore ($0,22 \mu\text{m}$) (Jones et al., 1996), a face da membrana contendo as células foi colocada em contato com a face do corpo-de-prova voltada para o catodo. O solo foi submetido a uma corrente de 5 mA durante 24 horas. A seguir, o corpo-de-prova foi desmontado, dividido em 5 seções de 10 mm e submetido à análise da distribuição das células bacterianas. Cada seção foi homogeneizada por agitação mecânica e uma porção de 4g dispersa em 38 mL de PBS (Jones et al., 1996) contendo pirofosfato de sódio a 0,1%, sob agitação vigorosa em agitador tipo Vortex por 5 minutos. Diluições seriadas das suspensões bacterianas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio mineral NMP, com o uso da técnica do espalhamento em superfície, sendo as placas incubadas a 28°C . As contagens de colônias foram efetuadas no período de até 48 horas após a aplicação do inóculo.

Para a avaliação da eficiência do transporte, os cálculos levaram em consideração a eficiência de recuperação de células pelo método de contagem utilizado.

Foram realizados os seguintes controles para os ensaios:

- controle da sobrevivência das células densitradas de *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A e dos esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 em suspensão PBS durante 24 horas. Este controle foi realizado para verificar a ocorrência de perda de viabilidade celular após transferência para PBS;

- controle do total de células recuperadas em ensaios com o solo desestruturado e com o solo adensado. Este controle foi realizado para verificar se o corpo de prova reconstituído por adensamento apresentaria recuperação de células diferenciada do solo passado em peneira, bem como para verificar diferenças entre os isolados na recuperação de células misturadas ao solo. Para o controle em solo adensado o corpo de prova foi preparado segundo procedimentos descritos no item 2.6, em seguida foram inoculados um total de 10^7 UFC segundo procedimento descrito no item 2.7, contudo, não foi aplicada corrente elétrica. Ao final de 24 horas o corpo foi fracionado e a distribuição de UFC foi avaliada seguindo procedimentos descritos no mesmo item.

Para o controle em solo desestruturado o mesmo número de células foi misturado em 100g de solo com umidade de aproximadamente 35%, a concentração de células recuperadas para este controle foi analisada logo após e 24 horas após a inoculação;

- controle de contaminação. A célula eletrocinética foi produzida em acrílico, material que não pode ser esterelizado por calor. Este controle foi realizado, utilizando-se as mesmas condições dos ensaios, contudo sem a adição de bactérias, para verificar se a manipulação do solo ou o processo de esterilização do solo e da célula eletrocinética foram adequados; e

- controle de movimentação de células sem a aplicação de corrente elétrica. Este controle foi realizado para verificar a ocorrência de migração celular independente da aplicação de corrente elétrica. O ensaio foi conduzido nas mesmas condições descritas nos itens 2.6 e 2.7, contudo sem adição de células bacterianas.

2.8. Outras determinações

Durante o decorrer dos ensaios eletrocinéticos, foi determinado o volume de líquido percolado. Ao final das 24 h de ensaio, foi estimado o gasto energético (VH). O pH (NBR 7353) e a umidade do solo (NBR 6457) ao longo do corpo-de-prova, além do pH das soluções eletrolíticas, foram também determinados.

2.9. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos obedecendo a um delineamento em parcelas subdivididas, com três repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

3. Resultados e Discussão

Os isolados *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155 não diferiram quanto à hidrofobicidade celular (Tabela 3), sendo ambos considerados altamente hidrofílicos. Também não diferiram quanto ao tamanho celular (Tabela 3),

apresentando ambos a forma cocóide. As células vegetativas desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A foram caracterizadas por apresentar valores significativamente inferiores de cargas celulares superficiais aniônicas, valores ligeiramente superiores de cargas celulares superficiais catiônicas e menor adesão às partículas de solo, em comparação aos esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 (Tabela 3). Tem sido demonstrado que a adesão bacteriana é influenciada pela hidrofobicidade (Vadillo-Rodríguez et al., 2005) e pelas cargas da superfície celular (Gusils et al., 2002). Portanto, a maior adesão dos esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 ao solo parece ser decorrente da maior quantidade de cargas aniônicas em sua superfície (Tabela 3), comparativamente às células desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A.

Tabela 3 – Características de células vegetativas desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e de esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155

Propriedades	<i>Pseudomonas</i> sp. LBBMA 81A	<i>Bacillus subtilis</i> LBBMA 155
Hfb	1,62 (0,50) A	3,29 (1,04) A
KdCC	1,049 (0,010) A	0,125 (0,009) B
KdCA	5,879 (0,251) B	69,49 (10,98) A
RC	5,603 (0,265) A	577,5 (137,2) B
KdA1	32,32 (1,54) B	541,4 (8,09) A
KdA2	47,49 (1,52) B	945,6 (34,4) A
RL	1,47 (0,05) B	1,75 (0,03) A
CC	0,64 (0,04) A	0,67 (0,02) A

Hfb = Hidrofobicidade, KdCC = Cargas celulares catiônicas, KdCA = Cargas celulares aniônicas, RC = Razão KdCA/KdCC, Ads1 = Adesão fraca, Ads2 = Adesão forte, RL = Razão Ads1/Ads2, CC = Comprimento celular.

Valores entre parêntese correspondem ao erro-padrão da média.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Modificações das características da superfície celular encontradas para o gênero *Pseudomonas*, em razão da desnutrição, já foram descritas na literatura (Jana et al., 2000; Sanin, 2003; Sanin et al, 2003). Contudo, dados acerca das características de superfície de esporos de *Bacillus subtilis* ainda são escassos na literatura (Chada et al, 2003; Driks, 2004). A superfície do esporo de *Bacillus subtilis* consiste de uma estrutura denominada capa, rica em camadas protéicas. Essa estrutura confere ao esporo grande resistência a fatores ambientais adversos, além de possuir atividade enzimática capaz de sinalizar quando a célula se encontra em um ambiente mais favorável, permitindo que o esporo germine (Chada et al, 2003; Driks, 2004).

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) de gasto energético

durante os ensaios de eletrocinese com ou sem as células bacterianas, indicando que, nas condições testadas, a adição das células ao solo não alterou a condutividade elétrica do meio. O consumo médio de energia foi de 0,602 W (dados não-mostrados).

O volume de líquido percolado aumentou linearmente durante os ensaios eletrocinéticos (Figura 2), não havendo influência dos isolados bacterianos. Tanto nos ensaios com adição de células, como nos ensaios sem adição de células, o sentido do fluxo foi anodo-catodo, indicando que o valor das cargas líquidas dos solutos presentes no sistema eletrocinético é positivo (Acar e Alshwabkeh, 1993). A adição das células bacterianas não influenciou o sentido nem a intensidade do fluxo eletrosmótico. O volume de líquido percolado se deve a diversos fatores, como desbalanço de íons nos eletrólitos, valor de carga elétrica predominante no solo e sua condutividade hidráulica (Acar e Alshwabkeh, 1993; Acar et al., 1995). Provavelmente, o fluxo no sentido anodo-catodo ocorreu por dois fatores: o primeiro refere-se aos altos valores de pH encontrados na região do catodo, como resultado da eletrólise da água e da migração de íons; o segundo está relacionado ao volume de cargas líquidas predominantes no solvente do sistema, neste caso positivo. Os valores de líquido percolado ao longo dos ensaios, aproximadamente 7,3 mL, representam 1/5 do volume total de líquido no solo, podendo ser considerados altos em solos com baixa condutividade hidráulica, como o utilizado no experimento.

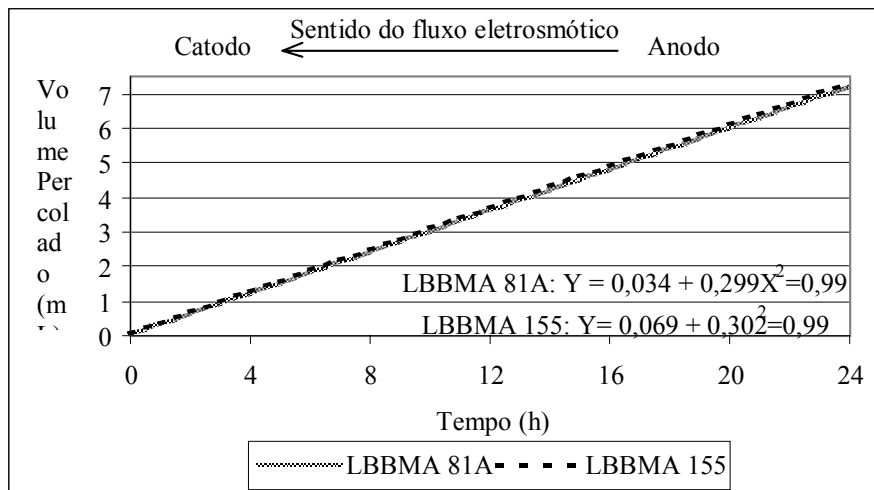


Figura 2 – Volume de líquido percolado nos ensaios eletrocinéticos de transporte dos isolados *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155.

A aplicação de campos elétricos no solo, sem o controle de pH, pode causar a geração de um gradiente de pH elevado ao longo do corpo-de-prova, em decorrência do

avanço de uma frente ácida no sentido catodo-anodo (Acar e Alshawabkeh, 1993). Os dados deste trabalho demonstraram que a utilização de PBS em baixas concentrações ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) mantém o pH na maior parte do corpo-de-prova próximo ao valor de 6,5 (Figura 3). Os valores mais elevados de pH estimados para a região mais próxima ao anodo devem condizer com a realidade, uma vez que o valor de pH do eletrólito do anodo, ao final do ensaio eletrocinético, apresentou valor médio de 11,07. O pH no

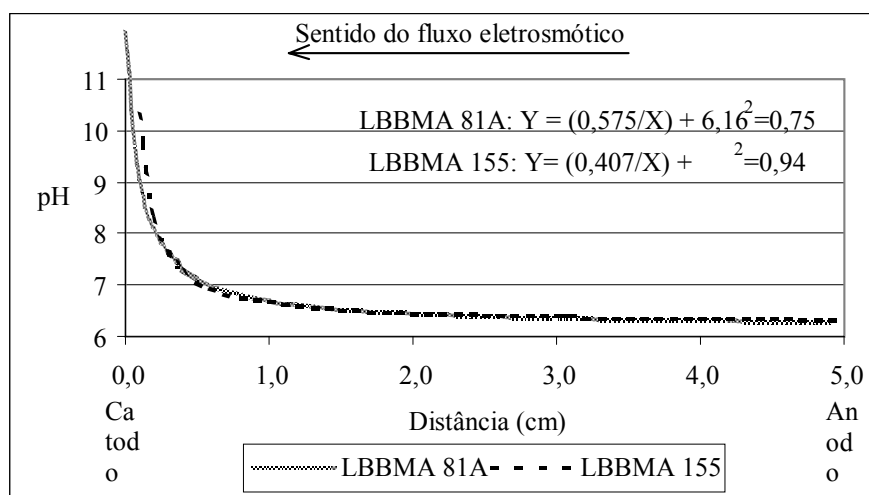


Figura 3 – Valores de pH ao longo do corpo-de-prova ao final dos ensaios de transporte eletrocinético de células desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A e de esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155. A distância é expressa a partir da face do corpo-de-prova voltada para o eletrólito do catodo.

eletrólito do catodo permaneceu próximo à neutralidade ($6,8 \pm 0,08$). O controle de pH durante a aplicação da eletrocinese como técnica de bioaumentação ou bioestimulação deve ser considerado, uma vez que variações bruscas de pH podem alterar a fisiologia das células de populações microbianas autóctones e alóctones. Adicionalmente, valores extremos de pH podem reduzir consideravelmente as populações microbianas do solo (Maillacheruvu et al, 2000; Lee e Lee, 2001; Lear et al, 2004).

A umidade é também uma característica físico-química do solo relevante durante a utilização de microrganismos do solo, haja vista que a atividade metabólica e, neste caso, a própria dispersão das bactérias através do meio poroso, dependem diretamente da água (Cattaneo et al., 1997; Jewett et al., 1999; Suni e Romantschuk, 2004). Demonstrou-se que não houve diferença dos teores de umidade nos ensaios eletrocinéticos conduzidos com células vegetativas desnutridas de *Pseudomonas* sp. LBBMA 81A ou com esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 (Figura 4). A reta de

regressão gerada para a umidade ao longo do corpo de prova para o isolado de *B. subtilis* LBBMA 155 possui um elevado erro ($R^2=0,41$). Este erro pode ser entendido observando-se os valores de densidade ao longo dos corpos de prova utilizados nos ensaios de transporte (Figura 5). A aplicação da tensão de 60 kPa em todos os ensaios foi feita sobre a face do anodo, o que provavelmente ocasionou o maior adensamento próximo ao catodo. A variação de densidade entre o catodo e o anodo foi mais expressiva no corpo de prova utilizado no ensaio de transporte das células do isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 155 (Figura 3). A maior densidade indicou que, nesta porção do corpo de prova, as partículas do solo estavam mais próximas, o que gerou um menor espaço vazio que pudesse ser preenchido com água, o que explica o elevado erro na reta gerada para os valores de umidade (Figura 4).

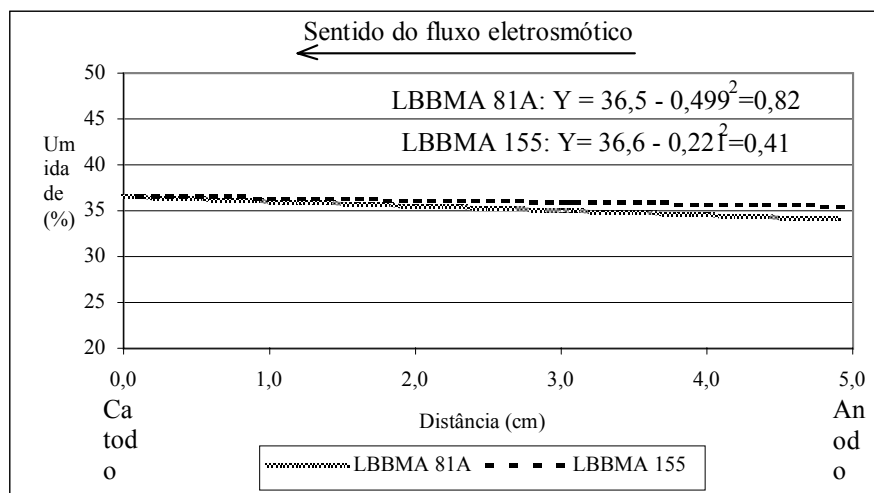


Figura 4 – Umidade ao longo do corpo-de-prova ao final dos ensaios eletrocinéticos de transporte dos isolados *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. A distância é expressa a partir da face do corpo-de-prova voltada para o eletrólito do catodo.

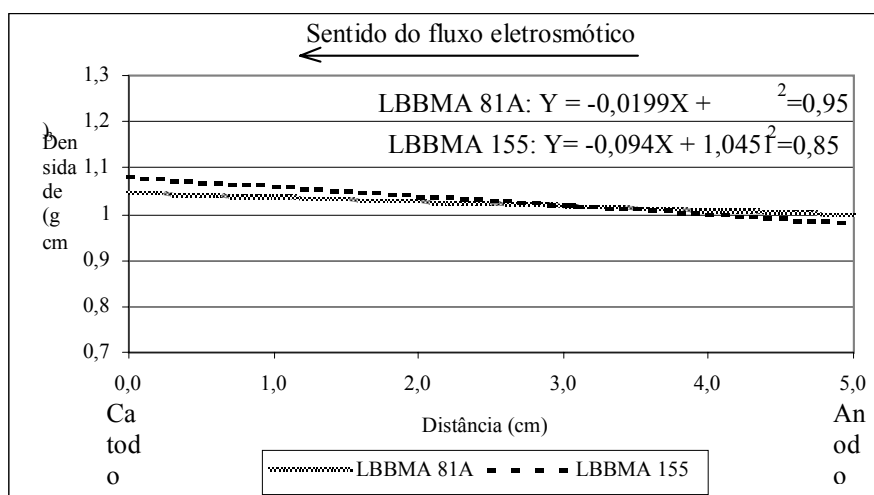


Figura 5 – Densidade aparente ao longo do corpo-de-prova ao final dos ensaios eletrocinéticos de transporte dos isolados *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. A distância é expressa a partir da face do corpo-de-prova voltada para o eletrólito do catodo.

Para tornar possível o cálculo de eficiência de transporte dos isolados microbianos mediado pela aplicação de campos elétricos (ensaios eletrocinéticos), foram necessários ensaios prévios da eficiência de recuperação (extração) das células aplicadas ao solo.

No ensaio com solo deformado foi observada uma maior recuperação celular logo após a adição dos inóculos bacterianos ao solo, em comparação com o percentual de células recuperadas 24h após a inoculação do solo (Tabela 4). Esse resultado é atribuído ao aumento da força de adesão das células às superfícies das partículas de solo com o aumento do tempo de contato, ou a uma diminuição da viabilidade do inóculo (Becker et al, 2004).

A recuperação de células nos ensaios eletrocinéticos demonstrou que o método recupera cerca de 50% das células desnutridas de *Pseudomonas* LBBMA 81A, enquanto que a recuperação dos esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 é de cerca de 43% (Tabela 5). Estes dados são coerentes com os resultados encontrados nos ensaios de adesão celular ao solo deformado, onde se demonstrou a maior tendência de adesão dos esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 (Tabela 4).

Tabela 4 – Recuperação (%) de células desnutridas de *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A e de esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 em solo deformado

Gênero/espécie	Isolado	CRC 0h	CRC 24h
<i>Pseudomonas sp.</i>	LBBMA 81A	54,5(1,52)Aa	49,5(1,36)Ba
<i>Bacillus subtilis</i>	LBBMA 155	44,6(0,49)Ab	42,7(0,21)Bb

CRC 0h 0 – Ensaio de recuperação celular em solo deformado, imediatamente após a inoculação.

CRC 24h – Ensaio de recuperação celular em solo deformado, 24h após a inoculação. Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Recuperação de células (%) dos isolados *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155 nos ensaios em solo deformado, solo compactado sem aplicação de corrente e nos ensaios de transporte por eletrocinese

Gênero/espécie	Isolado	CRC 24h	RC ESC	RCEE
<i>Pseudomonas sp.</i>	LBBMA 81A	49,5(1,36)Aa	50,9(5,27)Aa	50,9(5,27)Aa
<i>Bacillus subtilis</i>	LBBMA 155	42,7(0,21)Ab	41,1(1,75)Ab	44,1(0,77)Ab

CRC 24h – Ensaio de recuperação celular em solo deformado após 24 h a inoculação das bactérias.

RC ESC – recuperação de células em solo adensado sem aplicação de corrente.

RCEE – recuperação de células nos ensaios de transporte dos isolados por eletrocinese.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A recuperação de células a partir das amostras de solo adensado, com ou sem aplicação de corrente, não diferiu da obtida nas avaliações com amostras de solo deformado (Tabela 5). Portanto, pode-se inferir que nem o adensamento, nem a aplicação de corrente, modificam a recuperação celular pelo método descrito por Jones et al. (1996).

A aplicação de corrente elétrica propiciou o deslocamento dos esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 e das células desnutridas de *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A (Figura 6). Constatou-se que os esporos de *B. subtilis* LBBMA 155, a despeito do maior coeficiente de adesão (Tabela 3), foram transportados com maior eficiência, distribuindo-se em toda a extensão do corpo-de-prova. Esses resultados demonstram que, durante a aplicação de campos elétricos, a movimentação celular é determinada principalmente pelas cargas celulares negativas, as quais predominam mais intensamente na superfície dos esporos de *B. subtilis* LBBMA155 (Tabela 3). Outra causa possível para a maior mobilidade dos esporos de *B. subtilis* LBBMA 155 em

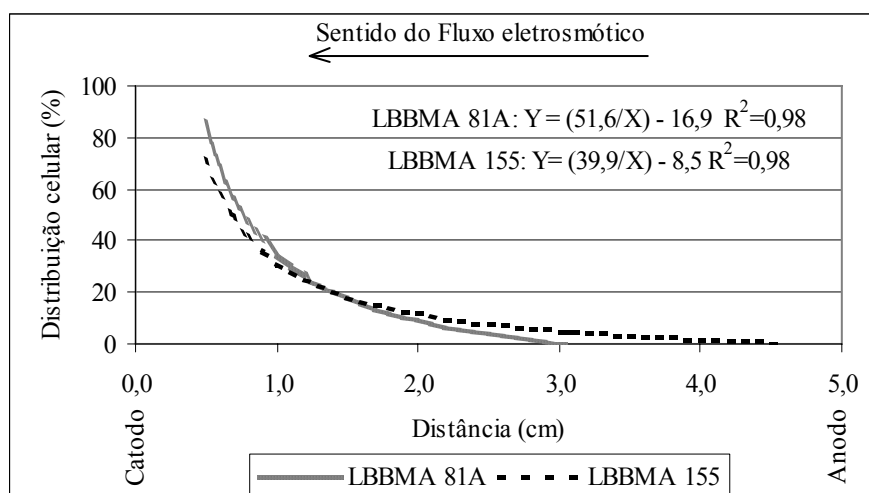


Figura 6 – Distribuição de células (%), a partir do total de células recuperadas, e concentração de células viáveis em diferentes seções do corpo-de-prova, ao final dos ensaios de transporte eletrocinético dos isolados *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. A distância é expressa a partir da face do corpo-de-prova voltada para o eletrólito do catodo.

relação às células desnutridas de *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A seria o fato de que as células desnutridas de *Pseudomonas sp.* LBBMA 81A, que primeiramente aderiram à matriz porosa, estariam causando “ripening”, ou seja, a adesão a células da mesma espécie (Camesano et al., 1999). Finalmente, considera-se a possibilidade de que os esporos de *B. subtilis* LBBMA 155, inicialmente aderidos à superfície das partículas da matriz porosa, possam estar causando o bloqueamento dessas superfícies (Camesano et al., 1999).

4. Considerações Finais

Este trabalho demonstrou que a técnica de eletrocinese pode ser utilizada como ferramenta para o transporte de bactérias em solos argilosos com baixas condutividade hidráulica. Demonstrou-se ainda que a migração bacteriana é mais influenciada pelas cargas negativas da superfície celular do que pela hidrofobicidade ou, ainda, pela tendência de adesão das células às partículas de solo. A maior migração observada para os esporos de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 pode ser também atribuída ao efeito de

bloqueamento das partículas de solo ou, ainda, ao fato das células de *Pseudomans* sp. LBBMA 81A que foram primeiramente aderidas ao solo causarem “ripening” das outras células durante o transporte. A técnica de eletrocinese apresenta potencial para ser utilizada in-situ visando à introdução de bactérias em matrizes porosas com baixa condutividade hidráulica. Constitui assim mais uma alternativa para se realizar a bioaumentação, tanto em áreas contaminadas como em processos de recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos.

Referências Bibliográficas

ACAR, Y. B.; ALSHAWABKEH, A. N. Principles of electrokinetic remediation. **Environmental Science & Technology**, v. 27, p. 2638-2647, 1993.

ACAR, Y. B.; OZSU, E. E.; ALSHAWABKEH, A. N.; RABBI, M. F.; GALE, R. J. Enhance soil bioremediation with electric fields. **CHEMTECH**, April, p. 40-44, 1996.

ACAR, Y. B.; RABBI, F.; OZSU, E. E. Electrokinetic injection of ammonium and sulfate ions into sand and kaolinite beds. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 123, p. 239-249, 1997.

ACAR, Y. B.; GALE, R. J.; ALSHAWABKEH, A. N.; MARKS, R. E.; PUPPALA, S.; BRICKA, M.; PARKER, R. Electrokinetic remediation: Basics and technology status. **Journal of Hazardous Materials**, v. 40, p. 117-137, 1995.

BECKER, M. W.; COLLINS, S. A.; METGE, D. W.; HARVEY, R. W.; SHAPIRO, A. M. Effect of cell physicochemical characteristics and motility on bacterial transport in groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 69, p. 195-213, 2004.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.

CAMESANO, T. A.; LOGAN, B. E. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1699-1708, 1998.

CAMESANO, T. A.; UNICE, K. M.; LOGAN, B. E. Blocking and ripening of colloids in porous media and their implications for bacterial transport. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 160, p. 291-308, 1999.

CATTANEO, M. V.; MASSON, C.; GREER, C. W. The influence of moisture on microbial transport, survival and 2,4-D biodegradation with a genetically marked *Burkholderia cepacia* in unsaturated soil columns. **Biodegradation**, v. 8, p. 87-96, 1997.

CHADA, V. G.; SANSTAD, E. A.; WANG, R.; DRIKS, A. Morphogenesis of bacillus spore surfaces. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 6255-6261, 2003.

COLTEN, C. E. Groundwater contamination: reconstructing historical knowledge for the courts. **Applied Geography**, v. 18, p. 259-273, 1998.

DEFLAUN, M. F.; CONDEE, C. W. Electrokinetic transport of bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 55, p. 263-277, 1997.

DOJKA, M. A.; HUGENHOLTZ, P.; HAACK, S. K.; PACE, N. R. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3869-3877, 1998.

DRICKS, A. The *Bacillus* spore coat. **Phytopatology**, v. 94, p. 1249-1251, 2004.

FONTES, D. E.; MILLS, A. L.; HORNBERGER, G. M.; HERMAN, J. S. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2473-2481, 1991.

GAAD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, p. 109-119, 2004.

GANNON, J.T.; MANILAL, V.B.; ALEXANDER, M. Relationship between cell surface and transport of bacteria through soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 190-193, 1991.

GUSILS, C.; CUOZZO, S.; SESMA, F.; GONZALEZ, S. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 34-42, 2002.

HAMBY, D. M. Site remediation techniques supporting environmental restoration activities - a review. **Science of the Total Environment**, v. 191, p. 203-224, 1996.

HENDRY, M. J.; LAWRENCE, J. R.; MALOSZEWSKI, P. Effects of velocity on the transport of two bacteria through saturated sand. **Ground Water**, v. 37, p. 103-112, 1999.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

JACKMAN, S.A.; MAINI, G.; SHARMAN, A. K.; SUNDERLAND, G.; KNOWLES, C. J. Electrokinetic movement and biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in silt soil. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, p. 40-48, 2001.

JACKSON, A.; ROY, D.; BREITENBECK, G. Transport of a bacterial suspension through a soil matrix using water and an anionic surfactant. **Water Research**, v. 28, p. 943-949, 1994.

JEWETT, D. G.; LOGAN, B. E.; ARNOLD, R. G.; BALES, R. C. Transport of *Pseudomonas fluorescens* strain P17 through quartz sand columns as a function of water content. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 36, p. 73-89, 1999.

JANA, T. K.; SRIVASTAVA, A. K.; CSERY, K.; ARORA, D. K. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 28-37, 2000.

JOHNSON, W. P.; LOGAN, B. E. Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter. **Water Research**, v. 30, p. 923-931, 1996.

JONES, D.S.; ADAIR, C.G.; MAWHINNEY, M.; GORMAN, S.P. Standardisation and comparison of methods employed for microbial cell surface hydrophobicity and charge determination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, p. 83-89, 1996.

KIM, S. O.; MOON, S. H.; KIM, K. W.; YUN, S. T. Pilot scale study on the ex situ electrokinetic removal of heavy metals from municipal wastewater sludges. **Water Research**, v.36, p. 4765-4774, 2002.

LEAR, G.; HARBOTTLE, M. J.; VAN DER GAST, C. J.; JACKMAN, S. A.; KNOWLES, C. J.; SILLS, G.; THOMPSON, I. P. the effect of electrokinetics on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1751-1760, 2004.

LEE, H.-H.; YANG, J.-W. A new method to control electrolytes pH by circulation system in electrokinetic soil remediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 77, p. 227-240, 2000.

LEE, H.-S.; LEE, K. Bioremediation of diesel-contaminated soil by bacterial cells transported by electrokinetics. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 1038-1045, 2001.

LING, T.Y.; ACHBERER, E.C.; DRAPCHO, C.M.; BENGTON, R.L. Quantifying adsorption of na indicator bacteria in a soil-water system. **Transactions of the ASAE**,

v. 45, p. 669-674, 2002.

LUO, Q.; WANG, H.; ZHANG, X.; QIAN, Y. Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 423-427, 2005a.

LUO, Q.; ZHANG, X.; WANG, H.; QIAN, Y. The use of non-uniform electrokinetics to enhance in situ bioremediation of phenol-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 20, p. 187-194, 2005b.

MAILLACHERUVU, K.; ALSHAWABKEH, A. N. Anaerobic microbial activity under electric fields. **Emerging Technology in Hazardous Waste Management**, v. 8, p. 69-79, editado por Tedder e Pohland, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.

MATTSON, E.D.; BOWMAN, R. S.; LINDGREN, E. R. Electrokinetic ion transport through unsaturated soil: 1. Theory, model development, and testing. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 54, p. 99-120, 2002a.

MATTSON, E.D.; BOWMAN, R. S.; LINDGREN, E. R. Electrokinetic ion transport through unsaturated soil: 2. Application to a heterogeneous field site. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 54, p. 121-140, 2002b.

MEHMANNAVAZ, R.; PRASHER, S. O.; AHMAD, D. Subsurface irrigation as a microbial delivery tool for bioaugmentation: transport, distribution and survival in large packed soil columns. **Environmental Technology**, v. 23, p. 707-717, 2002.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R. C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1675-1681, 2001.

OLIVEIRA, V. B. **Bactérias para aplicação em recuperação avançada de petróleo**. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PAGE, M. M.; PAGE, C. Electroremediation of Contaminated Soils. Journal of Environmental Engineering. **Journal of Environmental Engineering**, v. 128, p. 208-219, 2002.

PEDERSEN, K. Electrostatic Interaction Chromatography, a method for assaying the relative surface charge of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 12, p. 365-367, 1981.

RÖLING, W. F.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNELL, R. J.; HEAD, I. M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5537-5548, 2002.

RIVAS, B.M. **Estudo da eletro-osmose em solos residuais: desenvolvimento de equipamento e metodologia de ensaio**. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2002.

SAICHEK, R. E.; REDDY, K. R. Effect of pH control at the anode for the electrokinetic removal of phenanthrene from kaolin soil. **Chemosphere**, v. 51, p. 273-287, 2003.

SANIN, S. L. Effect of starvation on resuscitation and the surface characteristics of bacteria. **Journal of Environmental Science and Health Part A – Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. A38, p. 1517-1528, 2003.

SANIN, S. L.; SANIN, F. D.; BRYERS, J. D. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 909-914, 2003.

SAWADA, A.; TANAKA, S.; FUKUSHIMA, M.; TATSUMI, K. Electrokinetic remediation of clayey soils containing copper(II)-oxinate using humic acid as a surfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 96, p. 145-154, 2003.

SUNI, S.; ROMANTSCHUK, M. Mobilisation of bacteria in soils by electro-osmosis. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 49, p. 51-57, 2004.

SONOYAMA, N.; EZAKI, K.; SAKATA, T. Continuous electrochemical decomposition of dichloromethane in aqueous solution using various column electrodes. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p. 1-8, 2001.

SUSARLA, S.; MEDINA, V. F.; MCCUTCHEON, S. C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, v. 18, p. 647-658, 2002.

THEVANAYAGAM, S.; RISHINDRAN, T. Injection of nutrients and teas in clayey soils using electrokinetics. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 124, p. 330-338, 1998.

UNC, A.; GOSS, M. Movement of Faecal Bacteria through the Vadose Zone. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 149, p. 327-337, 2003.

WICK, L. Y.; MATTLE, P. A.; WATTIAU, P.; HARMS, H. Electrokinetic transport of PAH-degrading bacteria in model aquifers and soil. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p.4596-4602, 2004.

VADILLO-RODRÍGUEZ, V.; BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C.; VRIES, J.; NORDE, W. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, p. 33-41, 2005.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology na Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 503-549, 2003.

VAN SCHIE, P. M.; FLETCHER, M. Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5082-5088, 1999.

VIRKUTYTE, J.; SILLANPÄÄ, M.; LATOSTENMAA, P. Electrokinetic soil remediation - critical overview. **The Science of The Total Environment**, v. 289, p. 97-121, 2002.

YEUNG, A. T.; HSU, C.-N.; MENON, R. M. Physicochemical soil-contaminant interactions during electrokinetic extraction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 55, p. 221-237, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)