

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS DE VITIVINICULTURA CONTAMINADAS
COM COBRE E ÁREA DE REJEITO DE MINERAÇÃO DE COBRE**

**Robson Andreazza
(Tese de Doutorado)**

Porto Alegre (RS) Brasil
Novembro de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS DE VITIVINICULTURA CONTAMINADAS
COM COBRE E ÁREA DE REJEITO DE MINERAÇÃO DE COBRE**

ROBSON ANDREAZZA
Engenheiro Agrônomo (UFSM)
M. Sc. Ciência do Solo (UFSM)

Tese apresentada como
um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Novembro de 2009

*À minha Tia Geni Andreeza (in memorian)
pela garra, força de vontade e história de vida.
À minha esposa Simone Pieniz pelo companherismo,
ajuda, dedicação, amor e carinho em toda a nossa vida.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

Ao PPGCS pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Pesquisador Dr. George Wellington Bastos de Melo e à Embrapa Uva e Vinho pela ajuda e disposição das áreas de coleta de solo e plantas.

Ao Prof. Flávio A.O. Camargo pelo apoio, orientação, confiança e amizade.

À Prof. Zaida Inês Antonioli pelo apoio e pelo incentivo na vinda para Porto Alegre para realizar o curso de Doutorado.

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Auburn de Montgomery pela disponibilização dos Laboratórios e equipamentos.

Ao Prof. Benedict C. Okeke pela orientação, hospitalidade, amizade, confiança e principalmente pela ajuda incondicional em todos os momentos em que foi preciso.

Aos meus pais pelo amor e incentivo na realização e continuação de meus estudos.

Ao Sr. Otélio Busanello e família pela ajuda, conselhos, ensinamentos e principalmente pela amizade adquirida durante este período.

Aos bolsistas Dione Roehrs e Guilherme Siviero pela ajuda laboratorial e amizade. Especialmente, ao bolsista Marcelo Giacometti pela ajuda, amizade e companherismo desde o início de nossas atividades de pesquisa. Sem vocês não seria possível realizar todo este trabalho.

Aos Laboratoristas Valdir, Tonho e Adãozinho pela ajuda, ensinamentos, e pronta disposição para análise de minhas amostras.

Aos amigos, parceiros e colegas Leandro e Elisandra Bortolon pela ajuda e amizade marcada durante esse período especial de minha vida.

Aos colegas de curso e amigos de laboratório pela amizade e acolhida.

À minha esposa Simone, meu amor, meu lastro, minha eterna companheira pelo apoio incondicional, e por permanecer em minha vida.

BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS DE VITIVINICULTURA CONTAMINADAS COM COBRE E ÁREA DE REJEITO DE MINERAÇÃO DE COBRE ^{1/}

Autor: Robson Andreazza

Orientador: Prof. Flávio A.O. Camargo

O cobre é um micronutriente essencial que em altas concentrações pode afetar a fisiologia de microrganismos, plantas e mamíferos. Sua remoção do ambiente pode ser feita utilizando-se microrganismos e plantas resistentes. Deste modo, a avaliação de mecanismos e estratégias para a biorremediação de áreas contaminadas com cobre foi o objetivo deste trabalho. Esta avaliação foi conduzida utilizando-se como área teste, solos de regiões de vitivinicultura e de rejeito de mineração contaminadas com altas concentrações de cobre. Nestes substratos foram isolados e caracterizados bactérias resistentes ao cobre. Os isolados foram avaliados quanto as condições ótimas de crescimento, de sorver e reduzir cobre. Também foram isolados e caracterizados microrganismos do solo rizosférico de aveia preta e transagem com capacidade de sorção de cobre em meio líquido. Em relação as plantas foi avaliado o potencial de fitoextração do cobre por aveia preta e a fitoaumentação desta planta por bactérias resistentes à cobre. A biolixiviação do cobre e a comunidade microbiana responsável foi determinada utilizando diferentes substratos (solo e rejeito). Foram obtidas bactérias altamente resistentes ao cobre e com alta capacidade de remover e reduzir o Cu(II) (*Staphylococcus pasteurii* N2 e *Pseudomonas putida* NA). Estes isolados apresentaram alta capacidade de remoção do Cu(II) de solo e da água. Os isolados mais resistentes ao cobre encontrados no solo rizosférico da aveia (*P. putida* A1, *Stenotrophomonas maltophilia* A2 e *Acinetobacter calcoaceticus* A6) foram inoculados na aveia e apresentaram efeito positivo no desenvolvimento desta cultura, bem como para a remoção de cobre nos diferentes substratos testados. Foi observada a biolixiviação do cobre no solo pela microbiota natural dos substratos estimulada pela adição de H₂SO₄ e FeSO₄. A eficiência da biorremediação do cobre nos ambientes contaminados depende de vários fatores, com destaque para a seleção de organismos resistentes e eficazes na remoção e transformação do cobre. Os resultados obtidos demonstram o potencial para a utilização na remoção do cobre em áreas de vitivinicultura e áreas de rejeito de mineração de cobre.

^{1/} Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (123 f.) Novembro, 2009. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

BIOREMEDIATION OF COPPER CONTAMINATED VINEYARD AREAS AND WASTE MINING AREA ^{1/}

Author: Robson Andreazza

Adviser: Prof. Flávio A.O. Camargo

Copper is an essential micronutrient, but in high concentrations it might affect microorganisms, plants and mammals physiology. Copper removal from environment can be made using resistant microorganisms and plants. To evaluate mechanisms and strategies to bioremediation of copper contaminated areas were the aim of this study. This evaluation was conducted using as test areas, soils from vineyard areas and waste copper mining area, contaminated with high copper concentrations. In these substrates, it was isolated and characterized copper resistant bacterial isolates. The isolates were evaluated for the optimal conditions to grow, sorption and copper reduction. Also, it was isolated and characterized microorganisms from *Avena sativa* and *Plantago lanceolata* from rhizosphere region with high copper sorption capacity in liquid medium. In the plants, it was evaluated the copper phytoextraction capacity for oatmeal and the phytoaugmentation of this plant by copper resistant bacteria. Copper bioleaching and microbial community were determined using different substrates (soil and waste mining). It was obtained high copper resistant bacterial and with high Cu(II) removal and Cu(II) reduction capacity (*Staphylococcus pasteurii* N2 and *Pseudomonas putida* NA). These isolates showed high Cu(II) removal capacity from soil and water. The copper resistant isolates found in oatmeal rhizosphere soil (*P. putida* A1, *Stenotrophomonas maltophilia* A2 and *Acinetobacter calcoaceticus* A6) were inoculated into oatmeal plants and showed positive effect in the growth of these plants, as well as in copper removal in the different tested substrates. It was demonstrated copper bioleaching in the substrates by indigenous microbiota stimulated for H₂SO₄ and FeSO₄ addition. Copper bioremediation efficiency in the contaminated environments depends in many aspects as the selection of copper resistant organisms and efficiency of copper removal and transformation. Results found here present potential use for copper removal in vineyard and waste copper mining areas.

^{1 /} Doctoral Theses in Soil Science – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (123 f.) November, 2009. Research supported by CAPES and CNPq.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. CAPÍTULO I - Revisão bibliográfica.	03
2.1 Aspectos toxicológicos e dinâmica do Cobre no ambiente.....	04
2.2 Caracterização da contaminação do cobre no solo e da água.....	06
2.3 Áreas contaminadas com cobre no Rio Grande do Sul.....	07
2.4 O cobre em organismos e mecanismos de resistência.....	10
2.5 Uso de microrganismos e plantas para a remediação de cobre.....	13
2.2. Referências Bibliográficas.....	16
3. CAPÍTULO II - Caracterização de bactérias isoladas de áreas contaminadas com cobre	22
3.1. Introdução.....	23
3.2. Material e métodos.....	25
3.3. Resultados.....	29
3.4. Discussão.....	35
3.5. Conclusões.....	37
3.6. Referências bibliográficas.....	38
4. CAPÍTULO III. Sorção e redução do cu(ii) por bactérias isoladas de solos contaminados com cobre	41
4.1. Introdução.....	42
4.2. Material e métodos.....	44
4.3. Resultados.....	49
4.4. Discussão.....	56
4.5. Conclusões.....	58
4.6. Referências bibliográficas.....	59
5. CAPÍTULO IV. Isolamento e caracterização de bactérias resistentes à cobre da rizosfera de <i>Avena sativa</i> e <i>Plantago lanceolata</i>	62
5.1. Introdução.....	63
5.2. Material e métodos.....	65
5.3. Resultados.....	69
5.4. Discussão.....	74
5.5. Conclusões.....	77

5.6. Referências bibliográficas.....	78
6. CAPÍTULO V. Fitoextração e fitoaumentação de áreas contaminadas com cobre.....	80
6.1. Introdução.....	81
6.2. Material e métodos.....	84
6.3. Resultados.....	88
6.4. Discussão.....	94
6.5. Conclusões.....	97
6.6. Referências bibliográficas.....	98
7. CAPÍTULO VI. Análise da microbiota do solo por PCR-DGGE após biolixiviação de áreas contaminadas com cobre.....	100
7.1. Introdução.....	101
7.2. Material e métodos.....	103
7.3. Resultados.....	108
7.4. Discussão.....	113
7.5. Conclusões.....	117
7.6. Referências bibliográficas.....	118
	121
8. Conclusões Finais.....	
9. Resumo Biográfico.....	123

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
TABELA 2.1. Remoção do cobre por microrganismos utilizados na biorremediação de ambientes contaminados com cobre.....	14
TABELA 2.2. Utilização de plantas na fitorremediação de áreas contaminadas com cobre.....	15
CAPÍTULO II	
TABELA 3.1: Propriedades físicas e químicas dos solos vitivinícolas e rejeito de mineração de cobre.....	25
TABELA 3.2. Produção de biomassa e biorremoção de Cu(II) em culturas de isolados de solo de vitivinicultura (Cambissolo) incubados em meio CN contaminado com 300 mg L ⁻¹ de Cu(II), à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm).....	30
TABELA 3.3. Produção de biomassa e biorremoção de Cu(II) Cu(II) em culturas de isolados de solo de vitivinicultura (Neossolo) incubados em meio CN contaminado com 300 mg L ⁻¹ de Cu(II), à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm).....	31
TABELA 3.4. Produção de biomassa e biorremoção de Cu(II) em culturas de isolados de rejeito de mineração de cobre incubados em meio CN contaminado com 300 mg L ⁻¹ de Cu(II), à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm).....	32
TABELA 3.5. Identificação dos isolados de diferentes áreas contaminadas como solos de áreas vinícolas Cambissolo (C) e Neossolo (N) e áreas de rejeito de mineração de cobre baseado no rRNA da região 16S...	33
CAPÍTULO III	
TABELA 4.1. Características físicas e químicas do solo.....	48
TABELA 4.2. Efeito do pH em resistência ao Cu(II), biorredução e biorremoção pelo isolado NA.....	54
CAPÍTULO IV	
TABELA 5.1. Características químicas e físicas dos solos da rizosfera de plantas de aveia preta (Cambissolo) e transagem (Neossolo).....	66
TABELA 5.2. Identificação dos isolados da rizosfera de Aveia preta (A1, A2 e A6) e de Transagem (T5) com base no	

seqüenciamento do gene do rRNA da região 16S.....	69
---	----

CAPÍTULO V

TABELA 6.1. Características químicas e físicas dos solos: Mata Nativa, Neossolo, Cambissolo e Rejeito.....	85
TABELA 6.2. Macro e micronutrientes da massa seca da parte aérea de plantas de aveia, após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (<i>P. putida</i>); A2 (<i>S. maltophilia</i>) e A6 (<i>A. calcoaceticus</i>) em dois solos vinícolas (Neossolo e Cambissolo).....	90
TABELA 6.3. Macro e micronutrientes da massa seca radicular de plantas de aveia, após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (<i>P. putida</i>); A2 (<i>S. maltophilia</i>) e A6 (<i>A. calcoaceticus</i>) em dois solos vinícolas (Neossolo e Cambissolo).....	91

CAPÍTULO VI

TABELA 7.1: Análise química e física dos substratos utilizados, Neossolo (vitivinicultura) e rejeito de mineração de cobre.....	103
TABELA 7.2: Soluções de tratamento aplicadas nos dois substratos e períodos para a biolixiviação do cobre.....	104
TABELA 7.3. pH da solução, após a extração das soluções dos diferentes substratos (Neossolo (N) e rejeito de mineração de cobre (R)) com diferentes tratamentos....	110
TABELA 7.4. Composição das espécies identificadas referentes ao gel de PCR-DGGE do Neossolo (N) e do rejeito de mineração de cobre (R), após o período de incubação.....	111

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
FIGURA 2.1. Transporte de cobre simplificado em Procariotos (adaptado de Whiteley & Lee, 2006). Membrana externa (ME), membrana interna (MI).....	11
CAPÍTULO II	
FIGURA 3.1. Biorremocão de cobre pelos isolados selecionados. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Barras indicam o erro médio...	32
FIGURA 3.2. Biorremocão específica de cobre pelos isolados selecionados. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Barras indicam o erro médio.....	33
FIGURA 3.3. Árvore filogenética mostrando a distância evolucionária entre os isolados selecionados de três áreas contaminadas com cobre baseada na seqüência de rRNA da região 16S. O número em cada agrupamento é referente ao bootstrap de 100 repetições. A escala é o valor da distância evolucionária entre as espécies.....	34
CAPÍTULO III	
FIGURA 4.1. Produção de biomassa (A); e porcentagem de inibição (B) de sete bactérias isoladas de áreas contaminadas com cobre, incubadas em meio contendo 100 mg L^{-1} de Cu(II) (CuSO_4) à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.....	50
FIGURE 4.2. Cu(II) reduzido (A) e Cu(II) removido (B) por sete bactérias isoladas de áreas contaminadas com cobre, em meio TSB contaminado com 100 mg L^{-1} de Cu(II) (CuSO_4) e incubadas à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.....	50
FIGURA 4.3. Árvore filogenética mostrando a distância do isolado <i>Pseudomonas putida</i> NA (codificada como “sequence exported from chromatogram”) entre as bactérias relatadas baseadas no seqüência do gene da região 16S rRNA (521 nucleotídeos). A escala é o valor da distância evolucionária. O número em cada nóduo é o bootstrap de 100 repetições.....	51
FIGURA 4.4. Produção de biomassa (●), redução do Cu(II) (■), e biorremocão do Cu(II) (▲) pelo isolado NA resistente à	

	cobre em meio TSB contaminado com 100 mg L ⁻¹ de Cu(II) (CuSO ₄) e incubado à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.....	51
FIGURA 4.5.	Efeito da concentração de Cu(II) sobre a resistência ao cobre (A), biorredução do Cu(II) (B), e biorremoção do Cu(II) (C) em meio TSB à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.....	52
FIGURA 4.6.	Efeito da temperatura sobre resistência ao cobre e redução do Cu(II) (■) (A); e resistência ao cobre e biorremoção do Cu(II) (▲) (B), em meio TSB do isolado NA contaminado com 100 mg L ⁻¹ de Cu(II) (CuSO ₄) e incubado por 24 h. Produção de biomassa (●). Barras apresentam o erro médio.....	53
FIGURA 4.7.	Biolixiviação de Cu(II) do solo contaminado com 500 mg kg ⁻¹ de Cu(II) (CuSO ₄). Densidade de células em solo tratado com água (●), cobre total lixiviado em solo tratado com água (■); densidade de células em solo tratado com isolado <i>P. putida</i> NA em suspensão de células (○) e cobre total biolixiviado em solo tratado com isolado <i>P. putida</i> NA em suspensão de células (□). Barras apresentam o erro médio.....	55

CAPÍTULO IV

FIGURA 5.1.	Caracterização dos isolados quanto à resistência ao cobre dos isolados da rizosfera de transagem (T5) e aveia preta (A1, A2 e A6) em diferentes concentrações de cobre em meio líquido, quantificadas pela produção de biomassa (DO ₆₀₀). Barras apresentam o erro médio.....	70
FIGURA 5.2.	Caracterização dos isolados quanto à resistência ao cobre dos isolados da rizosfera de transagem (T5) e aveia preta (A1, A2 e A6) em diferentes temperaturas em meio líquido contaminado com 500 mg L ⁻¹ de cobre, quantificadas pela produção de biomassa (DO ₆₀₀). Barras apresentam o erro médio.....	71
FIGURA 5.3.	Efeito do pH inicial sobre os isolados da rizosfera de aveia preta (A1, A2 e A6) e transagem (T5) em diferentes pHs: 3, 5, 7, 9 e 11, quantificadas pela produção de biomassa (DO ₆₀₀) após 24 h de incubação (30°C, 150 rpm) (A); efeito do crescimento dos isolados no pH final do meio após 24 horas de incubação nos diferentes pHs em estudo (B).....	72
FIGURA 5.4.	Produção de biomassa pelos isolados da rizosfera de aveia preta (A1, A2 e A6) e transagem (T5) durante 24 horas (à 30°C, 150 rpm), quantificadas pela produção de biomassa (DO ₆₀₀) (A); porcentagem de cobre remanescente em meio líquido contendo 500 mg L ⁻¹ de cobre, durante 24 horas (B). Barras apresentam o erro médio.....	73

CAPÍTULO V

- FIGURA 6.1.** Altura de plantas de aveia após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos vinícolas (Neossolo e Cambissolo). Barras indicam é o erro médio das médias. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ($p < 0,05$)..... 88
- FIGURA 6.2.** Massa verde (MVPA) e seca da parte aérea (MSPA), massa verde (MVR) e seca radicular (MSR) de plantas de aveia, após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração de cobre (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados: A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos vinícolas (Neossolo e Cambissolo). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ($p < 0,05$)..... 89
- FIGURA 6.3.** Toxicidade de cobre em plantas de aveia (*Avena sativa*) crescidas em solo vitivinícola contaminado com cobre (Neossolo) (A); efeito dos diferentes tipos de solo contaminados com cobre (B); efeito da inoculação de isolados resistentes ao cobre (A1, A2 e A6) em solo vitivinícola contaminado com cobre (Cambissolo) (C); e efeito da inoculação de isolados resistentes ao cobre (A1, A2 e A6) em solo vitivinícola contaminado com cobre (Neossolo) (D)..... 92
- FIGURA 6.4.** Concentrações de cobre na parte aérea e radicular e cobre total extraído por plantas de aveia em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos vinícolas (Neossolo e Cambissolo). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a níveis de significância maiores que 95% ($p < 0,05$)..... 93

CAPÍTULO VI

- FIGURA 7.1.** Biolixiviação do cobre do solo de vitivinicultura (Neossolo) contaminado com cobre (mg de Cu por kg^{-1} de solo) com diferentes tratamentos: N1= H_2O , N2= HCl , N3= H_2SO_4 , N4= FeSO_4 e N5= $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$. Barras indicam o erro médio..... 109
- FIGURA 7.2.** Biolixiviação do cobre de rejeito de mineração de cobre (mg de Cu por kg^{-1} de solo) com diferentes tratamentos: R1= H_2O , R2= HCl , R3= H_2SO_4 , R4= FeSO_4 e R5= $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$. Barras indicam o erro médio..... 109
- FIGURA 7.3.** Perfis dos géis de DGGE. Foto 1: bandas (A, B, C e D)

	nas amostras dos tratamentos em Neossolo (N); Foto 2: bandas (A e B) nas amostras dos tratamentos em rejeito de mineração de cobre (R).....	110
FIGURA 7.4.	Árvore filogenética mostrando o agrupamento evolucionário entre os organismos identificados das bandas extraídas dos géis de PCR-DGGE de Neossolo de área de vitivinicultura (N) e área de rejeito de mineração de cobre (R) baseados na seqüência do gene do RNA ribossomal da região 16S. O comprimento da seqüência de nucleotídeos utilizadas foi entre 165 e 184 bases de ácidos nucléicos.....	112

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cobre é um micronutriente essencial para todos os seres vivos, porém em grandes concentrações pode causar sérios problemas à saúde. Este micronutriente está presente naturalmente no solo, e pode, em elevadas concentrações, exercer efeitos negativos nas diversas formas de vida, causando poluição dos ecossistemas. Áreas de vitivinicultura são áreas com contaminação potencial de cobre, devido a sua intensa e contínua aplicação de produtos agrícolas contendo este elemento em sua formulação. Áreas de rejeito de mineração de cobre também são áreas de grande risco a saúde dos seres vivos, pois são extensões com altas concentrações de cobre e com potencial para a contaminação de áreas adjacentes.

Para os seres humanos, a contaminação com cobre leva a graves complicações à saúde, podendo causar câncer e até mesmo a morte. Para organismos como plantas, fungos e bactérias, altas concentrações de cobre promovem uma pressão de seleção, mantendo somente os organismos resistentes neste local contaminado. Essa pressão de seleção pode ser utilizada para selecionar organismos resistentes a estas condições, para testá-los posteriormente quanto ao seu uso potencial para a biorremediação.

A biorremediação de áreas contaminadas com cobre, como áreas de vitivinicultura e áreas de rejeito de mineração de cobre, pode ser uma alternativa viável para a recuperação destas áreas. Para isto é necessário ser avaliado a utilização de organismos vivos resistentes com eficiência e baixo custo. Contudo, é necessário o isolamento de microrganismos resistentes e eficazes na remoção do cobre, bem como na transformação deste elemento em formas mais biodisponíveis para a biorremediação. A seleção destes microrganismos resistentes ao cobre torna-se fundamental, pois nesta fase é necessário que se selecione organismos resistentes, com características

favoráveis a biorremediação, que sejam eficientes para esta função. Estes microrganismos resistentes também podem se tornar úteis quando testados e utilizados na reintrodução em espécies vegetais que crescem nestas áreas contaminadas com cobre. Espécies vegetais podem ser utilizadas para a remoção ou estabilização destas áreas, desde que previamente estudadas e selecionadas para a resistência nestes ambientes. Com base na hipótese estabelecida acima, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar mecanismos e estratégias para o uso de microrganismos e de plantas para a remediação de áreas contaminadas com cobre.

CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica

COBRE NO SOLO E USO DE MICRORGANISMOS E PLANTAS PARA A REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS

2. CAPÍTULO I – Revisão bibliográfica

2.1 Aspectos toxicológicos e dinâmica do cobre no ambiente

O cobre é um elemento essencial a todos os seres vivos, inclusive aos humanos, pois atua como co-fator de uma série de metaloenzimas envolvidas na formação da hemoglobina e no metabolismo de carboidratos, xenobióticos e drogas, bem como nos mecanismos de antioxidação celular. O cobre é rapidamente absorvido no estômago e no intestino, tendo sua concentração controlada no organismo por um mecanismo de homeostase que envolve a indução e síntese de metalotioneínas. Apesar deste mecanismo prevenir parte da toxicidade de cobre, a exposição em níveis excessivos pode resultar em vários efeitos à saúde, incluindo danos ao fígado e ao rim, anemia, imunotoxicidade e desenvolvimento da toxicidade. A maioria destes efeitos está relacionada com o papel do cobre na oxidação das membranas ou de macromoléculas, bem como na ligação do grupo sulfidril de algumas enzimas envolvidas na proteção celular aos radicais livres. O sintoma mais comum relacionado à exposição de altas concentrações de cobre é a disfunção intestinal, seguida de náusea, vômito e dor abdominal. A exposição ao cobre também irrita o aparelho respiratório, com aparecimento de tosse, espirro, fibrose pulmonar, aumento da vascularidade da mucosa nasal, entre outros sintomas. Em casos de super exposição ao cobre e de outros elementos têm sido constatado o risco de câncer de pulmão e de estômago (ATSDR, 2004).

Produtos e resíduos contendo cobre estão presentes em inúmeras atividades agrícolas, urbanas e industriais, com grande potencial para a contaminação do solo e da água. Entre as atividades específicas com potencial poluidor, destacam-se as áreas de mineração de cobre, áreas de rejeito de mineração, lodo de esgoto, dejetos de suínos, resíduos industriais e a vitivinicultura.

Com o acúmulo do cobre na camada superficial do solo, o risco da poluição ambiental, principalmente da água, é maior e a concentração excessiva de cobre pode provocar toxidez às plantas, animais, microrganismos e ao homem. Nas plantas, as concentrações excessivas de cobre têm causado manchas foliares, evoluindo para necrose das folhas, desfolhamento precoce e diminuição do crescimento (Filho, 2005). Estes sintomas estão diretamente relacionados com a redução da produção de raízes, e conseqüente diminuição da capacidade de absorção de água e de nutrientes (Panou-Filotheou et al., 2001). Para a maioria dos animais, a ingestão continuada de cobre em quantidades maiores que a necessidade nutricional, conduz a um acúmulo gradativo do elemento em vários tecidos, principalmente no fígado, e pode causar intoxicação. A capacidade de acumular cobre nos tecidos varia muito com a espécie animal e, inclusive, com as raças dentro da mesma espécie. Para o homem, a ingestão de doses excessivamente altas de cobre pode causar intoxicações com lesões no fígado, como também irritação e corrosão da mucosa, danos capilares generalizados, problemas hepáticos, renais e irritação do sistema nervoso central, seguido de depressão e risco de câncer (ATSDR, 2004).

Assim como os demais organismos eucariotos, os microrganismos eucariotos (fungos, principalmente) também são afetados pelo cobre e esse fato tem sido levado em consideração no caso do controle de microrganismos patogênicos. Entretanto, as células procarióticas são mais resistentes e toleram elevadas concentrações de cobre no meio. Estas células possuem um mecanismo de resistência ao cobre (homeostase do cobre), que envolve a presença de quatro genes arranjados no operon *cop*. Além disso, a homeostase também pode ser controlada pela atividade de metalotioneínas e chaperons, que retém o cobre no citosol (Arredondo & Núñez, 2005). Por este motivo, é possível supor que o uso de microrganismos tolerantes ao cobre e dos genes envolvidos nesta resistência a altas concentrações possam ser útil para o estabelecimento de estratégias para a remoção deste metal do solo contaminado para níveis considerados adequados pela legislação ambiental e para as concentrações originais de cobre no solo.

2.2 Caracterização da contaminação do cobre no solo e da água

O cobre é um micronutriente essencial para as plantas, mas também é um metal pesado. A alta concentração de cobre na solução do solo pode ser tóxica aos organismos, como microrganismos, plantas, animais e homens. O teor natural de cobre em solos é muito variável, dependendo da rocha matriz e da intensidade dos processos de formação do solo (físico-químico e biológico) sobre a rocha e está predominantemente associado à fase sólida do solo. As formas solúveis e trocáveis representam menos que 10% do teor total do cobre em solos e, normalmente são encontrados teores entre 1 a 3%. Na litosfera o teor médio total é de 70 mg kg^{-1} , no solo varia de 2 a 100 mg kg^{-1} e nas águas superficiais as concentrações são menores que $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ (King, 1996; CETESB, 2006). As principais fontes antropogênicas de cobre no solo são a mineração e o beneficiamento de seus produtos, a queima de combustíveis fósseis, aplicação de defensivos, corretivos, fertilizantes agrícolas, lodos de esgotos (urbanos ou industriais), águas residuais e de resíduos industriais. Se uma ou várias dessas fontes são utilizadas de modo continuado para fins agrícolas podem causar o acúmulo do elemento no solo (Martins, 2005).

O cobre é influenciado pelas seguintes propriedades do solo: pH, potencial redox, textura, composição mineral (conteúdo e tipos de argilas e de óxidos de Fe, Al e Mn), CTC, quantidade e tipo de componentes orgânicos no solo e na solução, presença de outros metais pesados, temperatura do solo, conteúdo de água e outros fatores que afetam a atividade microbiana (Adriano, 1986). Os três principais modos de retenção do cobre no solo são: adsorção nas superfícies das partículas minerais, complexação por substâncias húmicas em partículas orgânicas e reações de precipitação (Khan & Scullion, 2000). A adsorção do cobre pode ser definida como o acúmulo do elemento na interface entre a superfície sólida e a solução adjacente (Sposito, 1989). No solo, a adsorção é o principal processo para o entendimento da disponibilidade do cobre, pois indica a solubilidade, a mobilidade e a disponibilidade para as plantas. Deste modo, nos estudos dos fenômenos de adsorção, as isotermas descrevem a relação entre o cobre adsorvido (adsorvato) pelo sólido (adsorvente) e a concentração do cobre na solução em equilíbrio (Shuman, 1975).

A matéria orgânica (MO) possui grande superfície específica, carga líquida negativa dependente do pH do meio e capacidade de formar quelatos orgânicos (Sposito, 1989). Devido a este motivo, em solos cujos teores são elevados, o cobre é complexado em formas orgânicas insolúveis, permanecendo indisponível ou não causando toxidez para as plantas (Bertoncini & Mattiazzo, 1999). Os principais responsáveis pela ligação do cobre com a MO são os ácidos húmicos e fúlvicos, formando complexos estáveis. A habilidade destes ácidos em formar complexos estáveis com íons metálicos pode ser atribuída ao seu alto conteúdo de grupos funcionais contendo oxigênio como carboxílicos, hidroxílicos, fenólicos e alcoólicos (Stevenson, 1995). Em solos do RS cultivados há mais de 15 anos com videira tratada com fungicida cúprico, verificou-se que mais de 70% do cobre estava associado a MO (Nogueirol et al., 2005). A fração de cobre mais importante para as plantas é na forma catiônica (Cull). A concentração de cobre nesta forma na solução do solo é muito baixa devido ao valor do pH do solo e à afinidade do elemento pelos compostos orgânicos. A disponibilidade do cobre diminui com o aumento do pH do solo. É provável que o cobre forme hidróxidos e estes precipitem quando o pH do solo for maior que 7,0 (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Portanto, o pH e a MO são os principais fatores que afetam, direta e indiretamente, a disponibilidade de cobre no solo (Yin et al, 2002).

O uso prolongado de alguns defensivos agrícolas tais como os fungicidas, inseticidas e herbicidas com princípio ativo à base de sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre e outros, pode promover o acúmulo deste metal no solo, além de contaminar a cadeia trófica e reduzir a produção de culturas agrícolas (López–Mosquera et al., 2000; Santos et al., 2004).

2.3 Áreas contaminadas com cobre no Rio Grande do Sul

No estado do Rio grande do Sul, a contaminação de elevadas concentrações de cobre ocorrem na serra do nordeste, nas áreas de vitivinicultura, e na serra do sudeste, nas áreas de mineração de cobre. Em relação a produção nacional de uvas, o Rio Grande do Sul é o principal produtor e a cultura tem grande importância econômica e social, pois sua

produção se concentra na região da Serra Gaúcha, sendo cultivada em pequenas propriedades, de topografia fortemente ondulada à montanhosa e com mão-de-obra familiar. Como os vinhedos estão situados em áreas íngremes, existe maior probabilidade de ocorrer erosão hídrica, principalmente quando não são utilizadas práticas de conservação do solo. Uma grande diversidade de espécies está sendo utilizada para proteger os solos dos parreirais, mas o manejo inadequado tem causado o aumento da erosão do solo, devido à topografia da região. Outro fator que contribui para redução da produtividade dos parreirais é a ocorrência de doenças e pragas, principalmente na região tradicional de cultivo, promovendo o aumento do uso de produtos fitossanitários à base de cobre. Esses problemas podem estar direta ou indiretamente associados ao manejo do solo, da cobertura verde, da suas interações e da contaminação do solo e da água.

A videira é uma cultura que apresenta grande incidência de doenças. Entre as mais importantes está o míldio, ou mofo, causado pelo fungo *Plasmopara viticola*. Existem vários produtos recomendados para a prevenção e eliminação do míldio. Todavia, os produtores utilizam ainda em grande escala a calda bordalesa [$\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$] - mistura de sulfato de cobre e cal, diluídos em água) como fungicida preventivo da doença (Murayama, 1980). Embora seja um fungicida de uso relativamente antigo, é considerado um dos produtos mais eficientes no combate de algumas doenças de plantas, principalmente das frutíferas. Assim, a utilização continuada de calda bordalesa nas áreas de vitivinicultura para o controle de doenças fúngicas promove o acúmulo de cobre nos solos. O teor de cobre nos solos pode atingir níveis muito elevados, o que prejudica o desenvolvimento e a produção das plantas de cobertura. Conforme Kabata-Pendias & Pendias (2001), o teor de cobre maior que 100 mg kg^{-1} no solo é considerado excessivo e pode ocorrer fitotoxidez. Plantas de aveia cultivadas com adição de doses crescentes de cobre apresentaram grande redução do crescimento e desenvolvimento na dose de $100 \text{ mg de cobre kg}^{-1}$ de solo (Santos et al., 2004). Nos solos da região existem levantamentos que demonstram a presença de mais de $1200 \text{ mg de cobre kg}^{-1}$ de solo.

As áreas de rejeito de mineração de cobre do Estado do Rio Grande do Sul estão localizadas na Microbacia do Arroio São João. As minas do

Camaquã são formadas por mineralizações sulfetadas de cobre em rochas sedimentares. A jazida situa-se na porção central do Estado do Rio Grande do Sul, no município de Caçapava do Sul, 300 km à oeste de Porto Alegre. A mina foi descoberta em 1865 e representou durante mais de um século o principal depósito metálico do sul do país, exaurindo-se em 1996. Durante esse período, houve vários ciclos intermitentes de exploração do minério de cobre e boa parte dos efluentes e rejeitos foram lançados diretamente no arroio São João (Laybauer, 1998), tornando desta forma, um ambiente contaminado e potencialmente tóxico aos seres vivos. Além do mais, a atividade de mineração de cobre aumenta os teores naturais de Cu, Fe, Al e Zn, assim como nos valores de pH, condutividade elétrica e sólidos em suspensão na água. O impacto desta atividade é evidenciado tanto pelo acréscimo significativo das concentrações médias, quanto por altos valores de dispersão na região sob influência da mineração, o que é característico da influência antrópica (Laybauer, 1995; 1998), produzindo também, grandes quantidades de rejeito de mineração com alto potencial de contaminação ao ambiente.

Com relação ao rejeito de mineração, apesar de apresentar pouca umidade (baixa capacidade de campo), tem baixa condutividade hidráulica, em razão da sua elevada quantidade de areia fina, que teria reduzido a macroporosidade, dificultando a percolação da água (Laybauer, 1998). Isto também é encontrado em rejeito de mineração de ferro. Um resíduo com alta limitação química e física para a sua revejetação, devido aos baixos teores de macro e micronutrientes, alta densidade do solo e baixa retenção de água (Silva et al., 2006). As áreas de rejeito de mineração de cobre apresentam um alto potencial na contaminação de seres vivos e também de áreas adjacentes. Somado as características físicas e químicas deste rejeito torna-se uma área de difícil recuperação mas com possibilidade de remediação utilizando-se sistemas biológicos.

2.4 O cobre em organismos e mecanismos de resistência

A grande maioria dos microrganismos necessita do cobre em pequenas quantidades, mas podem ser afetadas pela superexposição a este metal. Para manejar com este problema, os organismos desenvolveram mecanismos de

resistência para sobreviver em ambientes, tanto limitantes em cobre, como em concentrações tóxicas às células. A homeostase das células procarióticas é conferida por quatro genes arranjados no operon *cop*. Este operon possui um sistema de regulação gênica que é expresso em função da quantidade de cobre na célula. O gene *copA* capta o cobre quando o cobre é limitante e transporta para o citoplasma, ao passo que o *copB* remove o cobre de dentro das células quando há concentrações tóxicas. O gen *copY* é o gen repressor e regula a concentração de cobre na célula (Solioz & Stoyanov, 2003). O mecanismo de proteção das células ao cobre é feito pelo gene *copY* que reprime as ATPases *copA* e *copB*, diminuindo o transporte deste elemento para o citoplasma, evitando a morte celular pela exposição a concentrações tóxicas de cobre (Figura 2.1). O cobre só pode ser transportado pelas ATPases quando está na forma reduzida Cu(I), e deste modo, as células necessitam de enzimas como a cobre redutase para reduzir o Cu(II), disponibilizando o cobre para o transporte intracelular (Solioz & Stoyanov, 2003). A enzima cobre redutase é codificada pelo gene *ndh* em *Escherichia coli*, e foi demonstrado que a redução do cobre pode ocorrer em dois sítios. No sítio I, o cobre é reduzido entre NADH e quinona, e no sítio II, entre quinonas e citocromo *bo* e *bd* no ciclo do cobre (Montelongo et al., 2006). A enzima redutase de cobre pode estar associada a mecanismos do transporte de cobre, provavelmente quando o microrganismo cresceu em concentrações elevadas do metal. A homeostase do cobre celular pode ser controlada pela atividade das metalotioneínas e chaperonas, que retém o íon cobre não livre no citosol (Arredondo & Núñez, 2005).

Bactérias podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência ao cobre, tanto no cromossomo como no plasmídeo contendo genes de resistência a concentrações tóxicas de cobre. Estes mecanismos também incluem a redução do transporte do cobre, complexação pelos componentes celulares e acúmulo de concentrações de cobre internamente na célula. Similarmente às bactérias, os fungos podem desenvolver vários mecanismos de resistência ao cobre, como engrossamento da parede celular, a redução de citosina e quitina e o aumento da proporção de metalotioneínas (Cervantes & Corona, 1994). Alguns destes plasmídeos já foram identificados como o plasmídeo R124 de *E. coli* que codifica a repressão da síntese da proteína

OmpF e o plasmídeo Rts1 que reduz a acumulação do cobre (Rossow & Rowbury, 1984). O plasmídeo pVT1 isolado de *Mycobacterium scrofulaceum* precipita sulfato de cobre (Erardi et al., 1984) e o plasmídeo o pPT23 isolado de *Pseudomonas syringae* forma quelatos de proteínas com cobre (Bender & Cooksey, 1986), entre outros.

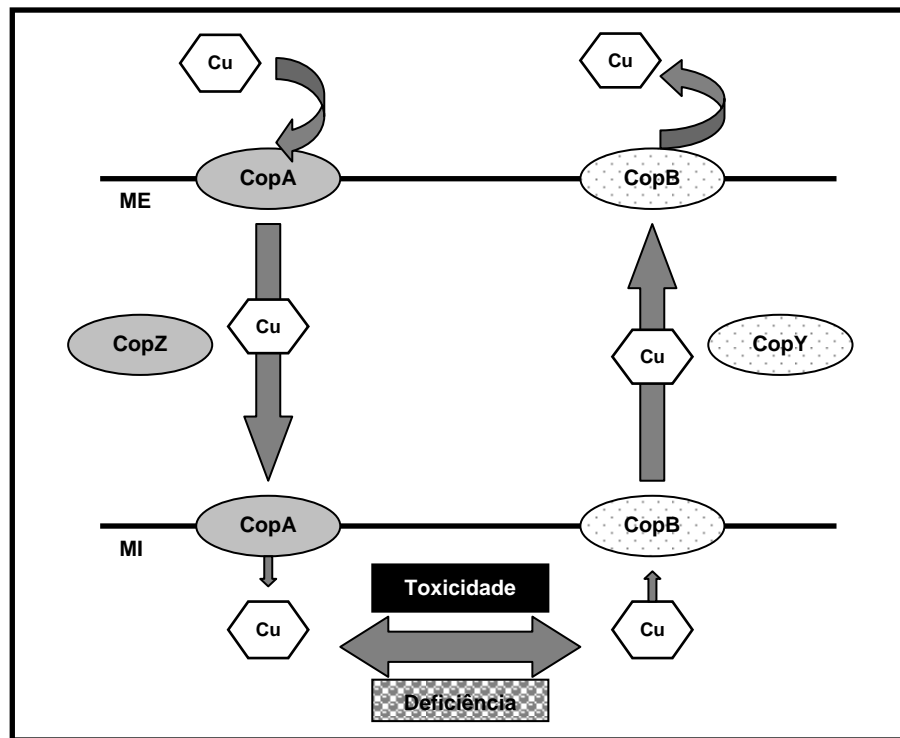


FIGURA 2.1. Transporte de cobre simplificado em Procariotos (adaptado de Whiteley & Lee, 2006). Membrana externa (ME), membrana interna (MI).

Altas concentrações de íons de cobre no ambiente exercem uma pressão de seleção aos organismos, promovendo a sobrevivência de microrganismos que tenham determinantes genéticos para a resistência ao metal (Cervantes & Corona, 1994). Como exemplos, a bactéria *Desulfovibrio* spp. complexa o cobre pela produção de sulfato, reduzindo o potencial tóxico do cobre para a bactéria (Temple & Leroux, 1964), ao passo que a *Klebsiella pneumoniae* tem uma adaptação transitória fisiológica (Baldry et al., 1977), a *Escherichia coli* tem um aumento de proteínas na membrana, provavelmente envolvendo o transporte do cobre (Luktenhaus, 1977), as cianobactérias formam complexos de cobre com metalotianeínas (Olafson, 1986) e o *Vibrio alginolyticus* forma complexos do cobre com proteínas excretadas (Harwood-Sears & Gordon, 1990). De modo geral, o potencial de uso dos mecanismos

de resistência ao cobre conferido pelos microrganismos é muito grande e podem ser estratégias adequadas para a remoção do cobre de ambientes contaminados.

Em relação às plantas, o cobre é um mineral essencial para o crescimento, participando da síntese de proteínas, do metabolismo de carboidratos e da fixação simbiótica de N_2 (Marschner, 1995). O cobre é absorvido pelas plantas como íon $Cu(II)$ ou como quelato e geralmente é pouco móvel na planta. A concentração nas plantas não é tão expressiva e varia entre 2 à 20 mg kg^{-1} na matéria seca. Concentrações mais elevadas podem ser tóxicas para algumas plantas como o citros e leguminosas (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). O excesso de cobre leva a um menor desenvolvimento das raízes, diminuição da absorção de água e de nutrientes. A tolerância das plantas ao cobre está associada ao acúmulo deste nas raízes e a restrição do seu transporte para a parte aérea (Mantovani, 2009).

Eucariotos como fungos, algas e plantas são mais sensíveis à toxidez de cobre, comparadas às bactérias que além da homeostase, apresentam outro mecanismo de resistência que é a expressão de uma família de proteínas queladoras de metais chamadas de metalotioneínas (Camargo et al., 2007). Estas proteínas são sintetizadas especificamente para ligar-se a metais e são induzidas pela presença dos mesmos (Mejare & Bülow, 2001). Dentre essas moléculas, a produção de metalotioneínas ou de fitoquelatinas constitui o principal mecanismo de resistência a metais em eucariotos.

Metalotioneínas são pequenos peptídeos (6 - 7 kDa), ricos em cisteína, encontradas em animais, plantas, microrganismos eucariotos e alguns procariotos. A biossíntese de metalotioneínas é regulada em nível de transcrição e é induzida por vários fatores, como hormônios, agentes citogênicos e metais, incluindo o Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni e Bi. As metalotioneínas são divididas em três diferentes classes de acordo com o conteúdo de cisteína e da estrutura peptídica (Hamer, 1986). As metalotioneínas produzidas por mamíferos compreendem a classe I e são compostas de cerca de 61 aminoácidos, sendo 35 % de cisteínas, com dois domínios distintos, que podem coordenar sete metais divalentes e 12 monovalentes. As metalotioneínas produzidas por leveduras, cianobactérias e algumas plantas pertencem à classe II e são também de baixo peso molecular

e ricas em cisteína, que, diferentemente daquelas da classe I, apresentam distribuição diferenciada das cisteínas na estrutura protéica. Os membros da terceira classe de metalotioneínas são responsáveis pela formação de complexos metálicos com metais pesados em plantas e, usualmente, chamadas de fitoquelatinas (Zenck, 1996). A biossíntese das fitoquelatinas é induzida por vários metais como o Cd, Hg, Ag, Cu, Ni, Au, Pb e Zn, sendo o Cd o maior indutor.

2.5 Uso de microrganismos e plantas para a remoção de cobre

A biorremediação é uma estratégia que combina processos biotecnológicos com a engenharia ambiental, aplicada para solucionar ou atenuar os problemas causados pela contaminação ambiental. É definida como a aplicação de processos biológicos à conversão de contaminantes ambientais em substâncias inertes. Geralmente, a remediação de ambientes contaminados por meio de métodos químicos e físicos é de custo elevado e de pouca eficiência e geralmente geram produtos secundários que necessitam de tratamento adicional. O uso de organismos (microrganismos ou plantas) ou de seus processos para atenuar ou remover um contaminante ambiental é uma alternativa de baixo custo, eficiente e ecologicamente aceitável. Para a adoção da biorremediação como prática, devem ser obedecidos alguns critérios como: a) o organismo a ser escolhido deve possuir habilidade catabólica para degradar o contaminante para níveis abaixo do recomendado como mínimo pela legislação; b) o contaminante deve estar biodisponível; c) o solo deve apresentar condições satisfatórias para manter o crescimento de microrganismos, plantas e atividade de enzimas; d) o custo da biorremediação deve ser menor do que as demais tecnologias para remover o contaminante. A biorremediação de metais é mais complexa que a de compostos orgânicos, uma vez que metais não se degradam quimicamente e/ou biologicamente. Todavia, a biorremediação de áreas contaminadas com cobre pode ser possível em função das estratégias a serem adotadas (Camargo et al., 2007).

Inicialmente é necessária a seleção de organismos tolerantes ao cobre e a identificação de mecanismos de resistência. Isso é possível de ser obtido em áreas contaminadas que podem ter pré-selecionado organismos resistentes em função da exclusão exercida pela presença de cobre em concentrações tóxicas (Atlas & Bartha, 1997). Desta forma tem sido possível

isolar, por exemplo, microrganismos tolerantes até 6000 mg kg⁻¹ de cobre (Umrana, 2006). As estratégias para a remoção de metais podem envolver a biossorção (uso de biomassa viva ou morta, livre ou imobilizada, onde os organismos podem estar absorvendo ou adsorvendo o metal), precipitação (em presença de sulfetos solúveis), complexação (na parede ou em materiais extracelulares) e enzimas (redução ou oxidação do metal para formas menos tóxicas ou atóxicas), entre outras (Camargo et al., 2007).

Em relação ao cobre, existe uma série de resultados que indicam o potencial do uso de microrganismos para a remoção/imobilização deste metal (Tabela 2.1). Os microrganismos resistentes até 6000 mg kg⁻¹ de cobre, descritos por Umrana (2006) absorveram 97,5% do cobre nesta concentração e foi verificado que o mecanismo de resistência estava relacionado à adsorção e compartimentalização do cobre dentro da célula. Alguns organismos podem ser grandes acumuladores de cobre dentro da célula, como no caso da *Pseudomonas syringae* que pode acumular cerca de 120 mg de cobre (12%) por grama de massa seca celular (Cooksey & Azad, 1992), podendo ser uma alternativa de remoção do cobre do ambiente. Quando estudado a sorção de cobre por bactérias da rizosfera de trigo, foram isoladas as bactérias *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., e foi demonstrado que o *Bacillus* adsorveu mais Cu(II) e Mn(II) do que a *Pseudomonas* em todas as concentrações estudadas desse metal. O maior tempo de exposição aos metais implicou em maior sorção de cobre pelos isolados (Voss & Thomas, 2001).

TABELA 2.1. Remoção do cobre por microrganismos utilizados na biorremediação de ambientes contaminados com cobre.

Microrganismo	Mecanismo	[Cu] Inicial	[Cu] Final	Referência
		----- mg L ⁻¹ -----		
<i>P. putida</i> PCZ1	adsorção	31,75	23,81	Chen et al., 2009
<i>P. putida</i> NA	sorção	300	189	Capítulo III
<i>P. putida</i> NA	redução	300	190	Capítulo III
<i>S. pasteurii</i> N2	sorção	300	218	Capítulo II
<i>B. pumilis</i> N11	sorção	300	227	Capítulo II
<i>P. aeruginosa</i> AT18	adsorção	5	4,75	Silva et al., 2009
<i>P. syringae</i>	sorção	1000	880*	Cooksey & Azad, 1992
<i>Penicillium simplicissimum</i>	sorção	1000	892*	Li et al., 2008
<i>Candida</i> sp.	sorção	708	610,4	Donmez & Aksu, 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sorção	291,2	253,3	Donmez & Aksu, 1999
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	sorção	488	438,2	Donmez & Aksu, 1999
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	sorção	101,3	90,4	Donmez & Aksu, 1999
<i>Pseudomonas</i> sp.	sorção	127	126,9*	Choudhary & Sar, 2009

*Valores calculados em mg de cobre por g de massa seca (mg g⁻¹).

Como na biorremediação de áreas contaminadas são utilizados organismos vivos, as condições ambientais são essenciais para o crescimento destes organismos. Entre as condições ambientais que influenciam a redução microbiológica do cobre, destacam-se o pH, a temperatura, a concentração do metal pesado e a quantidade de inóculo resistente (Shakoori et al., 2000; Camargo et al., 2003; 2004a; 2004b; Capítulo III), o solo, a água de irrigação, a quantidade de matéria orgânica e os óxidos mangânicos (Cifuentes et al., 1996). Além disso, as enzimas também são sensíveis às condições ambientais, como os microrganismos.

A fitorremediação é um processo de biorremediação que utiliza plantas para remover metais pesados do ambiente pela absorção, acumulação ou transformação do metal em sua biomassa vegetal, sendo uma ferramenta que pode ser usada para a remediação de áreas contaminadas com metais pesados (Tabela 2.2). Algumas espécies vegetais podem ter maior ou menor tolerância aos metais pesados existentes no solo (McCutcheon & Schnoor, 2003), sendo necessária a seleção de espécies vegetais para avaliar o maior potencial para absorver estes metais do solo. Com base nisto, Coates (2005) avaliou o potencial de 16 espécies arbóreas para a fitorremediação de metais pesados da água escoada de antigas minas de cobre no Peru. Observou que somente três delas foram eficientes para o crescimento e produção de massa vegetal irrigado com o líquido remanescente da mina. A espécie *Tamarix aphylla* foi a que obteve melhores resultados de crescimento e produção de massa entre todas as espécies estudadas nas condições deste trabalho.

TABELA 2.2. Utilização de plantas na fitorremediação de áreas contaminadas com cobre.

Planta	Cu(II) no solo	Cu(II) na fitomassa	Referência
	----- mg kg ⁻¹ -----		
<i>Trifolium repens</i>	1000	850	Wang et al., 2008
<i>Elsholtzia splendens</i>	1000	3200	Wang et al., 2008
<i>Elsholtzia splendens</i>	237	550	Chen et al., 2005b
<i>Elsholtzia splendens</i>	317	490	Chen et al., 2006
<i>Trifolium repens</i>	317	360	Chen et al., 2006
<i>Rumex japonicus</i>	1044	185,6	Ke et al., 2007
<i>Brassica juncea</i>	150	188	Ma et al., 2009
<i>Withania somnifera</i>	12,7	463	Khatun et al., 2008
<i>Glycine max</i>	23	130,9	Murakami & Ae, 2009
<i>Oryza sativa</i>	23	49,1	Murakami & Ae, 2009

Algumas espécies vegetais são mais resistentes e podem ter uma maior capacidade de extração de metais pesados como o cobre, quando em comparação a outras espécies. Uma planta com alta capacidade de extração de cobre é a *Elsholtzia splendens*, pois reduziu em 30% a quantidade de cobre na rizosfera em comparação aos teores iniciais do solo contaminado, associado a uma grande produção de fitomassa neste ambiente (Jiang et al., 2004). A aveia preta é uma planta de alta produção de massa e boa produção de grãos (Santos et al., 2004). Devido à grande produção de massa vegetal, a aveia preta pode ser uma alternativa para a fitorremediação.

A fitorremediação pode apresentar baixa eficiência na remoção dos metais pesados do solo. Esta limitação pode ser diminuída quando é utilizada juntamente com alternativas que envolvam o estímulo a microbiota rizosférica da planta, podendo ser uma estratégia mais eficaz a médio e longo prazo para a biorremediação *in situ* de locais contaminados com metais pesados (Khan et al., 2000). A rizosfera é um ambiente diferenciado no solo, pois as plantas modificam o ambiente em vários aspectos de concentrações de nutrientes, pH, temperatura e exsudatos radiculares como ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Moreira & Siqueira, 2006). A rizosfera também é o local onde há maior contato entre planta e solo, agindo diretamente na absorção de nutrientes e metais pesados pela planta. A absorção das plantas é fortemente influenciada pelo pH, e também é afetada pela presença de cálcio e manganês, pois estes dois elementos competem pelo sítio de ligação com o cobre (Pedler & Parker, 2002). Os organismos que estão localizados na região da rizosfera podem melhorar ou aumentar a absorção e a biodisponibilidade de metais pesados, como o Cu e Zn que estão contaminando o solo, retirando estes metais pela solução do solo (Chen et al., 2005a). Alguns destes organismos podem ser os fungos micorrízicos arbusculares e algumas bactérias promotoras de crescimento, favorecendo o crescimento de plantas hiperacumuladoras como a *Elsholtzia splendens* (Khan, 2005).

2.6 Referências bibliográficas

- ADRIANO, D. C. 1986. **Trace elements in the terrestrial environment**. Springer Verlag, New York, 1986. 533p.
- ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M.T. Iron and copper metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, Amsterdam, v.26, p.314–328, 2005.

- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4^oED, Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park. 1997, 694p.
- ATSDR, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Toxicological profile for copper. 2004. 314p.
- BALDRY, M.G.C.; HOGARTH, D.S.; DEAN, A.C.R. Chromium and copper sensitivity and tolerance in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. 1977. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- BENDER, C.L.; COOKSEY, D.A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance (1986). In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- BERTONCINI, E.I.; MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. Lixiviação de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.23, n.3, p.737-744, 1999.
- CAMARGO, F.A.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.32, p.1228-1233, 2003.
- CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by an Actinomycete, *Arthrobacter crystallopoietes* ES 32. **Biological Trace Element Research**, Washington, v.97, p.183-194, 2004a.
- CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by immobilized cells and the cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.8, p.23-30, 2004b.
- CAMARGO, F.A.O., BENTO, F.M., JACQUES, R.J.S., ROESCH, L.F.W., FRANKENBERGER, W.T. Uso de microrganismos para a remediação de metais. **Tópicos Especiais em Ciência do Solo**, Viçosa, v.5, p.467-496, 2007.
- CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- CETESB (2006). **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 09 jun. 2007.
- CHEN, X.C.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; SHI, J.Y.; WU, W.X.; CHEN, Y.X. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.46, p.101-107, 2005a.
- CHEN, Y.X.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; LUO, Y.M. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. **Environment International**, Witherslack, v.3, p.861-866, 2005b.
- CHEN, Y.X.; WANG, Y.P.; WU, W.X.; LIN, Q.; XUE, S.G. Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.356, p.247-255, 2006.
- CHEN, X.C.; HU, S.P.; SHEN, C.F.; DOU, C.M.; SHI, J.Y.; CHEN, Y.X. Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.100, p.330-337, 2009.

- CHOUDHARY, S.; SAR, P. Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+}) sequestration. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.100, p.2482-2492, 2009.
- CIFUENTES, F.R.; LINDERMANN, W.C.; BARTON, L.L. Chromium sorption and reduction in soil with implications to bioremediation. **Soil Science**, New York, v.161, n.4, p.233-241, 1996.
- COATES, W. Tree species selection for a mine tailands bioremediation Project in Peru. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v.28, p.418-423, 2005.
- COOKSEY, D.A.; AZAD, T.T.R. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic pseudomonas. 1992. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- DONMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v.35, p.135-142, 1999.
- ERARDI, F.X.; FAILLA, M.I.; FALKINHAM III, J.D. Plasmid-encoded copper resistance and precipitation by *Mycobacterium scrofulaceum*. 1984. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- FILHO, H. G. **Cobre na planta**. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas. Departamento de Recursos Naturais. Área de Ciência do Solo. 2005. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/intranet/arquivos/helio/Cu>>. Acesso em: 15 agosto de 2007.
- HAMER, D.H. Metallothionein. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, p.913-951, 1986.
- HARWOOD-SEARS, V.; GORDON, A.S. Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. 1990. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- JIANG, L.Y.; YANG, X.E.; HE, Z.L. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. **Chemosphere**, Netherlands, v.55, p.1179-1187, 2004.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3^oED. Boca Raton, CRC Press, 2001. 413p
- KE, W.; XIONG, Z.T.; CHEN, S.; CHEN, J. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. **Environmental and Experimental Botany**, Pergamon, v.59, p.59-67, 2007.
- KHAN, M.; SCULLION, J. Effect of soil on microbial responses to metal contamination. **Environmental Pollution**, Witherslack, v.110, n.1, p.115-125, 2000.
- KHAN, A.G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Amsterdam, v.18, p.355-364, 2005.
- KHATUN, S.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Environmental and Experimental Botany**, Netherlands, v.64, p.279-285, 2008.

- KING, L.D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V.H.; FONTES, L.E.T.; FONTES, M.P.F. (Eds.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa : SBCS, 1996. p.823-836.
- LAYBAUER, L. **Análise das transferências de metais pesados em águas e sedimentos fluviais na região das minas do Camaquã, RS**. 164f. 1995. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.
- LAYBAUER, L. Incremento de metais pesados na drenagem receptora de efluentes de mineração – Minas do Camaquã, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v.3, n.3, p.29-36, 1998.
- LI, X.M.; LIAO, D.X.; XU, X.Q.; YANG, Q.; ZENG, G.M.; ZHENG, W.; GUO, L. Kinetic studies for the biosorption of lead and copper ions by *Penicillium simplicissimum* immobilized within loofa sponge. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.159, p.610-615, 2008.
- LOPEZ-MOSQUERA, M.E.; MOIRO, N, C.; CARRAL, E. Use of dairy-industry sludge as fertilizer for grasslands in northwest Spain: heavy metal level in the soil and plant. **Resource, Conservation and Recycling**, Oxford, v.30, p.95-109, 2000.
- LUKTENHAUS, J.F. Role of a major outer membrane protein in *Escherichia coli*. 1977. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. **Journal of Environmental Management**, New York, v.90, p.831-837, 2009.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, London. 1995. 889p.
- MARTINS, S. C. **Adsorção e dessorção de cobre em solos sob aplicação de lodo de esgoto e calda bordaleza**. 99f. 2005. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.
- McCUTCHEON, S.C.; SCHNOOR, J.L. **Phytoremediation: Transformation and control of contaminants**. Ed. Wiley-Interscience, Boca Raton, 2003, 987p.
- MEJARE, M.; BULOW, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.19, p.67-73, 2001.
- MONTELONGO, L.R.; VOLENTINI, S.I.; FARÍAS, R.N.; MASSA, E.M.; RAPISARDA, V.A. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v.451, p.1-7, 2006.
- MOREIRA, M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ªED. Editora UFLA, Lavras, 2006. 729p.
- MONTOVANI, A. **Composição química de solos contaminados com cobre: formas, sorção e efeito no desenvolvimento de espécies vegetais**. 165f. 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- MURAKAMI, M.; AE, N. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.162, p.1185-1192, 2009.

- MURAYAMA, S. **Fruticultura**. 2ªED. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas, 1980. 385p.
- NOGUEIROL, R.C.; NACHTIGALL, G.R.; ALLEONI, L.R.F. Distribuição dos teores de cobre em profundidade em diferentes tipos de solos com vinhedos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife. **Anais**. Recife: SBCS, 2005. 1 CD-ROM.
- OLAFSON, R.W. Physiological and chemical characterization of cyanobacterial metallothionein. 1986. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Annals of Botany**, London, v.88, n.2, p.207-214, 2001.
- PEDLER, J.J.; PARKER, D.R. **Copper**. Encyclopedia of Soil Science, Boca Raton, 2002, p.236-239.
- ROSSOW, F.T.; ROWBURY, R.J. Effect of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. 1984. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- SANTOS, H.P.; MELO, W.B.; LUZ, N.B.; TOMASI, R.J. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Comunicado técnico nº 49, Embrapa. Bento Gonçalves, 2004.
- SHAKOORI, A.R.; MAKHDOOM, M.; HAQ, R.U. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.53, n.3, p.348-351, 2000.
- SHUMAN, L.M. The effect of soil properties on zinc adsorption by soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.39, n.3, p.454-458, 1975.
- SILVA, G.P.; FONTES, M.P.F.; COSTA, L.M.; BARROS, N.F. Caracterização química, física e mineralógica de estêreis e rejeito da Mineração de Ferro da Mina de Alegria, Mariana-MG. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v.36,n.1, p.45-52, 2006.
- SILVA, R.M.P.; RODRÍGUEZ, A.A.; OCA, J.M.G.M.D.; MORENO, D.C. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.100, p.1533-1538, 2009.
- SOLIOZ, M.; STOYANOV, J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p.183-195, 2003.
- SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. Oxford University Press, New York, 1989, 277p.
- STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry**. Genesis, Composition, Reactions. 2ªED. John Wiley, New York, 1995. 496p.
- TEMPLE, K.L.; LEROUX, N.W. Syngeneses of sulfide ores: sulfate-reducing bacteria and copper toxicity. 1964. In: CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- UMRANIA, V.V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.97, p.1237-1242, 2006.

- VOSS, M.; THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.947-951, 2001.
- ZENCK, M.H. Heavy metal detoxification in higher plantas – A review. **Gene**, Madison, v.179, p.21-30, 1996.
- YIN, Y.; IMPELLITTERI, C.A.; YOU, S.J.; ALLEN, H.E. The importance of organic matter distribution and extract soil: solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.287, n.1, p.107-119, 2002.
- WANG, Y.; LI, Q.; SHI, J.; LIN, Q.; CHEN, X.; WU, W.; CHEN, Y. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, p.1167-1177, 2008.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.38, p.291-316, 2006.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁREAS CONTAMINADAS COM COBRE

3.1 INTRODUÇÃO

O cobre é um micronutriente essencial para os organismos vivos. Em altas concentrações, pode ser tóxico para a maioria das formas de vida, incluindo os microrganismos (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). Antes do reconhecimento da existência de microrganismos na terra, os Egípcios, Gregos, Romanos e Astecas utilizaram compostos com cobre para a higiene e para o tratamento de doenças (Michels, 2006). Atualmente, muitos fungicidas, tintas, medicamentos antimicrobianos, produtos de higiene bucal, aparelhos de higiene médica, anticépticos e outros produtos contêm cobre como agente antimicrobiano (Michels, 2006).

Atividades de mineração da sociedade moderna, uso extensivo de cobre pela indústria e como pesticida na produção agrícola, são as maiores fontes de poluição de cobre nos solos e águas. Metais pesados tóxicos são uma grande ameaça à saúde dos humanos, biodiversidade e aos ecossistemas (Navarro et al., 2008). Nos vinhedos, a contaminação de cobre pela aplicação da calda bordalesa pode impactar negativamente a produção de uvas e a saúde humana. Conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos para a remoção de metais pesados tóxicos como o cobre de água e solos é atualmente uma área de intensa pesquisa (Chen et al., 2005; 2007a; 2007b; Umrana, 2006; Melgar et al., 2007; Freitas et al., 2008; Okeke, 2008; Okeke et al., 2008; Vilar et al., 2008, 2009; Sari et al., 2009; Amini et al., 2009; Cajocarú et al., 2009; Özer et al., 2009; Uzel & Ozdemir, 2009).

Tecnologias de tratamento como adsorção iônica de cátions, eletrodialise, precipitação e redução química podem ser utilizadas para a remoção de metais pesados (Krishna & Philip, 2005). Estes métodos são mais caros quando comparados com os processos de biorremediação. A remoção biológica de poluentes é atrativa, pois é considerada ecologicamente aceitável,

de baixo custo e eficiente (Camargo et al., 2003; Camargo et al., 2004a; 2004b; Chen et al., 2007a; 2007b; Freitas et al., 2008; Okeke et al., 2008; Okeke, 2008; Uzel & Ozdemir, 2009). Ambientes contaminados selecionam microrganismos resistentes aos poluentes (Atlas & Bartha, 1997). Microrganismos que são resistentes a compostos químicos tóxicos e recalcitrantes podem ser isolados de sítios poluídos e posteriormente utilizados para a remediação destes contaminantes específicos para os quais eles são resistentes (Voss & Thomas, 2001; Chen, et al.; 2005; 2007a; Umrana, 2006; Morales-Barrera et al., 2008; He et al., 2009).

A biossorção é um importante processo de biorremediação para a remoção do cobre e outros metais pesados do ambiente. Neste estudo foram isolados bactérias de solos de vitivinicultura contaminados com cobre e rejeito de mineração de cobre, com o objetivo de avaliar a resistência ao cobre e a capacidade de remover o cobre do ambiente. Além disso, os isolados resistentes com alta capacidade de adsorção de cobre foram caracterizados pelo seqüenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostras de solo

As amostras de solo foram coletadas de três áreas contaminadas com cobre do Sul do Brasil. Dois deles foram coletados de áreas de vitivinicultura contaminadas com cobre localizadas na estação experimental da EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brasil (29°09'53,92"S e 51°31'39,40"O). Estes dois solos foram classificados como NEOSSOLO Litólico distrófico típico e CAMBISSOLO Húmico alumínico típico (Streck et al., 2002). A amostra de Rejeito de mineração de cobre foi obtida das áreas de mineração de cobre de Caçapava do Sul, RS, Brasil (30°29'43,48"S e 53°32'37,87"O). A caracterização do solo e do rejeito estão descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1. Características físicas e químicas dos solos vitivinícolas e rejeito de mineração de cobre.

Tratamento	pH	CTC	MO	Argila	Cu	Zn	Mn
	1:1	cmol _c dm ⁻³	g dm ⁻³	%	----- mg dm ⁻³ -----		
Neossolo	6,3	17,2	2,6	19	207	19	55
Cambissolo	6,0	13,9	2,5	29	142	18	35
Rejeito	7,9	-	0,9	02	576	0,8	02
	Ca	Al	Mg	H + Al	S	P	K
	----- cmol _c dm ⁻³ -----				----- mg dm ⁻³ -----		
Neossolo	10,9	0,0	3,1	2,8	06,1	28	142
Cambissolo	07,8	0,0	2,1	3,5	05,9	27	167
Rejeito	24,2	0,0	1,7	-	12,3	32	032

3.2.2 Isolamento de bactérias resistentes ao cobre

O isolamento de bactérias resistentes ao cobre foi realizado em 100 mL de caldo nutriente (CN) (5 g de Peptona e 3 g de extrato de carne) em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, os quais 300 mg L⁻¹ de Cu(II) foi adicionado na forma de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O), e ajustado o pH à 7,0. O CN foi

esterilizado em autoclave à 121°C por 20 min. As amostras de solo foram usadas independentemente para inocular (1% p/v) de meio estéril contaminado com Cu(II) e incubado por 24 h, com agitação (150 rpm) à 30°C. Subseqüentemente, 1 mL de cultura enriquecida foi utilizado para inocular 99 mL de meio estéril contaminado com Cu(II) e incubado por 24 h (150 rpm, 30°C). Este procedimento foi repetido duas vezes. Bactérias resistentes ao Cu(II) foram purificadas por estriamento em placas de Agar nutriente (AN) contendo Cu(II) (300 mg kg⁻¹). Os isolados foram codificados com a letra C para isolados de Cambissolo, letra N para Neossolo e letra R para isolados de rejeito de mineração de cobre.

3.2.3 Análise de resistência e bio sorção de Cu(II) pelos isolados

Os isolados foram avaliados quanto a resistência e bio sorção do Cu(II) como descrito a seguir. Os inóculos foram preparados pela transferência de três alçadas de cada isolado para meio CN contendo 300 mg L⁻¹ de cobre e incubado à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm). Após 24 h de incubação, cada inóculo foi ajustado com o mesmo meio CN com Cu(II) estéril à densidade ótica de 0,85 (DO₆₀₀). Em experimento paralelo, 0,1 mL de cada inóculo foi utilizado para inocular 20 mL de meio CN contendo 300 mg L⁻¹ Cu(II) em Erlenmeyer de 50 mL e incubado (150 rpm, 24 h, 30°C). A biomassa (densidade de células) foi determinada pela leitura da absorbância à DO₆₀₀ das culturas apropriadamente diluídas.

A bio sorção do cobre foi determinada pela quantificação do cobre remanescente no sobrenadante das culturas de células livres utilizando espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin-Elmer 2380). Resumidamente, 5 mL das culturas foram centrifugadas (10.000 rpm, 10 min). Alíquotas do sobrenadante das culturas (1000 µL) foram diluídas 20 vezes e analisadas. A bio sorção do cobre foi calculada como a diferença entre o cobre total adicionado ao meio e o cobre total remanescente no meio após o crescimento dos isolados (CuBios = CuTotal ad – CuTotal remanescente).

3.2.4 Identificação dos isolados

Os isolados foram identificados com base no seqüenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S como será descrito. Os isolados foram

cultivados pela técnica de esgotamento sobre AN incubado à 30°C por 24 h. O DNA foi extraído de unidades formadoras de colônias crescidas na placa de AN utilizando o Kit Promega Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI) com pequenas modificações. Brevemente, as células foram suspensas em 300 µL de solução de lise celular, incubado à 80°C por 15 min. e deixado em temperatura ambiente para resfriamento. Após, foi adicionado a solução de RNase (1,5 µL) e incubado à 37°C por 60 min. A solução de precipitação de proteínas (100 µL) foi adicionada e incubada em gelo por 5 min. Seguido de centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo e foi adicionado álcool 95% e mantido em gelo. O precipitado foi recuperado por centrifugação. O pélete foi lavado com álcool 70% à temperatura ambiente e re-suspendido em água livre de nucleases.

Os oligonucleotídeos iniciadores universais para bactérias correspondem às posições em *Escherichia coli*, o 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), foram utilizados para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal em PCR (Lane, 1991). A mistura de reação de PCR consistiu em 12,5 µL de PCR master mix (Promega, Madison, WI), amostra de DNA genômico (0,5 µL), oligonucleotídeo iniciador 27F (2,5 µL=12,5 pmol), oligonucleotídeo iniciador 1492R (2,5 µL=12,5 pmol) e completado à um volume final de 25 µL com água livre de nucleases. O gene rRNA da região 16S foi amplificado, utilizando 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial, 95°C por 5 min.; desnaturação subsequente, 95°C por 0,5 min.; temperatura de anelamento, 50°C por 1 min.; temperatura de extensão, 72°C por 1 min. e extensão final, 72°C por 5 min.). A amplificação do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Unidades de filtros Millipore Montage PCR (Millipore, Billerica, MA) foram utilizados para a remoção de oligonucleotídeos iniciadores, sais, e dNTPs incorporados de acordo com as instruções do fabricante. Para o ciclo de seqüenciamento de DNA foi utilizado o BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) com oligonucleotídeo iniciador 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') para o seqüenciamento em reações independentes (UCR Genomics Institute, Riverside, CA). A similaridade de seqüências de nucleotídeos foi avaliada utilizando o Genbank BLAST (N). A análise filogenética foi obtida utilizando o programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007). A seqüência de rRNA foi submetida

à base de dados do GenBank, obtendo-se os números de acesso FJ577657 até FJ577671.

3.2.5 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos utilizando três repetições. As médias, erro médio e desvio padrão ($N-1$) foram calculados quando necessário. A análise de significância ($P < 0,05$) dos tratamentos foram calculados como apropriado utilizando o programa estatístico SOC desenvolvido pelo Núcleo Tecnológico para Informática NTIA/EMBRAPA (EMBRAPA, 1997).

3.3 RESULTADOS

Foram isoladas 55 bactérias do solo classificado como Cambissolo, coletado em áreas de vitivinicultura contaminados com cobre (Tabela 3.2). A máxima produção de biomassa em altas concentrações de cobre (300 mg L^{-1}) foi observada com os isolados C40, C41 e C44. A bioissorção de Cu(II) foi máxima nas culturas dos isolados C12 ($62,21 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h) e C14 ($61,77 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h). O Isolado C34 mostrou a menor bioissorção de Cu(II) ($6,48 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h), embora seu crescimento tenha sido alto ($1,55 \text{ DO}_{600}$), em altas concentrações de Cu(II) (300 mg L^{-1}).

Quarenta bactérias resistentes ao cobre foram isoladas de um solo classificado como Neossolo, coletado em área de vitivinicultura contaminada com cobre (Tabela 3.3). O crescimento dos isolados em meio contendo 300 mg L^{-1} de cobre, não foi diretamente relacionado com a bioissorção do cobre. A mais alta densidade de células foi observada nas culturas do isolado N18 ($1,98$ unidades de DO_{600}). A maior bioissorção de cobre foi apresentado pelo isolado N2 ($80,22 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h). A menor bioissorção de Cu(II) ($1,95 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h) foi observada pelo isolado N20, embora sua produção de biomassa tenha sido alta ($1,41$ unidades DO_{600} em 24 h).

Em geral, não houve correlação direta entre quantidades de biomassa produzida nas culturas e a bioissorção de Cu(II) pelos isolados de rejeito de mineração de cobre (Tabela 3.4). A densidade de células das bactérias foi maior nos isolados R27 ($1,20$ unidades DO_{600} em 24 h), R17 ($1,15$ unidades DO_{600} em 24 h) e R8 ($1,09$ unidades DO_{600} em 24 h). A máxima bioissorção de Cu(II) ocorreu com os isolados R17 ($70,47 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h) e R4 ($68,34 \text{ mg L}^{-1}$ em 24 h).

Os isolados N11, R4 e R17 removeram níveis similares de cobre das culturas, $67,26$, $68,34$ e $70,47 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre, respectivamente (Figura 3.1). A

capacidade específica de remoção de cobre foi alta nos isolados de rejeito de mineração (Figura 3.2). O isolado de Neossolo de vinhedos contaminado com cobre N11, mostrou a maior biorremoção específica de cobre (121,82 mg/L/DO) em 24 h. Esta alta capacidade de biorremoção específica também foi encontrada nos isolados R4, R5, R17 e R3 com valores de 79,70; 67,21; 61,46 e 64,61 mg/L/DO em 24 h, respectivamente (Figura 3.2). A remoção do cobre por cada isolado selecionado mostrou que o isolado N2 de Neossolo de áreas de vitivinicultura contaminado com cobre foi significativamente maior do que os demais isolados.

TABELA 3.2. Produção de biomassa e biorremoção de Cu(II) em culturas de isolados de solo de vitivinicultura (Cambissolo) incubados em meio CN contendo 300 mg L⁻¹ de Cu(II), à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm).

Isolados	Biomassa	Cu(II) removido	Isolados	Biomassa	Cu(II) removido
	--- DO ₆₀₀ ---	----- % -----		--- DO ₆₀₀ ---	----- % -----
C1	1,16±0,064*	04,18±0,21	C34	1,55±0,024	02,16±0,31
C2	1,53±0,046	06,71±0,34	C35	1,59±0,009	03,58±0,94
C3	1,71±0,012	11,64±1,05	C36	1,67±0,045	06,41±0,45
C4	1,14±0,034	06,19±0,10	C37	1,60±0,016	10,44±0,37
C6	1,57±0,032	10,59±0,76	C38	1,03±0,031	03,43±0,77
C7	1,16±0,047	11,79±1,05	C39	1,52±0,141	02,98±0,65
C8	1,45±0,010	05,29±0,52	C40	1,91±0,026	08,20±0,77
C9	1,22±0,025	4,40±0,31	C41	1,89±0,028	06,86±0,65
C11	1,31±0,022	12,01±0,55	C42	1,65±0,169	05,82±1,21
C12	1,19±0,021	20,74±0,81	C43	1,52±0,107	08,20±2,11
C14	1,16±0,025	20,59±0,68	C44	1,91±0,034	13,80±0,73
C15	0,83±0,043	09,70±0,99	C45	1,16±0,047	05,07±0,91
C16	0,85±0,012	05,52±0,21	C46	1,00±0,024	05,22±0,17
C17	0,80±0,019	4,62±0,42	C47	1,24±0,096	04,33±0,70
C18	0,64±0,070	06,71±0,37	C48	1,63±0,024	05,22±1,08
C20	0,93±0,012	09,09±1,26	C49	1,56±0,020	04,33±0,70
C21	1,58±0,055	11,56±0,52	C50	1,39±0,020	05,07±1,32
C22	0,89±0,042	06,26±0,60	C52	1,45±0,131	06,26±0,08
C24	1,01±0,047	10,00±1,80	C53	1,45±0,065	05,07±1,32
C28	1,92±0,008	08,65±0,21	C54	1,63±0,033	08,80±0,81
C30	0,84±0,026	13,79±2,63	C55	1,72±0,082	11,04±0,52
C31	1,75±0,030	05,96±0,84			

*Valores são as médias ± erro médio.

TABELA 3.3. Produção de biomassa e biorremocção de Cu(II) em culturas de isolados de solo de vitivinicultura (Neossolo) incubados em meio CN contendo 300 mg L⁻¹ de Cu(II), à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm).

Isolados	Biomassa	Cu(II) removido	Isolados	Biomassa	Cu(II) removido
	--- DO ₆₀₀ ---	----- % -----		--- DO ₆₀₀ ---	----- % -----
N1	1,46±0,019*	10,93±0,49	N22	1,43±0,047	10,51±0,68
N2	1,45±0,042	26,74±0,85	N23	1,40±0,270	12,60±0,09
N3	1,36±0,004	10,72±0,77	N24	1,38±0,268	12,39±1,77
N4	1,43±0,023	17,13±0,44	N25	1,38±0,264	10,72±2,36
N5	1,13±0,042	09,05±0,97	N26	1,33±0,014	10,72±1,45
N6	1,20±0,086	10,30±1,39	N27	1,30±0,010	06,40±1,83
N7	1,41±0,028	11,97±1,00	N28	1,31±0,007	09,89±2,00
N8	1,38±0,020	10,72±0,19	N29	1,36±0,016	12,67±0,97
N9	1,33±0,029	07,52±0,80	N30	1,41±0,003	05,50±1,67
N10	1,40±0,015	10,30±0,90	N32	1,68±0,095	10,86±1,75
N11	0,67±0,102	22,42±0,99	N33	1,44±0,020	11,77±0,68
N12	1,44±0,035	09,89±2,16	N34	1,39±0,021	02,37±0,19
N13	1,50±0,289	14,62±1,46	N35	1,31±0,017	07,24±1,67
N14	1,61±0,031	12,67±1,16	N36	1,29±0,012	10,30±0,50
N16	1,61±0,071	14,90±0,19	N38	1,26±0,018	11,70±1,55
N17	1,46±0,039	12,11±1,42	N39	1,39±0,018	13,92±0,57
N18	1,98±0,388	17,40±1,57	N40	1,18±0,065	12,95±0,94
N20	1,41±0,026	01,95±0,98			

*Valores são as médias ± erros médios das médias.

Quinze bactérias selecionadas com base na bioabsorção de cobre e resistência à altas concentrações de cobre foram identificadas pela análise do gene do RNA ribossomal da região 16S. O comprimento das seqüências de nucleotídeos utilizados foram entre 471 e 506 bases de ácidos nucléicos (Tabela 3.5). Estas seqüências foram utilizadas para análise no Genbank e construção da árvore filogenética. A maioria dos isolados foram identificados como *Bacillus* da divisão firmicutes. Nove isolados (C28; C44; C12; C40; C41; N11; N16; R4 e R6) foram identificados como *Bacillus pumilus*. Dois isolados (C45 e N14) foram identificados como *Bacillus thuringiensis* e três (N18; R3 e R16) como *Bacillus* sp. Um isolado foi identificado como *Staphylococcus pasteurii* (N2). A análise do Genbank revelou que os isolados C44, C41, C40, N11, N2, R4 e R16 foram 99% similares às seqüências do Genbank. Os isolados C28, C45, C12, N16, N14, N18 e R3 foram 98% similares às do Genbank e 97% de similaridade foi observada para o isolado R6. A Figura 3.3

apresenta a relação filogenética entre os isolados selecionados das três diferentes áreas contaminadas em estudo.

TABELA 3.4. Produção de biomassa e biorremoval de Cu(II) em culturas de isolados de rejeito de mineração de cobre incubados em meio CN contendo 300 mg L^{-1} de Cu(II), à 30°C por 24 h com agitação (150 rpm).

Isolados	Biomassa	Cu(II) removido	Isolados	Biomassa	Cu(II) removido
	--- DO_{600} ---	----- % -----		--- DO_{600} ---	----- % -----
R1	$0,81 \pm 0,009^*$	$11,69 \pm 0,39$	R18	$0,84 \pm 0,022$	$12,25 \pm 1,26$
R2	$0,92 \pm 0,010$	$11,41 \pm 0,21$	R19	$0,73 \pm 0,001$	$09,86 \pm 0,32$
R3	$0,94 \pm 0,070$	$18,85 \pm 2,58$	R20	$0,86 \pm 0,041$	$11,55 \pm 0,45$
R4	$0,80 \pm 0,015$	$22,78 \pm 1,56$	R21	$0,82 \pm 0,001$	$10,56 \pm 0,49$
R5	$0,84 \pm 0,001$	$17,87 \pm 1,75$	R22	$0,86 \pm 0,009$	$13,23 \pm 0,42$
R6	$0,94 \pm 0,004$	$14,78 \pm 0,45$	R23	$0,67 \pm 0,142$	$13,51 \pm 0,56$
R7	$0,82 \pm 0,000$	$14,92 \pm 1,05$	R24	$0,90 \pm 0,025$	$09,30 \pm 0,29$
R8	$1,09 \pm 0,040$	$13,58 \pm 0,49$	R25	$0,85 \pm 0,025$	$12,39 \pm 0,70$
R9	$0,89 \pm 0,004$	$10,42 \pm 0,14$	R26	$0,80 \pm 0,007$	$10,14 \pm 0,58$
R10	$0,89 \pm 0,002$	$10,56 \pm 0,69$	R27	$1,20 \pm 0,019$	$12,11 \pm 0,28$
R11	$0,84 \pm 0,009$	$15,76 \pm 0,90$	R28	$0,78 \pm 0,006$	$10,28 \pm 0,63$
R12	$0,85 \pm 0,021$	$17,45 \pm 0,81$	R29	$0,79 \pm 0,012$	$09,30 \pm 0,32$
R17	$1,15 \pm 0,042$	$23,49 \pm 0,24$	R30	$0,85 \pm 0,004$	$07,89 \pm 0,37$

*Valores são as médias \pm erro médio.

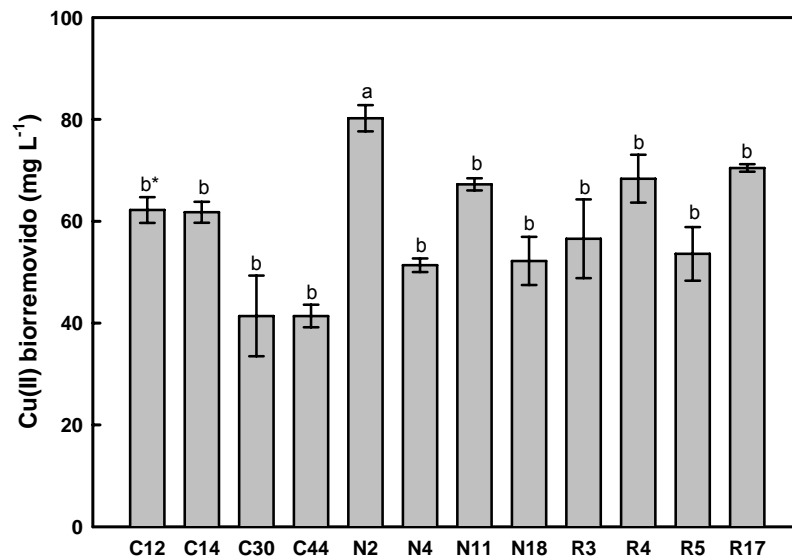


FIGURA 3.1. Biorremoval de cobre pelos isolados selecionados. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Barras indicam o erro médio.

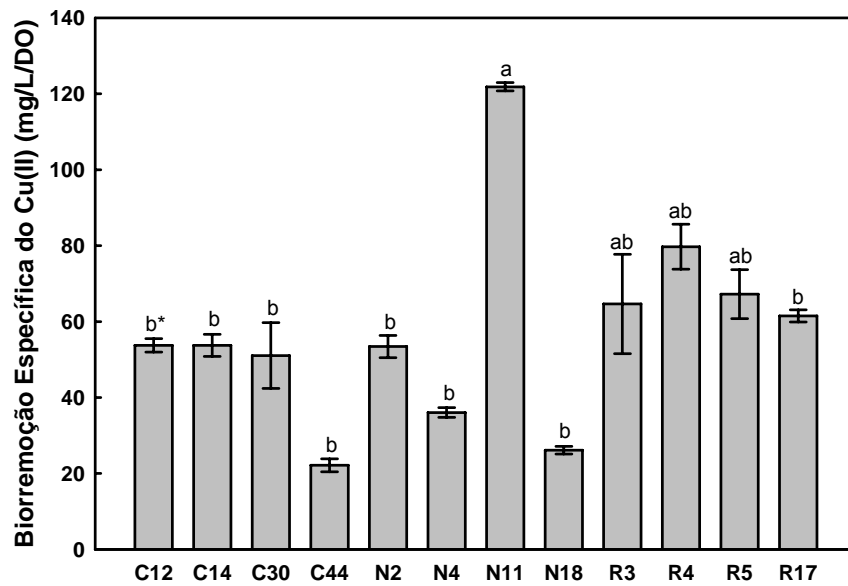


FIGURA 3.2. Biorremção específica de cobre pelos isolados selecionados. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Barras indicam o erro médio.

TABELA 3.5. Identificação dos isolados de diferentes áreas contaminadas como solos de áreas vinícolas Cambissolo (C) e Neossolo (N) e áreas de rejeito de mineração de cobre baseado no rRNA da região 16S.

Isolado	Nº de nucleotídeos	Submissão GenBank	Pesquisa GenBank	Similaridade (%)
C28	494	FJ577657	EU102277.1	<i>B. pumilus</i> (98)
C45	472	FJ577658	EU037097.1	<i>B. thuringiensis</i> (98)
C44	476	FJ577659	EF528292.1	<i>B. pumilus</i> (99)
C12	478	FJ577660	DQ412563.1	<i>B. pumilus</i> (98)
C41	471	FJ577661	FJ032017.1	<i>B. pumilus</i> (99)
C40	474	FJ577662	AY792029.1	<i>B. pumilus</i> (99)
N11	503	FJ577663	EU102277.1	<i>B. pumilus</i> (99)
N16	506	FJ577664	EU855197.1	<i>B. pumilus</i> (98)
N14	502	FJ577665	EU037097.1	<i>B. thuringiensis</i> (98)
N18	505	FJ577666	EU821778.1	<i>Bacillus</i> sp. (98)
N2	494	FJ577667	EU373331.1	<i>S. pasteurii</i> (99)
R3	502	FJ577668	EU821778.1	<i>Bacillus</i> sp. (98)
R4	495	FJ577669	EU855197.1	<i>B. pumilus</i> (99)
R6	495	FJ577670	FM179663.1	<i>B. pumilus</i> (97)
R17	472	FJ577671	DQ122328.1	<i>Bacillus</i> sp. (99)

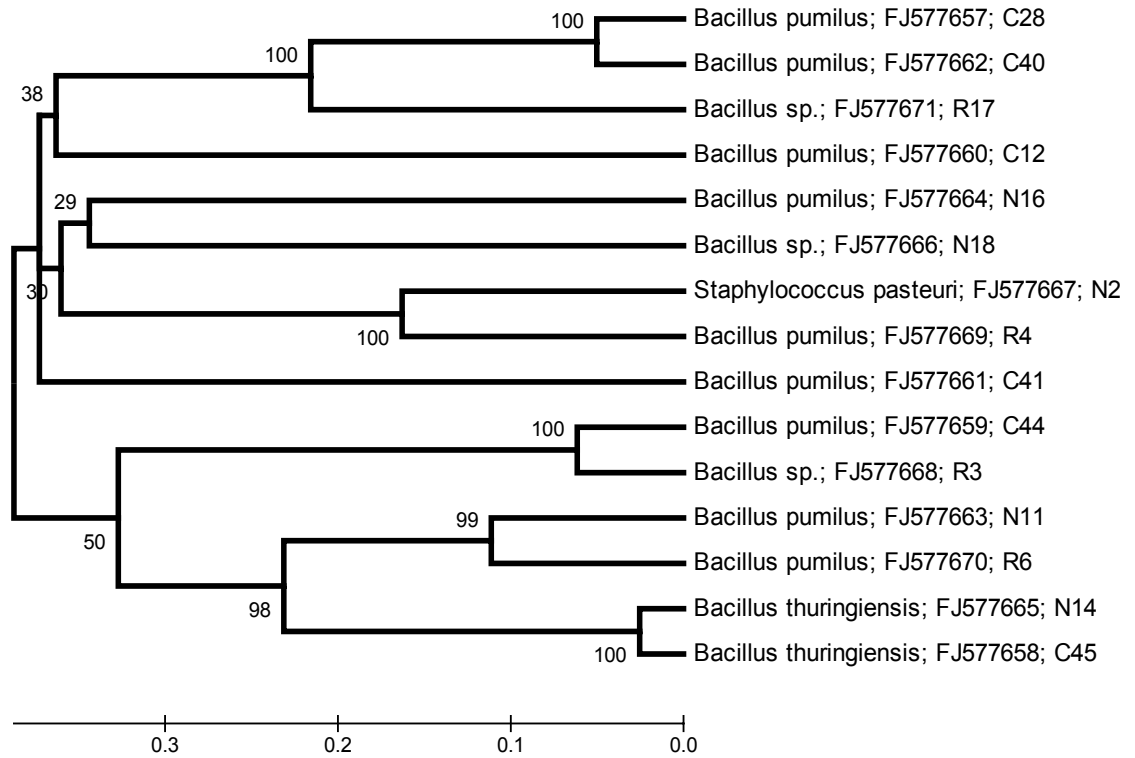


FIGURA 3.3. Árvore filogenética apresentando a distância evolucionária entre os isolados selecionados de três áreas contaminadas com cobre baseada na seqüência de rRNA da região 16S. O número em cada agrupamento é referente ao bootstrap de 100 repetições. A escala é o valor da distância evolucionária entre as espécies.

3.4 DISCUSSÃO

O cobre é um metal pesado tóxico aos seres vivos quando encontrado em grandes concentrações no ambiente. A biossorção de metais pesados envolve a acumulação de metais na biomassa microbiana com a subsequente recuperação do ambiente através da biorremediação ou remediação químicas. Microrganismos resistentes ao cobre com capacidade de absorver este metal à biomassa pode ser uma estratégia na biorremediação para remover o cobre de ambientes terrestres e aquáticos contaminados.

Algumas bactérias isoladas neste estudo demonstraram tolerância às altas concentrações de cobre. A maioria dos isolados identificados, pertenciam ao gênero *Bacillus*, com duas espécies identificadas como *B. thuringiensis* e *B. Pumilus*. Isto demonstra que ambientes contaminados com cobre selecionam espécies como o *Bacillus*. Um isolado foi identificado como *Staphylococcus pasteurii*. As comunidades microbianas são afetadas pela pressão de seleção, as quais decrescem a população normal e seleciona microrganismos resistentes aos contaminantes (Atlas & Bartha, 1997). A abundância da espécie de *Bacillus* em ambientes contaminados com Cu(II) pode ser atribuído à sua habilidade de formar endosporos, os quais são mais resistentes do que as células vegetativas às substâncias tóxicas. Conseqüentemente, esporos bacterianos persistem no ambiente sobre condições adversas. Espécies de *Bacillus* que reduzem Se foram abundantes em lodos de sedimento de uma lagoa de evaporação altamente poluída com selênio e sais (Siddique et al., 2006). Os autores também isolaram *Staphylococcus warneri* deste ambiente de sedimento. O *Bacillus* é um gênero importante de bactérias para a biorremediação de metais pesados em diferentes áreas contaminadas com estes metais (Ali et al., 2008; Desai et al., 2008; Mishra & Doble, 2008; Jiang et al., 2008). Além do mais, um estudo com mudanças na comunidade bacteriana

em área de mineração de cobre, *Acidithiobacillus ferroxidans* foi abundante e um *Bacillus* sp. foi encontrado (Chen et al., 2008).

Em geral, os isolados de área de mineração mostraram uma maior capacidade de bioissorção do cobre. Os isolados do rejeito de mineração, R4, R17, R3 e R6 removeram mais de 70 mg L⁻¹ do meio líquido em 24 h. A *P. putida* CZ1 (Chen et al., 2005) e *P. putida* NA (Capítulo III) removeram de meio líquido cerca de 20 e 25 mg L⁻¹ em 24 h, respectivamente. O isolado do solo de vitivinicultura contaminado com Cu(II) *Staphylococcus pasteurii* N2, neste estudo mostrou a maior capacidade de bioissorção, removendo mais de 80 mg L⁻¹ de Cu(II) em 24 h. Por outro lado, o isolado N11 (*B. pumilus*) apresentou a maior relação específica de bioissorção de cobre relativa à densidade de células. Isto indica que a bioissorção do cobre pode estar diretamente relacionada à biomassa como observado com o isolado *S. pasteurii* N2 ou diretamente relacionada à composição da célula como no isolado *B. pumilus* N11. A capacidade de sorção de microrganismos procariotos e eucariotos é devido aos componentes da parede celular que apresenta grupos funcionais (carboxila, hidroxila, sulfato, fosfato e grupos amino) com capacidade de se ligarem aos metais (Macfie & Welbourn, 2000).

O cobre é um dos metais com potencial para a biorremocção de ambientes contaminados através da bioissorção. Em um estudo comparativo de seletividade de ligação de diferentes metais à parede celular de *Pseudomonas* sp., o Cu(II) teve mais afinidade em comparação à outros metais como o Ni(II), Co(II) e Cd(II) quando avaliados conjuntamente (Choudhary & Sar, 2009). O cobre pode ligar-se em vários sítios como na membrana, periplasma, citoplasma e proteínas intracelulares. Um estudo sobre a bioissorção de metais pesados com fracionamento celular mostrou que o periplasma é o sítio mais importante na acumulação deste metal. Mais de 60% do cobre total ligou-se às células de uma *Pseudomonas* sp. na região do periplasma em 2 h de incubação (Choudhary & Sar, 2009). Esta ligação está associada as ATPases, as quais transportam o cobre para dentro das células (Solioz & Stoyanov, 2003; Whiteley & Lee, 2006).

3.5 CONCLUSÕES

O isolado do gênero *Staphylococcus*, caracterizado por meio de técnicas baseadas em DNA, apresenta uma alta resistência e capacidade de absorção ao cobre. Outros isolados do gênero *Bacillus*, como *B. thuringiensis* e *B. pumilus*, também apresentaram alta resistência e capacidade de adsorção do cobre. Contudo, os isolado N11 (*B. pumilus*) apresentou alta adsorção específica do cobre.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, N.; HAMEED, A.; AHMED, S. Physicochemical characterization and Bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous Bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, Boston (2008), doi:10.1016/j.jhazmat.2008.08.006.
- AMINI, M.; YOUNESI, H.; BAHRAMIFAR, N. Statistical modeling and optimization of the cadmium biosorption process in an aqueous solution using *Aspergillus niger*. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, Amsterdam, (2009), doi:10.1016/j.colsurfa.2008.11.053
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4°ED, Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, 1997, 694p.
- CAMARGO, F.A.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.32, p.1228-1233, 2003.
- CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by an Actinomycete, *Arthrobacter crystallopoietes* ES 32. **Biological Trace Element Research**, Washington, v.97, p.183-194, 2004a.
- CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by immobilized cells and the cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.8, p.23-30, 2004b.
- CERVANTES, C.; CORONA, F.G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FMES Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- CHEN, X.C.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; SHI, J.Y.; WU, W.X.; CHEN, Y.X. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.46, p.101-107, 2005.
- CHEN, H.; YANG, B.; CHEN, X. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China. **FEMS Microbiology Research**, Amsterdam, 2006; (2007a), doi:10.1016/j.micres.2007.09.002.
- CHEN, X.C.; WU, W.X.; SHI, J.Y.; XU, X.H.; WANG, H.; CHEN, Y.X. Adsorption of copper and zinc on *Pseudomonas putida* CZ1: Particle concentration effect and adsorption reversibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.54, p.46-52, 2007b.
- CHEN, Y.Q.; REN, G.J.; AN, S.Q.; SUN, Q.Y.; LIU, C.H.; AHUANG, J.L. Changes of bacterial community structure in copper mine tailings after colonization of reed (*Phragmites communis*). **Pedosphere**, Nanjing, v.6, n.18, p.731-740, 2008.
- CHOUDHARY, S.; SAR, P. Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+}) sequestration. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.100, p.2482-2492, 2009.

- COJOCARU, C.; DIACONU, M.; CRETESCU, I.; SAVIC, J.; VASIC, V. Biosorption of copper(II) ions from aqua solutions using dried yeast biomass. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, Amsterdam, v.335, p.181-188, 2009.
- DESAI, C.; JAIN, K.; MADAMWAR, D. Evaluation of In vitro Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.99, p.6059–6069, 2008.
- EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura**. Ambiente software NTIA, versão 4.2.2: manual do usuário - ferramental estatístico. Campinas, 1997.
- FREITAS, O.; DELERUE-MATOS, C.; BOAVENTURA, R. Optimization of Cu(II) biosorption onto *Ascophyllum nodosum* by factorial design methodology, **Journal of Hazardous Materials**, Boston, (2008), doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.001.
- HE, Z.; GAO, F.; SHA, T.; HU, Y.; HE, C. Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. strain CScr-3 from chromium landfill. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.163, p.869-873, 2009.
- JIANG, C.; SUN, H.; SUN, T.; ZHANG, Q.; Y. ZHANG, Y. Immobilization of cadmium in soils by UV-mutated *Bacillus subtilis* 38 bioaugmentation and NovoGro amendment, **Journal of Hazardous Materials**, Boston, (2008), doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.107
- KRISHNA, K.R.; PHILIP, L. Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.121, p.109-117, 2005.
- LANE, D. 16S/23S sequencing. In: STACKEBRANDT E., GOODFELLOW, M. (eds) **Nucleic acid techniques in bacterial sistematics**. Jhon Wiley and Sons, New York, 1991. 460p.
- MACFIE, S.M.; WELBOURN, P.M. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). **Archives of Environmental Contaminant Toxicology**, Verlag, v.39, p.413-419, 2000.
- MELGAR, M.J.; ALONSO, J.; GARCÍA, M.A. Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Agaricus macrosporus*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.385, p.12-19, 2007.
- MICHELS, H.T. (2006) Anti-microbial characteristics of copper. Página acessada em 29 de Julho de 2009, <http://www.astm.org/SNEWS/OCTOBER_2006/michels_oct06.html>
- MISHRA, S.; DOBLE, M. Novel chromium tolerant microorganisms: Isolation, characterization and their biosorption capacity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.71, p.874–879, 2008.
- MORALES-BARRERA, L.; GUILLÉN-JIMÉNEZ, F.M.; ORTIZ-MORENO, A.; VILLEGAS-GARRIDO, T.L.; SANDOVAL-CABRERA, A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.H.; CRISTIANI-URBINA, E. Isolation, identification and characterization of a *Hypocrea tawa* strain with high Cr(VI) reduction potential. **Biochemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.40, p.284–292, 2008.
- NAVARRO, M.C.; PÉREZ-SIRVENT, C.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M.J.; VIDAL, J.; OKEKE, B.C.; LAYMON, J.; CRENSHAW, S.; OJI, C. Environment and kinetic parameters for Cr(VI) bioreduction by a bacterial Monoculture Purified from Cr(VI)-resistant Consortium. **Biological Trace Element Research**, Washington, v.123, p.229-241, 2008.
- OKEKE, B.C. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.35, p.1571-1579, 2008.

- ÖZER, A.; GÜRBÜZ, G.; ÇALIMLI, A.; KÖRBAHTI, B.K. Biosorption of copper(II) ions on *Enteromorpha prolifera*: Application of response surface methodology (RSM). **Chemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.146, p.377–387, 2009.
- SARI, A.; MENDIL, D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Biosorption of palladium(II) from aqueous solution by moss (*Racomitrium lanuginosum*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.162, p.874-879, 2009.
- SIDDIQUE, T.; ZHANG, Y.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Characterization of sediment bacteria involved in selenium reduction. **Bioresearch Technology**, Amsterdam, v.97, p.1041-1049, 2006.
- SOLIOZ, M.; STOYANOV, J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FMES Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p.183-195, 2003.
- STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLANT, E.; NASCIMENTO, P.C.; SCHNEIDER, P. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS, UFRGS, 2002, 107p.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, p.1596-1599, 2007.
- UMRANIA, V.V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. **Bioresearch Technology**, Amsterdam, v.97, p.1237-1242, 2006.
- UZEL, A.; OZDEMIR, G. Metal biosorption capacity of the organic solvent tolerant *Pseudomonas fluorescens* TEM08. **Bioresearch Technology**, Amsterdam, v.100, p.542–548, 2009.
- VILAR, V.J.P.; MARTINS, R.J.E.; BOTELHO, C.M.S.; BOAVENTURA, R.A.R. Effect of Cu(II), Cd(II) and Zn(II) on Pb(II) biosorption by algae *Gelidium*-derived materials. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.154, p.711-720, 2008.
- VILAR, V.J.P.; MARTINS, R.J.E.; BOTELHO, C.M.S.; BOAVENTURA, R.A.R. Removal of Cu and Cr from an industrial effluent using a packed-bed column with algae *Gelidium*-derived material. **Hydrometallurgy**, Cape Town, v.96, p.42–46, 2009.
- VOSS, M.; THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p.947-951, 2001.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.38, p.291-316, 2006.

CAPÍTULO III

SORÇÃO E REDUÇÃO DO Cu(II) POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS CONTAMINADOS COM COBRE

4.1 INTRODUÇÃO

O uso intensivo de metais pesados tem causado contaminação dos solos, aquíferos, atmosfera e biosfera, via adição de resíduos contaminados, fertilizantes minerais e pesticidas na produção agrícola. Na vitivinicultura, a pulverização com vários fungicidas contendo cobre como princípio ativo, são utilizados para o controle de doenças fúngicas, incluindo míldio e manchas foliares. Assim, resíduos de cobre dos fungicidas contaminam o ambiente. Rejeitos de áreas de mineração de cobre contendo alta concentração deste metal é também fonte de poluição para as áreas adjacentes e organismos vivos.

O cobre é um elemento essencial para a vida, mas em altas concentrações é tóxico para os organismos incluindo os microrganismos do solo (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). Altas concentrações de cobre decrescem a população normal dos organismos do solo e promove o crescimento dos organismos resistentes ao cobre em ambientes contaminados com este metal (Atlas & Bartha, 1997). Altas concentrações de metais pesados também afetam as atividades enzimáticas nos solos (Casucci et al., 2003). Microrganismos que são resistentes à químicos tóxicos e recalcitrantes podem ser isolados, selecionados e utilizados para biorremediação de ambientes contaminados com químicos específicos para os quais eles são resistentes (Voss & Thomas, 2001; Chen, et al., 2005; Umrana, 2006; Chen et al., 2007).

A biorremediação é uma estratégia para a remediação de ambientes contaminados com metais pesados (Camargo et al., 2007; Chen et al., 2007a; 2007b; Okeke, 2008; Okeke et al., 2008; Freitas et al., 2008; Uzel & Ozdemir, 2009). A biossorção e biorredução de contaminantes são processos efetivos de biorremediação para a remoção de cobre e outros metais pesados tóxicos do ambiente. Assim, há um interesse na biorremoção do cobre pela biossorção em

meio líquido (Chen et al., 2007a, 2007b; Melgar et al., 2007; Freitas et al., 2008; Vilar et al., 2008, 2009; Uzel & Ozdemir, 2009; Sari et al., 2009; Amini et al., 2009; Özer et al., 2009, Cajocarú et al., 2009). Estudos com biorremediação de cobre não estão limitados às bactérias isoladas. Algas como *Gelidium* têm sido empregadas para a biossorção do cobre de efluentes industriais (Villar et al., 2008; 2009).

A biorredução do Cu(II) para Cu(I) é catalisado pela cobre redutase. A redução do Cu(II) para o Cu(I) aumenta a mobilidade do cobre, e conseqüentemente a disponibilidade do cobre para as ATPases da parede celular (Whiteley & Lee, 2006). As ATPases têm afinidade ao Cu(I) que é rapidamente bombeado para dentro da célula (Solioz & Vulpe, 1996; Lu & Solioz, 2002; Solioz & Stoyanov, 2003; Göhre & Paszkowski, 2006; Whiteley & Lee, 2006) promovendo a biossorção e biorremediação do cobre de ambientes aquáticos e terrestres. Além do mais, há um extensivo uso de cobre na agricultura, e há uma falta de informação sobre a biotransformação e biossorção do cobre pelos microrganismos na água e no solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sorção e redução do cobre por um isolado, *P. putida* cepa NA altamente resistente à cobre, isolada de solo em área de vitivinicultura contaminada com cobre. Especificamente, foram examinados os fatores ambientais que influenciam a redução e sorção do cobre pelo isolado.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolamento de bactérias resistentes ao Cu(II)

Duas amostras de solos de áreas de vitivinicultura classificadas como Neossolo e Cambissolo foram coletadas da Estação Experimental da EMBRAPA, Bento Gonçalves, RS, Brasil. O rejeito de mineração de cobre foi coletado em Caçapava do Sul, RS, Brasil. O enriquecimento de bactérias resistentes ao cobre foi realizado utilizando 100 mL caldo nutriente (CN) em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, para os quais foi adicionado 300 mg mL^{-1} Cu(II) utilizando $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, subseqüentemente mencionado como Cu(II). O meio foi ajustado para pH 7,0 utilizando 1M NaOH ou 0,1M HCl. O caldo nutriente contendo cobre (CN-Cu) foi esterilizado pela autoclavagem à 121°C por 20 min. Três solos diferentes foram utilizados para inocular (1% p/v) do CN-Cu e incubado por 24 h, com agitação (150 rpm) à 30°C . Subseqüentemente, 1 mL da cultura enriquecida foi transferida para 99 mL de CN-Cu estéril e incubado por 24 h, com agitação (150 rpm) à 30°C . O procedimento de enriquecimento foi repetido por três vezes. Bactérias resistentes ao Cu(II) foram posteriormente purificadas pela técnica de esgotamento por estrias em placas, realizadas em três vezes em placas com Agar Nutriente (AN) contendo Cu(II) (300 mg kg^{-1}). Sete bactérias foram isoladas do consórcio enriquecido e avaliadas à produção de biomassa, sorção e redução do Cu(II) em meio líquido. Os inóculos foram preparados pela transferência de três alçadas das colônias de cada isolado e adicionado em meio líquido contendo 100 mg L^{-1} de cobre, e incubados à 30°C por 24 h. A densidade ótica (DO; λ_{600}) da diluição 1:10 do inóculo de cada isolado ($R_{100} = 0,039$; $R_1 = 0,167$; $R_2 = 0,203$; $C_{45} = 0,170$; $C_1 = 0,132$; $NA = 0,182$; $NC = 0,175$) foi quantificada utilizando espectrofotômetro. Cinco mililitros de caldo tryptic soy (TSB) contendo Cu(II) (100 mg L^{-1}) em tubos de vidro (16 x 125 mm), foram inoculados com $100 \mu\text{L}$

de cada bactéria resistente ao cobre. A tolerância ao cobre foi monitorada pela quantificação da DO₆₀₀ após a incubação à 30°C por 24 h. O isolado NA foi selecionado com base a sua produção de biomassa, sorção e redução do Cu(II).

4.2.2 Caracterização molecular da bactéria resistente ao Cu(II)

O isolado NA foi identificado pelo seqüenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S como será descrito. O isolado foi cultivado pela técnica de esgotamento sobre AN incubado à 30°C por 24 h. O DNA foi extraído de unidades formadoras de colônias crescidas na placa de AN utilizando o Kit Promega Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI) com pequenas modificações. Resumidamente, as células foram suspensas em 300 µL de solução de lise celular, incubado à 80°C por 15 min., e colocado a temperatura ambiente para resfriamento. Após, foi adicionado a solução de RNase (1,5 µL) e incubado à 37°C por 60 min. A solução de precipitação de proteínas (100 µL) foi adicionada e incubada em gelo por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo e foi adicionado 600 µL de álcool 95% e mantido em gelo. O precipitado foi recuperado por centrifugação. O pélete foi lavado com álcool 70% à temperatura ambiente e re-suspendido em água livre de nucleases.

Os oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados, correspondem às posições na *Escherichia coli*, o 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e o 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), foram utilizados para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal em PCR (Lane, 1991). A mistura de reação de PCR consistiu em 12,5 µL de PCR master mix (Promega, Madison, WI), amostra de DNA genômico (0,5 µL), oligonucleotídeo iniciador 27F (2,5 µL=12,5 pmol), oligonucleotídeo iniciador 1492R (2,5 µL=12,5 pmol) e completado à um volume final de 25 µL com água livre de nucleases. O gene rRNA da região 16S foi amplificada utilizando 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial, 95°C por 5 min.; desnaturação subsequente, 95°C por 0,5 min.; temperatura de anelamento, 50°C por 1 min.; temperatura de extensão, 72°C por 1 min. e extensão final, 72°C por 5 min.). A amplificação do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Unidades de filtros Millipore Montage PCR (Millipore, Billerica, MA) foi utilizado para a remoção de

oligonucleotídeos iniciadores, sais, e dNTPs incorporados de acordo com as instruções do fabricante. O ciclo de seqüenciamento de DNA foi utilizando BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) com oligonucleotídeo iniciador 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') para o seqüenciamento em reações independentes (UCR Genomics Institute, Riverside, CA).

A similaridade de seqüência de nucleotídeos foi pesquisada e conduzida através do Genbank BLAST (N). A análise filogenética foi conduzida utilizando o programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007). A seqüência de rRNA foi submetida à base de dados do GenBank com número de acesso FJ713746.

4.2.3 Análise do cobre e biomassa bacteriana

O cobre total foi analisado utilizando espectrofotômetro de absorção atômica. Alíquotas do sobrenadante da cultura (200 µL) foram diluídas 20 vezes e analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica. A sorção do cobre foi calculada com a diferença entre o cobre total adicionado no meio e o cobre total remanescente no meio após os tratamentos com os isolados ($CuSor = CuTotal \text{ adicionado} - CuTotal \text{ após o crescimento}$).

A redução do cobre foi avaliada pela quantificação do cobre monovalente complexado com solução de 1 mM de neocuproína (Smith & McCurdy, 1952). As culturas foram centrifugadas (2.500 rpm, por 10 min.). Para a redução do cobre, alíquotas de 1 mL do sobrenadante da cultura de células livres foi adicionada à 2 mL de 1 mM neocuproína para complexar o Cu(I) e incubado à 30°C por 30 min. em tubos de cultura de vidro (13 x 100 mm). Após a incubação, foi determinada a absorbância utilizando espectrofotômetro de marca Jenway Genova Life Science Analyzer equipado com lâmpada de xenon à λ_{454} (Smith & McCurdy, 1952). O cobre bioissorvido e o cobre reduzido foram calculados a partir de curvas padrões com cobre (I ou II) com diluições entre (25 - 300 mg L⁻¹ de cobre) preparados em meio TSB.

4.2.4 Efeito da temperatura e pH

O efeito da temperatura e pH no crescimento do isolado NA, redução e sorção do cobre foram examinadas utilizando meio TSB contendo Cu(II) (100 mg L⁻¹). Para o efeito da temperatura, as culturas foram incubadas à 20, 25, 30,

35 e 40°C. Para o experimento em que foi avaliado a influência do pH, o meio TSB esterilizado contendo Cu(II) (100 mg L^{-1}) foi ajustado para pH 4, 5, 6, 7, 8 e 9 pela adição de quantidades pré-determinadas e esterilizadas de 1 M NaOH ou 0,1 M HCl. O inóculo foi preparado utilizando três alçadas do isolado NA de unidades formadoras de colônias em placas com TSA contendo Cu(II) (100 mg L^{-1}), e inoculados em meio TSB contendo 100 mg L^{-1} Cu(II). O inóculo foi incubado por 24 h à 30°C. As culturas foram inoculadas com 100 μL do inóculo ($\text{DO}_{600}=0,252$, diluído 10 vezes).

4.2.5 Efeito da concentração de cobre

Os efeitos das diferentes concentrações de Cu(II) foram determinados utilizando meio TSB contendo 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg L^{-1} de Cu(II), com três repetições independentes. Os meios estéreis com Cu(II) foram inoculados com alíquotas de 100 μL do isolado NA ($\text{DO}_{600}=0,222$, diluído 10 vezes) e incubados à 30°C por 24 h. A preparação do inóculo, análise do cobre, e determinação da biomassa foram descritas previamente.

4.2.6 Redução e sorção do Cu(II)

Avaliou-se a da remoção do cobre divalente pela sorção e redução em meio contendo Cu(II). Foi utilizado meio TSB contendo 100 mg L^{-1} de Cu(II). O meio foi inoculado com 100 μL do isolado NA ($\text{DO}_{600}=0,252$, diluído 10 vezes). As culturas foram incubadas à 30°C e analisadas em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h). A produção de biomassa, sorção e redução do cobre foram analisadas.

4.2.7 Avaliação da *P. putida* NA na biorremediação do cobre do solo

Um experimento com solo foi conduzido para avaliar a biorremediação do cobre do solo pelo isolado NA. O solo foi coletado à profundidade de 10 cm, no Campus da Universidade de Auburn de Montgomery, AL, USA. O solo foi seco ao ar e peneirado (peneira 3 mm) para remover material orgânicos da amostra e homogeneizar as partículas do solo, cuja composição é apresentada na Tabela 4.1. Para os estudos de remoção do cobre, o solo foi contaminado com 500 mg kg^{-1} de cobre na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, o qual foi dissolvido em água deionizada e homogeneizado no solo. O solo contaminado foi incubado à

temperatura ambiente por 10 dias, e também foi realizado o revolvimento do mesmo para equilibrar e distribuir as ligações dos íons de cobre ao solo. Posteriormente, o solo foi seco à 45°C e peneirado novamente (peneira de 3 mm). Alíquotas de solo (100 g) foram transferidas para frascos de plástico de volume de 200 mL. O solo foi umedecido à 80% da capacidade de campo pela adição de água deionizada e mantido à 35°C por 48 h para estabilização do solo. O inóculo foi produzido em três frascos, cada um contendo 600 mL de meio TSB inoculados com seis alças do isolado NA e incubado com agitação (150 rpm, 24 h, 30°C). As células foram coletadas por centrifugação (3.500 rpm, 10 min.), e ressuspensas em 1000 mL de solução salina (0,85% p/v). A densidade ótica do inóculo foi analisada ($DO_{600}=1,559$) utilizando-se um espectrofotômetro. Em paralelo, a umidade de cada solo nos frascos foi elevada à 100% da capacidade de campo e posteriormente tratada com 30 mL de água deionizada (controle) e 30 mL do inóculo. Os excedentes de água (acima da capacidade de campo) foram lixiviados por 4 h. Os solos com o inóculo e o controle foram incubados à 35°C por seis dias. Posteriormente, as amostras foram coletadas a cada dois dias por 4 h de lixiviamento após a adição de 30 mL de cada tratamento (água deionizada e inóculo). O peso de cada lixiviação foi determinado e cobre total e a produção de biomassa bacteriana foi analisada como descrito anteriormente.

TABELA 4.1. Características físicas e químicas do solo.

pH	CTC	MO	Areia	Silte	Argila	Ca	Mg	
1:1	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$		----- % -----			----- mg kg^{-1} -----		
5,1	4,7	1,1	63,75	20,45	15,8	190	127	
K	Na	Al	Fe	Mn	P	Zn	Cu	
			----- mg kg^{-1} -----					
88	71	144	43	7,3	3,9	2,2	1,9	

4.3 RESULTADOS

Sete bactérias resistentes ao cobre foram isoladas de áreas de vitivinicultura contaminadas com cobre e área de rejeito de mineração de cobre para este estudo. As Figuras 4.1A, 4.1B, 4.2A e 4.2B apresentam o perfil de resistência ao Cu(II), sorção e redução do cobre pelas 7 bactérias isoladas. Os isolados com a letra C foram isolados de Cambissolo, e isolados com a letra N foram isolados de Neossolo, ambos coletados de áreas vitivinícolas. Isolados com a letra R foram isolados de área de mineração de cobre. Os isolados C45, R1, R2, NC e NA apresentaram alta resistência ao Cu(II) com biomassa superior à 1,0 unidade de DO_{600} (Figura 4.1A). Os isolados C45, R100 e R2 foram mais resistentes ao Cu(II) com menos de 5% de inibição ao crescimento (Figura 4.2B) comparado aos seus crescimentos no mesmo meio de cultivo sem cobre. Por outro lado, os isolados C45, R100, NC e NA apresentaram a maior biorredução ao Cu(II) entre os isolados em estudo (Figure 4.2A). Em termos de biorremocão do cobre, o isolado NA foi mais eficiente (Figure 4.2B). Em geral, o isolado NA mostrou maior eficiência entre os outros isolados em estudo, e foi posteriormente caracterizado.

O isolado NA é uma cepa Gram-negativa. Em meio TSA e CN contendo cobre, as colônias formadas são amarelas e opacas. A bactéria foi identificada como *Pseudomonas putida* NA (com 98% de similaridade) pela análise da seqüência de genes da região 16S do rRNA. A Figura 4.3 apresenta a árvore filogenética mostrando a posição evolucionária da *Pseudomonas putida* NA (codificado como "sequence exported from chromatogram") entre os organismos relacionados, com o *Azotobacter beijerinckii* como organismo mais distante do grupo do isolado NA.

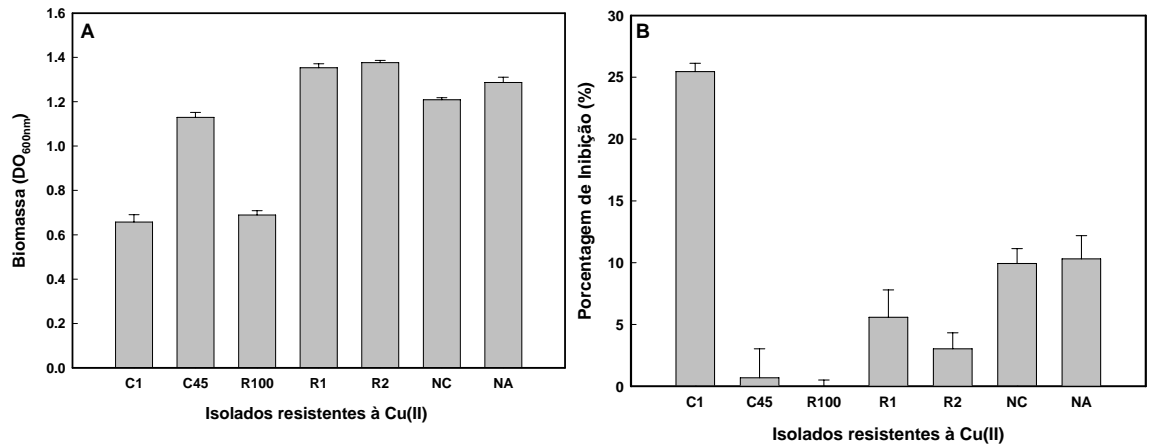


FIGURA 4.1. Produção de biomassa (A); e porcentagem de inibição (B) de sete bactérias isoladas de áreas contaminadas com cobre, incubadas em meio contendo 100 mg L⁻¹ de Cu(II) (CuSO₄) à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.

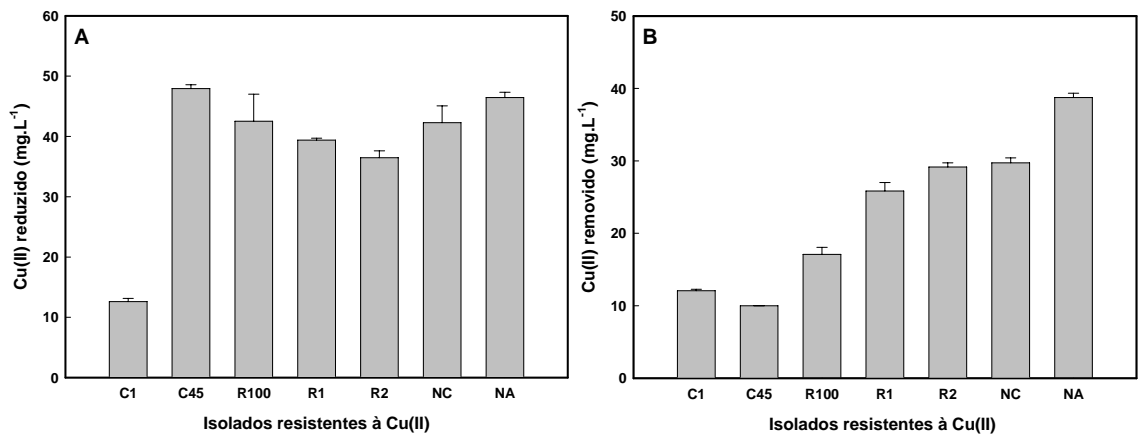


FIGURE 4.2. Cu(II) reduzido (A) e Cu(II) removido (B) por sete bactérias isoladas de áreas contaminadas com cobre, em meio TSB contendo 100 mg L⁻¹ de Cu(II) (CuSO₄) e incubadas à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.

A redução do Cu(II) e a sua relação com a produção de biomassa e sorção do Cu(II) é apresentado na Figura 4.4. O isolado NA obteve crescimento lento nas primeiras 8 h e depois cresceu rapidamente até 24 h de incubação. Um crescimento exponencial foi observado entre 6 e 24 h de incubação. A redução do cobre foi expressiva às 12 h e continuou aumentando até 24 h de incubação. Aproximadamente 20 mg L⁻¹ e 23 mg L⁻¹ de cobre foram reduzidos após 12 e 24 h de incubação, respectivamente. A sorção do cobre pelo isolado NA aumentou similarmente com o aumento da produção de biomassa durante

as 24 h de incubação. Após 12 e 24 h, 23,33 mg L⁻¹ e 21,66 mg L⁻¹ de cobre foram removidos, respectivamente.

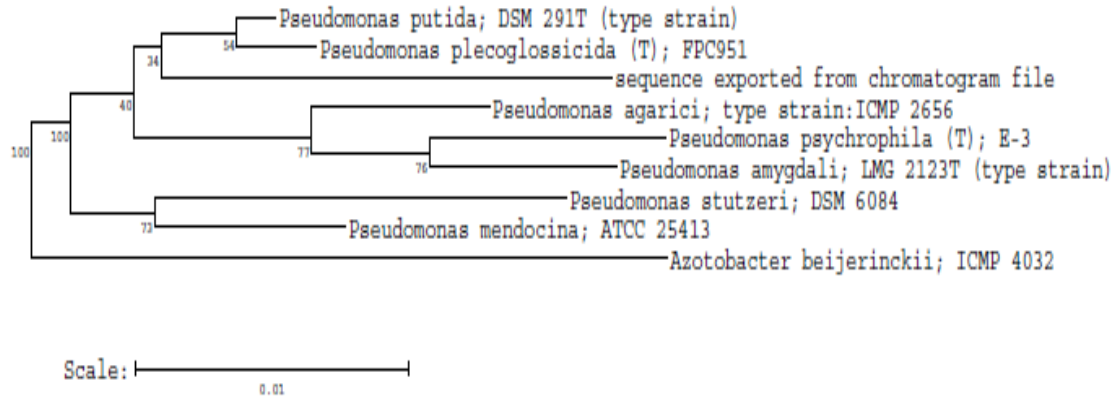


FIGURA 4.3. Árvore filogenética mostrando a distância do isolado *Pseudomonas putida* NA (codificada como "sequence exported from chromatogram") entre as bactérias relacionadas baseadas na seqüência do gene da região 16S rRNA (521 nucleotídeos). A escala é o valor da distância evolucionária. O número em cada nó é o bootstrap de 100 repetições.

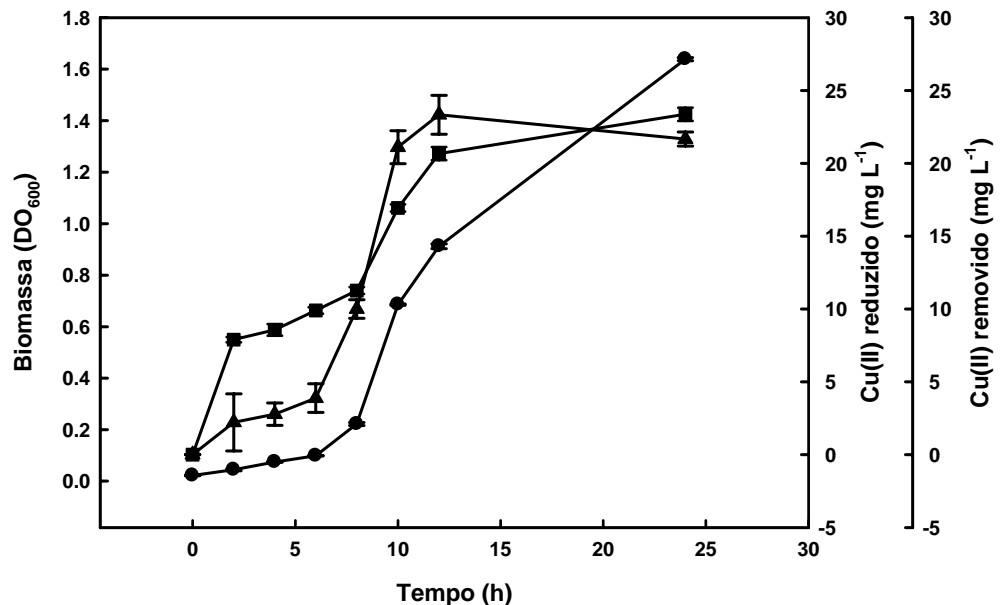


FIGURA 4.4. Produção de biomassa (●), redução do Cu(II) (■), e remoção do Cu(II) (▲) pelo isolado NA resistente à cobre em meio TSB contendo 100 mg L⁻¹ de Cu(II) (CuSO₄) e incubado à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.

Ocorreu uma relação inversa entre crescimento do isolado NA e a concentração de cobre no meio (Figura 4.5A). A redução e sorção de cobre

aumentaram com o aumento da concentração deste elemento. Na concentração mais alta (300 mg L⁻¹ de cobre) cerca de 111,87 mg L⁻¹ e 111,25 mg L⁻¹ de cobre foi reduzido e removido da solução, respectivamente (Figura 4.5B e 4.5C). O isolado NA transformou mais de 220 mg L⁻¹ de Cu(II) na mais alta concentração em estudo.

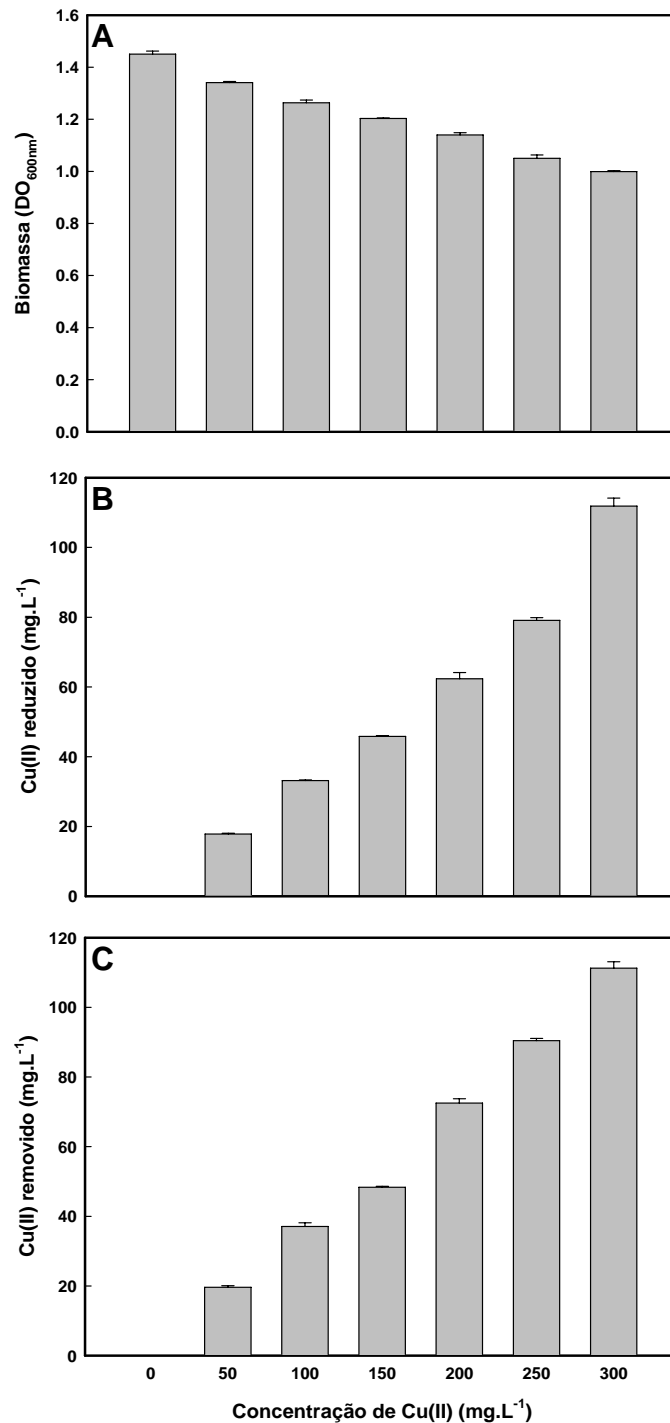


FIGURA 4.5. Efeito da concentração de Cu(II) sobre a produção de biomassa (A), redução do Cu(II) (B), e remoção do Cu(II) (C) em meio TSB à 30°C por 24 h. Barras apresentam o erro médio.

O efeito da temperatura na redução e remoção do Cu(II) é apresentada nas Figuras 4.6A e 4.6B, respectivamente. O crescimento do isolado NA foi substancial entre as temperaturas de 20 e 35°C. O crescimento ótimo do isolado em meio contaminado com cobre ocorreu à 30°C. A máxima redução e remoção do Cu(II) foi observada à 35°C (Figuras 4.6A e 4.6B, respectivamente). O isolado NA removeu altas concentrações de cobre entre as temperaturas de 30 e 35°C. À 35°C, mais de 41 mg L⁻¹ de Cu(II) foi removida.

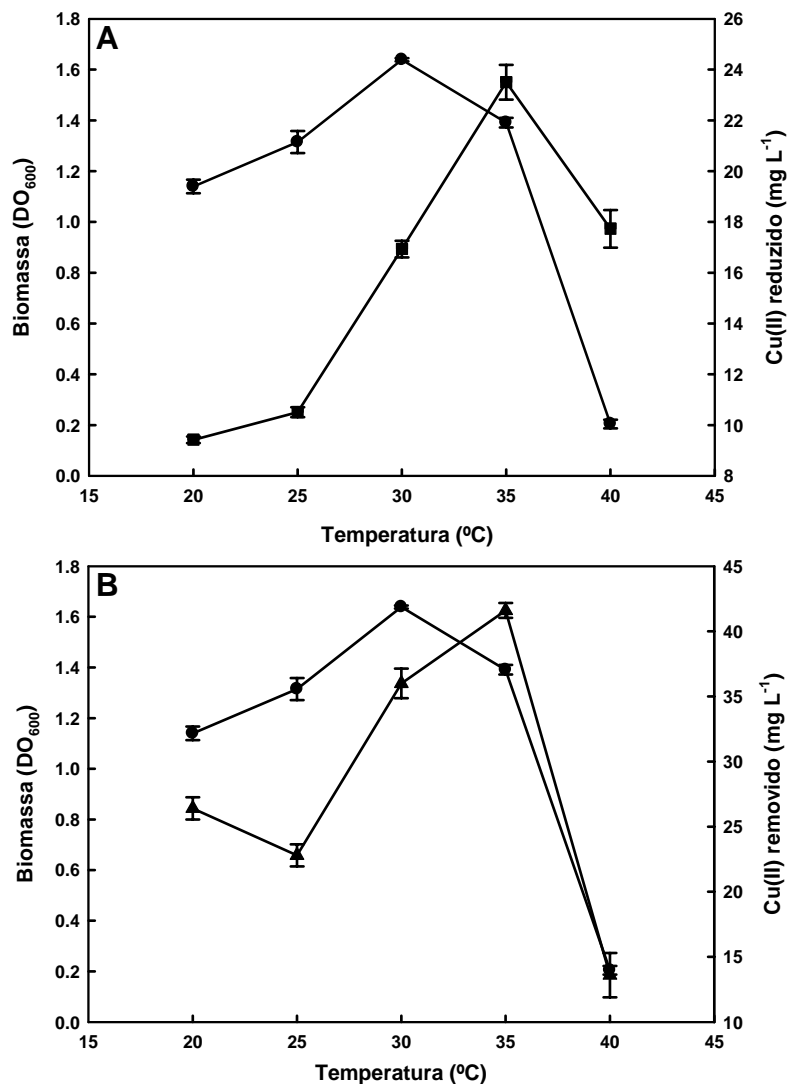


FIGURA 4.6. Efeito da temperatura produção de biomassa (●) e redução do Cu(II) (■) (A); e produção de biomassa (●) e remoção do Cu(II) (▲) (B), em meio TSB do isolado NA contendo 100 mg L⁻¹ de Cu(II) (CuSO₄) e incubado por 24 h. Barras apresentam o erro médio.

O efeito do pH inicial na produção de biomassa, redução, sorção do Cu(II) e no pH final do meio após 24 h de crescimento do isolado NA, está

resumido na Tabela 4.2. A redução do cobre foi significativa entre pH de 5,0 à 7,0 com pH ótimo à 5,0 (31,04 mg L⁻¹ de Cu(II) reduzido em 24 h). O isolado NA removeu Cu(II) substancialmente em uma faixa de pH entre 5,0 à 9,0 e ocorreu a máxima remoção do cobre em pH 6,0 (26,25 mg L⁻¹ de Cu(II) removido em 24 h). O isolado cresceu substancialmente entre pH 5,0 e 8,0, e o crescimento máximo ocorreu à pH 6,0 (1,866 unidades de DO). Ocorreu uma pequena mudança do pH inicial com o crescimento do isolado NA, mas não foi significativa. Não foi observado crescimento do isolado à pH 4,0, e não ocorreu redução do cobre neste pH.

TABELA 4.2. Efeito do pH produção de biomassa, redução e remoção do Cu(II) pelo isolado NA.

pH Inicial	Biomassa ----- DO _{600nm} -----	Cu(II) reduzido ----- mg L ⁻¹ -----	Cu(II) removido	pH Final
4,00	0,069±0,001*	00,00±0,001	2,29±0,481	3,79±0,057
5,00	1,847±0,029	31,04±1,042	22,92±0,524	5,59±0,009
6,00	1,866±0,009	20,74±0,228	26,25±0,208	6,45±0,032
7,00	1,639±0,006	16,93±0,327	21,67±0,481	7,26±0,011
8,00	1,189±0,003	7,34±0,208	21,25±1,156	7,96±0,013
9,00	0,745±0,007	4,85±0,097	24,79±1,069	8,74±0,009

*Valores médios ± erros médios.

A Figura 4.7 mostra a remoção do cobre e biomassa na solução lixiviada do solo contaminado com cobre inoculado com a suspensão do isolado NA. No tratamento controle com água destilada, a densidade de células decresceu depois de dois dias de incubação, até sua estabilização. A biolixiviação do cobre no solo tratado com água destilada (controle) aumentou gradualmente durante o período de tratamento. No solo inoculado com as culturas do isolado NA, a biomassa aumentou exponencialmente alcançando seu máximo ao quarto dia e posteriormente declinou. A biolixiviação do cobre do solo contaminado tratado com o isolado NA, aumentou rapidamente durante o período de tratamento e foi significativamente maior do que o tratamento controle. A biolixiviação total do cobre do solo tratado com o isolado NA foi superior à 18 mg kg⁻¹ e somente 8 mg L⁻¹ no tratamento controle com água destilada.

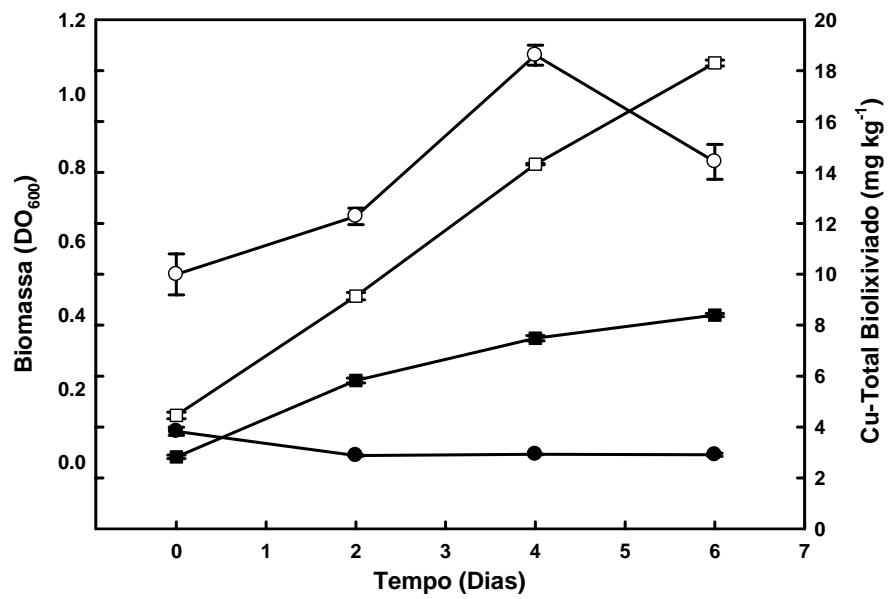


FIGURA 4.7. Biolixiviação de Cu(II) do solo contaminado com 500 mg kg^{-1} de Cu(II) (CuSO_4). Densidade de células em solo tratado com água (●), cobre total lixiviado em solo tratado com água (■); densidade de células em solo tratado com o isolado *P. putida* NA em suspensão de células (○) e cobre total biolixiviado em solo tratado com isolado *P. putida* NA em suspensão de células (□). Barras apresentam o erro médio.

4.4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo caracterizam os indicadores ambientais para a redução e remoção do Cu(II) por uma bactéria altamente resistente ao Cu(II), *Pseudomonas putida* cepa NA, purificada de um consórcio enriquecido de bactérias resistentes ao Cu(II). A produção de biomassa foi substancial em meio líquido contendo concentrações de cobre maiores que 100 mg mL^{-1} de Cu(II). A tolerância e sorção do cobre divalente pela *Pseudomonas putida* NA é maior do que observada em outra *P. putida* CZ1 tolerante à cobre e zinco, a qual tolerou concentrações de cobre entre uma faixa de 20 e 25 mg L^{-1} (Chen et al., 2005).

Fatores como pH, temperatura e concentrações afetam a eliminação biológica dos contaminantes. Estes fatores afetam o metabolismo geral da microbiota e promove ou inibe especificamente a atividade enzimática (Rodríguez-Montelongo et al., 2006; Whiteley & Lee, 2006) e sorção do Cu(II) (Chen et al., 2005; Tunali et al., 2006; Umrانيا, 2006; Özer et al., 2009). Em cultura de *P. fluorescens*, a presença de 20 mg L^{-1} de cobre reduziu as relações de O_2 , o qual pode interferir no metabolismo aeróbico das células (Poirier et al., 2009).

Foi observado crescimento substancial, redução e sorção de Cu(II) pela cepa NA em uma ampla faixa de temperatura ($20\text{-}35^\circ\text{C}$) com redução e sorção máximas à 35°C e com crescimento máximo à 30°C . Este comportamento é uma vantagem metabólica no tratamento de ambientes naturais contaminados, nos quais a temperatura pode variar. Em um estudo com o isolado *Enteromorpha prolifera*, a sorção do Cu(II) foi ótima à 25°C , com uma remoção significativa entre $20\text{-}30^\circ\text{C}$ (Özer et al., 2009).

A variação no pH influencia no grau de ionização das enzimas e conseqüentemente afeta a conformação e função da enzima (Farrell & Ranallo,

2000; Okeke 2008; Okeke et al., 2008). O pH é um dos mais importantes indicadores que afetam o processo de bioabsorção de metais pesados (Donmez & Aksu, 1999). A produção de biomassa, redução e sorção do Cu(II) pelas culturas de *P. putida* NA foram influenciadas pelo pH inicial do meio com máximo crescimento e remoção do Cu(II) em pH 6,0 e ótima redução à pH inicial 5,0. Ao contrário, a máxima sorção de Cu(II) foi observada à pH alcalino 9,0 em culturas de *Agaricus macrosporus* (Melgar et al., 2007). *P. aeruginosa* AT18 removeu 95,0% dos ions de Cu(II) à pH 6,25, com capacidade de absorção de 86,95 mg de Cu (II)/g de biomassa (Silva et al., 2009). Em outro estudo, uma faixa ótima de pH para a acumulação de Cu(II) ocorreu entre pH 4,0 e 5,0 em culturas de *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. pombe* e *Candida* sp. (Donmez & Aksu, 1999).

A relação de crescimento, redução e remoção de Cu(II) foram diretamente relacionadas à concentração de Cu(II). Com o aumento da concentração de Cu(II), ocorreu a diminuição do crescimento devido à seus efeitos tóxicos. Além disso, aumentando a concentração deste metal, aumentou a redução e remoção de Cu(II). Uma relação similar entre sorção e concentrações de cobre foi observado por Donmez & Aksu (1999). Altas concentrações de cobre aumentam a biodisponibilidade, e conseqüentemente aumenta a capacidade de biorremoção. O mesmo comportamento entre concentração e biorremoção de metais pesados foi reportada por Okeke et al., (2008); Okeke, (2008) e Camargo et al., (2004). Na maior concentração de cobre (300 mg L^{-1}), o isolado NA reduziu e removeu mais de 220 mg L^{-1} de cobre, indicando alta capacidade de biotransformação de Cu(II).

A capacidade da *P. putida* cepa NA para a remoção de cobre divalente do solo sobre condições naturais foi examinada. Foi observado uma lixiviação substancial no solo tratado com suspensão de células de *P. putida* NA. A lixiviação de cobre no tratamento controle pode ser atribuído ao cobre livre na solução e uma possível biolixiviação dos organismos naturais do solo com seis dias de incubação. A biolixiviação do solo utilizando *P. putida* NA foi significativamente maior do que no tratamento controle.

4.5 CONCLUSÕES

Neste estudo, a *P. putida* NA mostra alta tolerância, redução e remoção de Cu(II). A temperatura, pH e concentração de poluente têm marcada influência na capacidade de redução e remoção da *P. putida* NA. O isolado promove a lixiviação do cobre do solo. A alta tolerância ao Cu(II) e alta capacidade de redução e remoção do Cu(II) do isolado NA bem como sua utilização no solo, faz este isolado um organismo candidato para a remoção do Cu(II) em ambientes contaminados com cobre.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINI, M.; YOUNESI, H.; BAHRAMIFAR, N. Statistical modeling and optimization of the cadmium biosorption process in an aqueous solution using *Aspergillus niger*. **Colloids and Surface A: Physicochemistry Engineering Aspects**, Amsterdam, (2009), doi:10.1016/j.colsurfa.2008.11.053
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4°ED, Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, 1997, 694p.
- CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by an Actinomycete, *Arthrobacter crystallopoietes* ES 32. **Biological Trace Element Research**, Washington, v.97, p.183-194, 2004.
- CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; JACCQUES, R.J.S.; ROESCH, L.F.W.; FRANKENBERGER, W.T. Uso de microrganismos para a remediação de metais. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v.5, p.467-496, 2007.
- CASUCCI, C.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Effects of mercury on microbial biomass and enzyme activities in soil. **Biological Trace Element Research**, Washington, v.94, p.179-191, 2003.
- CERVANTES, C.; GUTIERREZ-CORONA, F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.14, p.121-138, 1994.
- CHEN, X.C.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; SHI, J.Y.; WU, W.X.; CHEN, Y.X. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.46, p.101-107, 2005.
- CHEN, H.; YANG, B.; CHEN, X. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China. **FEMS Microbiology Research**, Amsterdam, 2006; (2007a), doi:10.1016/j.micres.2007.09.002.
- CHEN, X.C.; WU, W.X.; SHI, J.Y.; XU, X.H.; WANG, H.; CHEN, Y.X. Adsorption of copper and zinc on *Pseudomonas putida* CZ1: Particle concentration effect and adsorption reversibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.54, p.46–52, 2007b.
- COJOCARU, C.; DIACONU, M.; CRETESCU, I.; SAVIC, J.; VASIC, V. Biosorption of copper(II) ions from aqua solutions using dried yeast biomass. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, Amsterdam, v.335, p.181-188, 2009.
- DONMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v.35, p.135-142, 1999.
- FARRELL, S.O.; RANALLO, R.T. **Experiments in biochemistry, a hands-on approach**. Sanders, Philadelphia. 2000, 530p.

- FREITAS, O.; DELERUE-MATOS, C.; BOAVENTURA, R. Optimization of Cu(II) biosorption onto *Ascomyllum nodosum* by factorial design methodology. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, (2008), doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.001.
- GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bangor Gwynedd, v.223, p.1115-1122, 2006.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRAND, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York: Wiley; 1991. p.115-175.
- LU, Z.H.; SOLIOZ, M. Bacterial copper transport. **Advances in Protein Chemistry**, Washington, v.60, p.93-121, 2002.
- MELGAR, M.J.; ALONSO, J.; GARCÍA, M.A. Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Agaricus macrosporus*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.385, p.12-19, 2007.
- OKEKE, B.C.; LAYMON, J.; CRENSHAW, S.; OJI, C. Environment and kinetic parameters for Cr(VI) bioreduction by a bacterial monoculture purified from Cr(VI)-resistant consortium. **Biological Trace Element Research**, Washington, v.123, p.229-241, 2008.
- OKEKE, B.C. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.35, p.1571-1579, 2008.
- ÖZER, A.; GÜRBÜZ, G.; ÇALIMLI, A.; KÖRBAHTI, B.K. Biosorption of copper(II) ions on *Enteromorpha prolifera*: Application of response surface methodology (RSM). **Chemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.146, p.377-387, 2009.
- POIRIER, I.; JEAN, N.; GUARY, J.C.; BERTRAND, M. Responses of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* to an excess of heavy metals: Physiological and biochemical aspects. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v.406, p.76-87, 2009.
- RODRIGUEZ-MONTELONGO, L.R.; VOLENTINI, S.I.; FARÍAS, R.N.; MASSA, E.M.; RAPISARDA, V.A. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.451, p.1-7, 2006.
- SARI, A.; MENDIL, D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Biosorption of palladium(II) from aqueous solution by moss (*Racomitrium lanuginosum*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.162, p.874-879, 2009.
- SILVA, R.M.P.; RODRÍGUEZ, A.A.; OCA, J.M.G.M.D.; MORENO, D.C. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.100, p.1533-1538, 2009.
- SMITH, C.F.; McCURDY Jr., W.H. 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline – New specific in spectrophotometric determination of copper. **Analytic Chemistry**, Washington, v.24, p.371-373, 1952.
- SOLIOZ, M.; STOYANOV, J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p.183-195, 2003.
- SOLIOZ, M.; VULPE, C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.21, p.237-241, 1996.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, p.1596-1599, 2007.

- TUNALI, S.; ÇABUK, A.; AKAR, T. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. **Chemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.115, p.203-211, 2006.
- UMRANIA, V.V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.97, p.1237-1242, 2006.
- UZEL, A.; OZDEMIR, G. Metal biosorption capacity of the organic solvent tolerant *Pseudomonas fluorescens* TEM08. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.100, p.542-548, 2009.
- VILAR, V.J.P.; MARTINS, R.J.E.; BOTELHO, C.M.S.; BOAVENTURA, R.A.R. Effect of Cu(II), Cd(II) and Zn(II) on Pb(II) biosorption by algae *Gelidium*-derived materials. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.154, p.711-720, 2008.
- VILAR, V.J.P.; MARTINS, R.J.E.; BOTELHO, C.M.S.; BOAVENTURA, R.A.R. Removal of Cu and Cr from an industrial effluent using a packed-bed column with algae *Gelidium*-derived material. **Hydrometallurgy**, Cape Town, v.96, p.42-46, 2009.
- VOSS, M.; THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.947-951, 2001.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.38, p.291-316, 2006.

CAPÍTULO IV

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Avena sativa* E *Plantago lanceolata* RESISTENTES AO COBRE

5.1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu(II)) é um elemento essencial a todos os seres vivos, porém tóxico, quando encontrado em altas concentrações no ambiente. As áreas vitivinícolas geralmente apresentam quantidades elevadas deste metal no solo. Isto ocorre devido às sucessivas aplicações de fungicidas que contêm na sua formulação sulfato de cobre (Nóvoa-Muñoz, et al., 2007). Desta forma, estes solos exercem uma grande pressão de seleção no ambiente, selecionando plantas e microrganismos resistentes aos contaminantes presentes nestes ambientes.

Em solos de áreas vitivinícolas do Rio Grande do Sul, a aveia é utilizada amplamente como proteção contra processos erosivos e também para a melhoria dos atributos físicos e químicos do solo, embora esta espécie apresente sintomas de toxicidade ao cobre (Santos et al., 2004). Baseado neste fato, sabe-se que em muitos casos a fitorremediação pode não ser tão eficiente na remoção de metais pesados destes ambientes contaminados, quanto à utilização de microrganismos. Deste modo, tem-se estudado a ação dos microrganismos na remoção de metais de ambientes contaminados (Atlas & Bartha, 1997; Clausen, 2000; Voss & Thomas, 2001; Chen et al., 2005a; Uslu & Tanyol, 2006; Melgar et al., 2007; Vilar et al., 2007; Grimm et al., 2008). Além disso, microrganismos isolados da rizosfera das plantas presentes em áreas contaminadas podem ser mais eficientes na adsorção de cobre, como ocorreu com o *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., isolados da rizosfera de trigo (Voss & Thomas, 2001).

Além da seleção de microrganismos resistentes da rizosfera de plantas que sobrevivem em locais contaminados com cobre, também é necessário o estudo das condições ambientais que afetam a biota como o pH, a temperatura, a concentração do contaminante e a quantidade de inóculo

resistente (Shakoori et al., 2000; Umrana, 2006) para a biorremediação destes locais. Baseado neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos resistentes a este metal, do solo da rizosfera de aveia preta e transagem, oriundas de áreas de produção vitivinícola do Rio Grande do Sul contaminadas com cobre. Também foram avaliadas as condições ambientais como concentrações de metal, pH e temperatura ótima para o crescimento dos isolados resistentes, bem como a sorção deste metal em meio líquido.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório do Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. As amostras de plantas e solos foram coletadas na Estação Experimental da EMBRAPA de Bento Gonçalves, RS, em áreas de vitivinicultura com quarenta anos de cultivo.

5.2.1 Amostras de solo

Os solos em que foram coletadas as plantas de transagem e aveia preta foram classificados como NEOSSOLO Litólico distrófico típico e CAMBISSOLO Húmico alumínico típico (Streck et al., 2002), respectivamente. O solo foi coletado com a presença das plantas e levados ao Laboratório, onde foi separado solo da rizosfera das plantas para isolamento dos microrganismos e solo não rizosférico para análise química (Tabela 5.1).

Os indicadores físico-químicos de solo como pH, capacidade de troca de cátions (CTC), matéria orgânica (MO), argila e cobre solúvel em ácido, foram determinados pelas metodologias descritas por Tedesco et al., (1995). O cobre solúvel em água ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})$) foi extraído de 10 g de solo em 20 mL de água destilada, com agitação por 60 min. Após a agitação, o cobre foi quantificado em espectrofotômetro de absorção atômica. Os solos da rizosfera foram separados e armazenados em geladeira, para posterior isolamento dos microrganismos.

TABELA 5.1. Características químicas e físicas dos solos da rizosfera de plantas de aveia preta (Cambissolo) e transagem (Neossolo).

Solos	pH	CTC	MO	Argila	Cu	Cu (H ₂ O)
	1:1	cmol _c kg ⁻¹	----- g kg ⁻¹	-----	mg kg ⁻¹	mg L ⁻¹
Cambissolo	6,9	16,5	64,0	22	238	10
Neossolo	6,5	19,5	54,0	17	442	16

5.2.2 Isolamento de bactérias resistentes ao cobre

O isolamento de bactérias resistentes ao cobre foi realizado em 99 mL de caldo nutriente (CN) (5 g de Peptona e 3 g de extrato de carne) em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, os quais 500 mg L⁻¹ de Cu(II) na forma de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) foi adicionado e ajustado o pH à 7,0. O CN foi esterilizado em autoclave à 121°C por 20 min. As amostras de solo foram usadas independentemente para inocular (1% p/v) meio estéril contendo Cu(II) e incubado por 24 h, com agitação (150 rpm) à 30°C. Subseqüentemente, 1 mL de cultura enriquecida foi utilizado para inocular 99 mL de meio estéril contendo Cu(II) e incubado por 24 h, com agitação (150 rpm) à 30°C. Este procedimento foi repetido duas vezes. Bactérias resistentes ao Cu(II) foram purificadas por estriamento em placas de Agar nutriente (AN) contendo Cu(II) (500 mg L⁻¹). Estas colônias foram diferenciadas quanto às características morfológicas (Neder, 1982).

5.2.3 Análise de resistência ao Cu(II) e cobre remanescente

Os isolados foram avaliados quanto a produção de biomassa e cobre remanescente no meio como descrito a seguir. Os inóculos foram preparados pela transferência de três alçadas de cada isolado para o meio CN contendo 500 mg L⁻¹ de cobre e incubados por 24 h à 30°C com agitação (150 rpm). Após 24 h de incubação, cada inóculo foi ajustado a concentração de biomassa, com solução salina (0,85%) estéril à densidade ótica de 0,85 (DO₆₀₀). Em experimento paralelo, 0,1 mL de cada inóculo foi utilizado para inocular 20 mL de meio CN contendo 500 mg L⁻¹ Cu(II) em Erlenmeyer de 50 mL e incubado (24 h, 30°C, 150 rpm). A biomassa (densidade de células) foi determinada pela leitura da absorbância à DO₆₀₀ das culturas apropriadamente diluídas.

O cobre remanescente foi determinado pela quantificação do cobre no sobrenadante das culturas de células livres utilizando espectrofotômetro de

absorção atômica (Perkin-Elmer 2380). Em seguida, 5 mL das culturas foram centrifugadas (10.000 rpm, 10 min). Alíquotas do sobrenadante das culturas (1000 µL) foram diluídas 20 vezes e analisadas com o aparelho.

5.3.4 Identificação dos isolados

Os isolados foram identificados com base no seqüenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S como será descrito. Os isolados foram cultivados pela técnica de esgotamento sobre AN incubados por 24 h à 30°C. O DNA foi extraído de unidades formadoras de colônias crescidas na placa de AN utilizando o Kit Promega Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI) com pequenas modificações. Resumidamente, as células foram suspensas em 300 µL de solução de lise de ácidos nucléicos, incubado à 80°C por 15 min. e alocado à temperatura ambiente para resfriamento. Após, foi adicionado a solução de RNase (1,5 µL) e incubado à 37°C por 60 min. A solução de precipitação de proteínas (100 µL) foi adicionada e incubada em gelo por 5 min. Seguido de centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo e foi adicionado álcool 95% e mantido em gelo. O precipitado foi recuperado por centrifugação. O pélete foi lavado com álcool 70% à temperatura ambiente e ressuspenso em água destilada livre de nuclease.

Os oligonucleotídeos iniciadores universais correspondem às posições na *E. coli*, o 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), foram utilizados para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal em PCR (Lane, 1991). A mistura de reação de PCR consistiu em 12,5 µL de PCR master mix (Promega, Madison, WI), amostra de DNA genômico (0,5 µL), oligonucleotídeo iniciador 27F (2,5 µL=12,5 pmol), oligonucleotídeo iniciador 1492R (2,5 µL=12,5 pmol) e completado a um volume final de 25 µL com água livre de nucleases. O gene rRNA da região 16S foi amplificado utilizando 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial, 95°C por 5 min.; desnaturação subsequente, 95°C por 0,5 min.; temperatura de anelamento, 50°C por 1 min.; temperatura de extensão, 72°C por 1 min. e extensão final, 72°C por 5 min.). A amplificação do produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. Unidades de filtros Millipore Montage PCR (Millipore, Billerica, MA) foram utilizadas para a remoção de oligonucleotídeos iniciadores, sais, e dNTPs incorporados de

acordo com as instruções do fabricante. O ciclo de seqüenciamento de DNA foi utilizando BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) com oligonucleotídeo iniciador para o seqüenciamento 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') em reações independentes (UCR Genomics Institute, Riverside, CA).

5.2.5 Efeito da concentração de cobre

O efeito das diferentes concentrações de Cu(II) foram determinados utilizando meio CN contendo 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250 mg L⁻¹ de Cu(II). Os meios estéreis com Cu(II) foram inoculados com alíquotas de 100 µL e incubados com agitação (150 rpm), à 30°C por 24 h . A preparação do inóculo, análise do cobre, e determinação da biomassa foram descritas previamente.

5.2.6 Efeito da temperatura e pH

O efeito da temperatura e pH no crescimento dos isolados e cobre remanescente foram avaliadas utilizando meio CN contendo Cu(II) (500 mg L⁻¹). Para o efeito da temperatura, as culturas foram incubadas à 25, 30, 35 e 40°C. Já para o experimento em que foi avaliado a influência do pH inicial, o meio CN esterilizado e foi ajustado para pH 3, 5, 7, 9 e 11 pela adição de quantidades pré-determinadas e esterilizadas de NaOH 1 M ou HCl 0,1 M. A preparação do inóculo, análise do cobre, e determinação da biomassa foram descritas previamente.

5.3 RESULTADOS

Os isolados da rizosfera de plantas de aveia preta e de transagem foram identificados com base no seqüenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S (Tabela 5.2). Na fase de isolamento foram obtidos nove microrganismos resistentes ao cobre, sendo seis isolados da rizosfera de plantas aveia preta e três isolados da rizosfera de transagem. Entre estes microrganismos foram utilizados neste trabalho os quatro isolados com melhor crescimento inicial em meio contendo 500 mg L⁻¹ de cobre. Estes isolados foram identificados como *Pseudomonas putida* (A1), *Stenotrophomonas maltophilia* (A2) e *Acinetobacter calcoaceticus* (A6 e T5).

TABELA 5.2. Identificação dos isolados da rizosfera de Aveia preta (A1, A2 e A6) e de Transagem (T5) com base no seqüenciamento do gene do rRNA da região 16S.

Isolados	Hospedeiro	Nº acesso	Identificação	Similaridade --- % ---
A1	Aveia	AF509331.1	<i>Pseudomonas putida</i>	98
A2	Aveia	DQ122226.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98
A6	Aveia	AY346313.2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	95
T5	Transagem	AY346313.2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	95

Em geral, todos os isolados reduziram o crescimento com o aumento da concentração de cobre (Figura 5.1). Os isolados A1 e A6 obtiveram o mesmo comportamento quando expostos às diferentes concentrações de cobre, resistindo somente até a concentração de 750 mg L⁻¹ de cobre. Por outro lado, o isolado A2 apresenta produção de biomassa superior aos demais em todas as concentrações de cobre, seguido do isolado de transagem (T5). Além disso, somente estes dois isolados sobreviveram às concentrações de 1000 mg L⁻¹ de cobre em meio líquido. Nenhum dos isolados em estudo sobreviveu às doses de 1250 mg L⁻¹ de cobre.

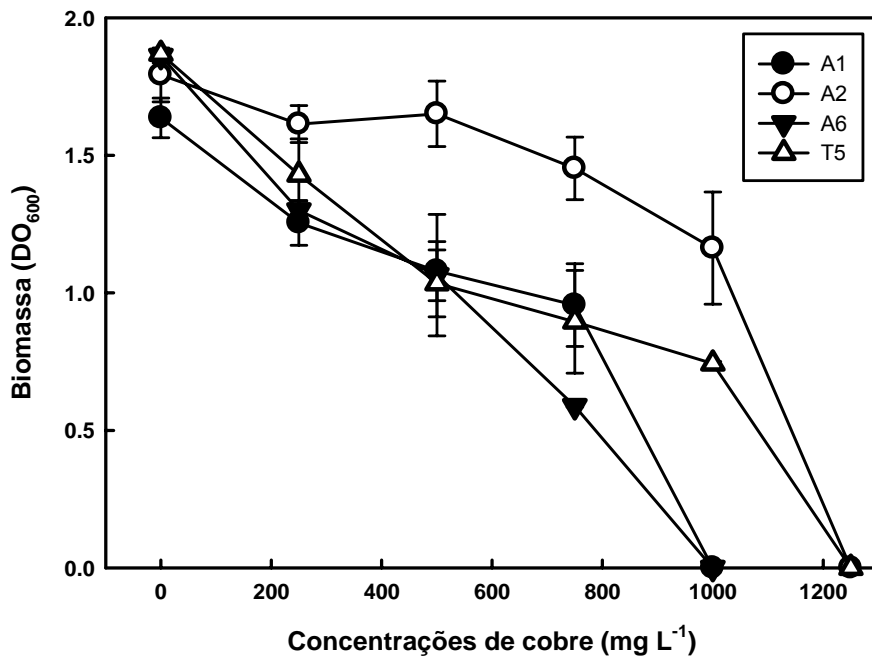


FIGURA 5.1. Caracterização dos isolados quanto à resistência ao cobre dos isolados da rizosfera de transagem (T5) e aveia preta (A1, A2 e A6) em diferentes concentrações de cobre em meio líquido, quantificadas pela produção de biomassa (DO_{600}). Barras apresentam o erro médio.

Entre as diferentes temperaturas, os isolados A2, A6 e T5 apresentaram alta produção de biomassa entre as temperaturas de 25 e 30°C (Figura 5.2). Por outro lado, somente o isolado A1 obteve sua máxima produção de biomassa aos 35°C (mais de 1,4 unidades de DO_{600}), com a maior produção entre todos os isolados em estudo e entre todas as temperaturas utilizadas. Nenhum dos isolados sobreviveu à temperatura de 40°C.

O pH inicial ótimo para a produção de biomassa pelos isolados foi o pH 7,0 (Figura 5.3). Não foi verificado crescimento dos isolados no pH mais ácido (pH 3,0). Por outro lado, somente o isolado A1 apresentou crescimento satisfatório no pH inicial 11 (1,1 unidades de DO_{600}), sendo que o isolado A6 sobreviveu a este pH, mas sua produção de biomassa foi mínima (0,2 unidades de DO_{600}). Também pode ser observado que o isolado A2 é sensível a mudança de pH, com alta produção de biomassa em pH 7,0 (1,4 unidade de DO_{600}). Os isolados A6 e T5 apresentaram comportamento semelhante em relação aos diferentes pHs (Figura 5.3A), sendo que estes isolados pertencem a mesma espécie (*Acinetobacter calcoaceticus*). De acordo com a Figura 5.3B,

foi observado que todos os isolados alcalinizam o pH após o crescimento. Para o isolado A1, foi observado que ele não conseguiu sobreviver em pH 5,0, mostrando-se altamente dependente de pHs próximos a neutralidade. Por outro lado, o isolado A2 não conseguiu modificar o pH do meio para produzir biomassa satisfatoriamente (Figura 5.3A e 5.3B), mostrando dependência de pHs neutros.

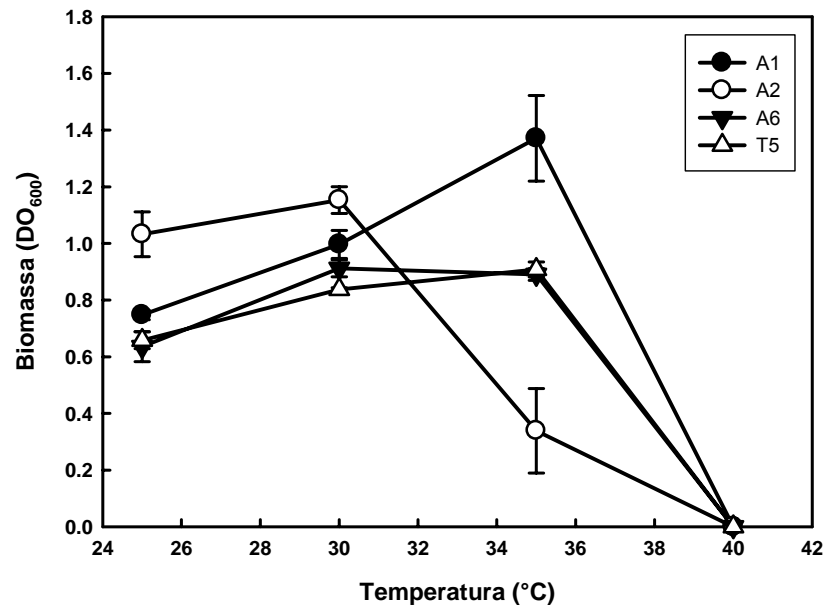


FIGURA 5.2. Caracterização dos isolados quanto à resistência ao cobre dos isolados da rizosfera de transagem (T5) e aveia preta (A1, A2 e A6) em diferentes temperaturas em meio líquido contendo 500 mg L⁻¹ de cobre, quantificadas pela produção de biomassa (DO₆₀₀). Barras apresentam o erro médio.

O perfil de resistência e a capacidade de remoção do cobre em meio líquido contendo 500 mg L⁻¹ de cobre foram avaliados (Figura 5.4). Os isolados apresentam comportamento semelhante na produção de biomassa, embora caracterizou-se dois grupos de crescimento. O primeiro grupo, os isolados A6 e T5, obtiveram o seu maior crescimento após 9 horas de incubação (1,1 – 1,2 unidades de DO₆₀₀), posteriormente reduzindo seu crescimento. Por outro lado, o segundo grupo dos isolados A2 e A1, apresentam seu maior crescimento após 24 horas de incubação (1,2 e 0,9 unidades de DO₆₀₀, respectivamente). Nos dois grupos a fase exponencial de crescimento ocorreu até 9 horas de incubação (Figura 5.4A).

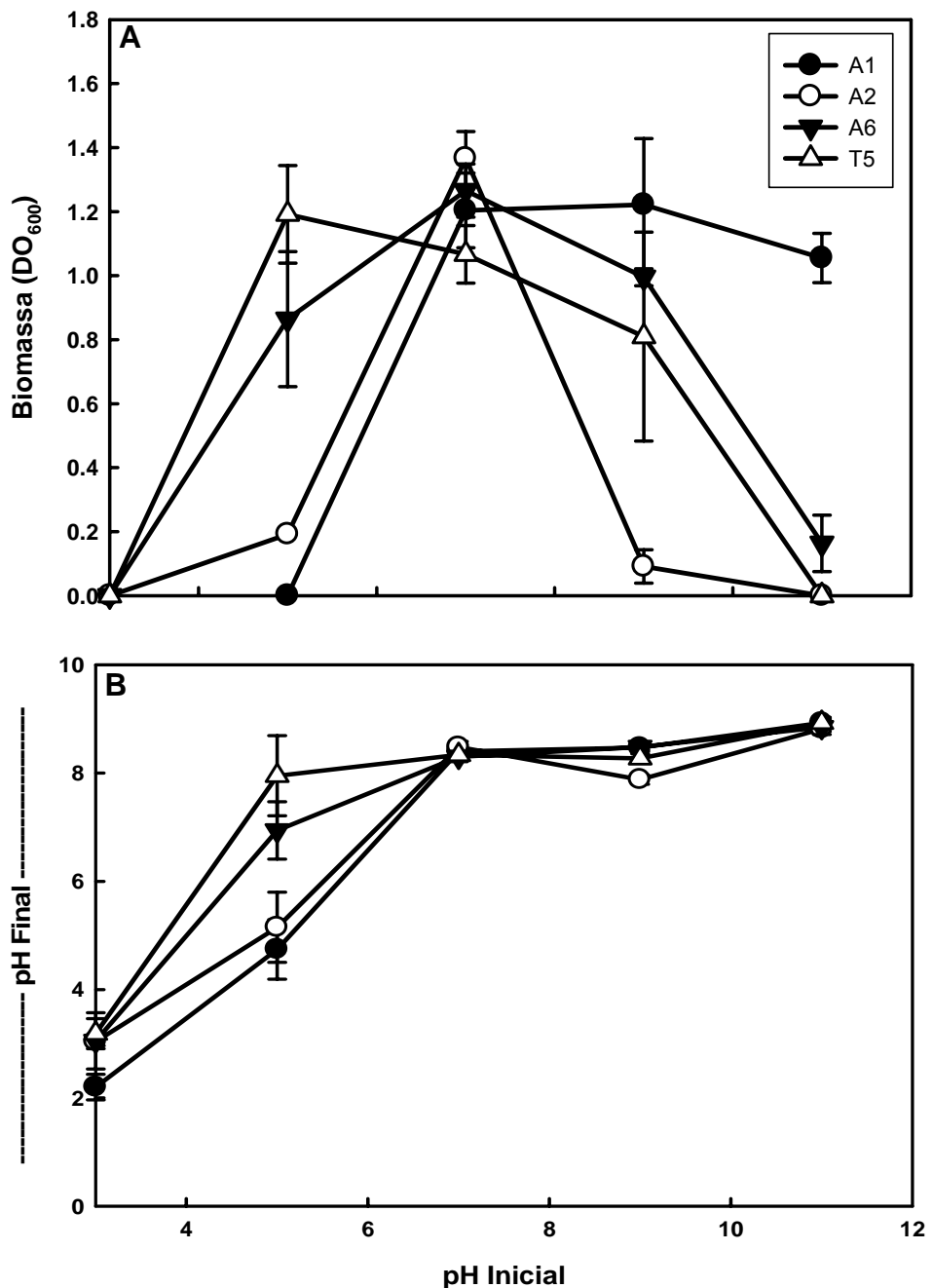


FIGURA 5.3. Efeito do pH inicial sobre os isolados da rizosfera de aveia preta (A1, A2 e A6) e transagem (T5) em diferentes pH, quantificadas pela produção de biomassa (DO₆₀₀) após 24 h de incubação (30°C, 150 rpm) (A); efeito do crescimento dos isolados no pH final do meio após 24 horas de incubação nos diferentes pHs em estudo (B). Barras apresentam o erro médio.

Os quatro isolados em estudo apresentaram comportamento semelhante para a remoção do cobre. A maior taxa de remoção de cobre em meio líquido ocorreu nas primeiras nove horas de crescimento (remoção maior que 25% do cobre total, ou 125 mg L⁻¹ de cobre). A retirada do cobre pelos isolados foi

avaliada juntamente com a curva de crescimento microbiano, não sendo verificada a mesma tendência. Isto porque entre os isolados, ocorreu uma tendência de sorção similar com o passar do tempo. Em média, os isolados apresentaram capacidade de remoção de cobre do meio contaminado de até 30% do cobre total (ou 150 mg L^{-1}) do meio líquido em 24 horas. (Figura 5.4B).

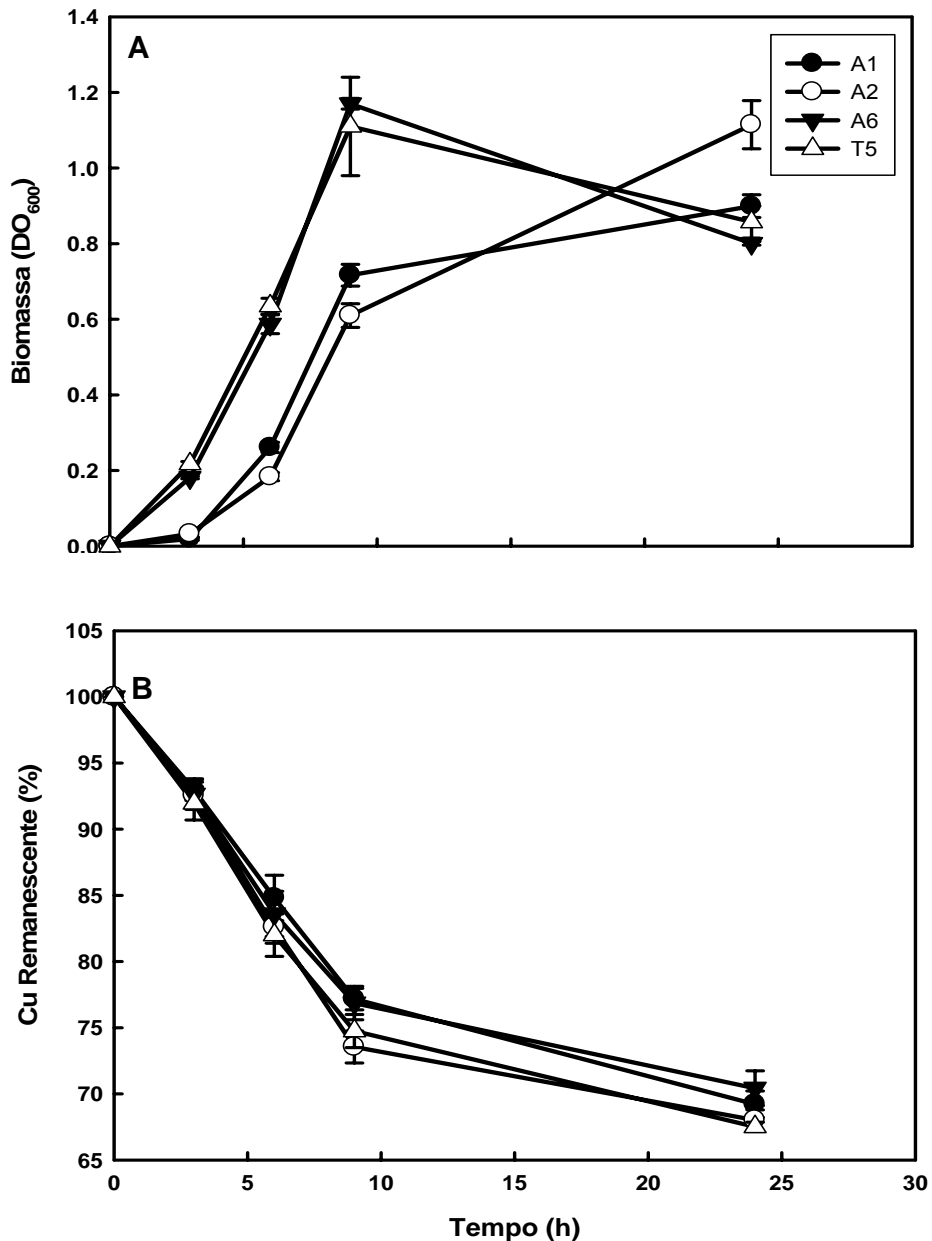


FIGURA 5.4. Produção de biomassa pelos isolados da rizosfera de aveia preta (A1, A2 e A6) e transgênia (T5) durante 24 horas (à 30°C , 150 rpm), quantificadas pela DO_{600} (A); e porcentagem de cobre remanescente em meio líquido contendo 500 mg L^{-1} de cobre, durante 24 horas (B). Barras apresentam o erro médio.

5.4 DISCUSSÃO

Este estudo caracteriza o isolamento e a influência de fatores ambientais na resistência de três isolados da rizosfera de aveia preta e um da rizosfera de transagem, bem como a remoção do cobre pelos isolados resistentes. A mesma espécie do isolado A2 identificado como *S. maltophilia*, foi encontrada por outros autores, em trabalho com resistência a metais pesados (Pages et al., 2008), bem como a espécie do isolado A1 (*P. putida*) (Chen et al. 2005b; Clausen, 2000; Uslu & Tanyol, 2006; Chen et al., 2007). Além disso, já foi caracterizada a resistência e utilização da espécie *A. calcoaceticus*, representada pelos isolados A6 e T5, para a biorremediação de locais contaminados com metais como cromo (Clausen, 2000; Zakaria et al., 2007), cobre e arsênio (Clausen, 2000) e em locais contaminados com compostos aromáticos (Thangaraj et al., 2008). O desenvolvimento da biomassa pelos isolados foi substancial em meio líquido contendo concentrações de cobre maiores que 500 mg mL^{-1} de Cu(II). A tolerância e sorção do cobre divalente pelos isolados foram maiores do que observada em outro trabalho com *P. putida* CZ1 tolerante à cobre e zinco, a qual somente tolerou concentrações de cobre entre uma faixa de 20 e 25 mg L^{-1} (Chen et al., 2005b).

Fatores como o pH, temperatura e concentrações de poluentes afetam o metabolismo geral da microbiota e promove ou inibe especificamente a atividade enzimática (Whiteley & Lee, 2006; Rodrigez-Montelongo et al., 2006) e a biossorção do Cu(II) (Chen et al., 2005b; Umrانيا, 2006; Tunali et al., 2006; Özer et al., 2009). Em cultura de *P. fluorescens*, a presença de 20 mg L^{-1} de cobre reduziu as relações de O_2 , o qual pode interferir com o metabolismo aeróbio da célula (Poirier et al., 2009). Neste estudo, o isolado A1 (*P. putida*) removeu cerca de 150 mg L^{-1} de cobre após 24 h de crescimento em meio contendo 500 mg L^{-1} de cobre.

A temperatura é um fator importante principalmente em relação à velocidade das reações químicas e bioquímicas no meio. Isto favorece a capacidade de adaptação dos microrganismos ao meio. As temperaturas médias de crescimento encontradas foram entre 25 e 30°C, sendo similares às temperaturas ótimas para a remoção de cobre por *P. putida* quando submetida a altas concentrações do metal (Uslu & Tanyol, 2006). O isolado A1 deste estudo, identificado também como *P. putida* obteve seu desenvolvimento ótimo quando submetidos à temperatura de 35°C. Esta espécie tem grande resistência à metais pesados e é utilizada na biorremediação de locais contaminados (Clausen, 2000; Uslu & Tanyol, 2006; Chen et al., 2007).

Alguns autores afirmam que o pH pode ser considerado como ponto chave na variabilidade da especiação química dos metais no meio, podendo ser utilizado como referência para saber em quais formas o cobre pode se encontrar no ambiente, conhecendo o potencial tóxico deste elemento (Twiss et al., 2001). Em estudo semelhante a este trabalho, quando ocorreu alteração do pH 5,0 para 3,0, as espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* diminuíram a biossorção do Cu(II) e Mn(II) (Voss & Thomas, 2001). Isso demonstra que o pH é importante na biodisponibilidade e na toxidez do cobre, deixando este elemento mais tóxico com a variação do pH (Twiss et al., 2001). Todos os isolados em estudo, mantiveram os valores de pH após 24 horas de incubação em torno de 7,5 - 8,2. O pH do meio influenciou no crescimento dos isolados, pois em geral, apresentaram melhor crescimento em meio neutro e somente o isolado T5, cresceu em pH 5,0, seguido do isolado A6. Isto pode ser explicado pela semelhança genética dos dois isolados, pois ambos foram identificados como *A. calcoaceticus*. O aumento do pH deve-se a troca do Cu(II) que estava complexado ou ligado com outros compostos orgânicos (COO⁻) existentes no meio, pelo íon H⁺, diminuindo a concentração de hidrogênios livres, aumentando o pH da solução contendo cobre (Vilar et al., 2007).

A maior sorção do cobre pelos isolados neste trabalho foi de 150 mg L⁻¹. As quantidades removidas neste trabalho são superiores às removidas em trabalhos realizados por outros autores, como de 32 mg L⁻¹ por um isolado de *P. putida* (Chen et al., 2007) e 16 mg L⁻¹ de cobre por um isolado *A. calcoaceticus* (Clausen, 2000). Embora a espécie *Bacillus licheniformis* seja altamente eficiente em remover 93% do cobre do meio (59 mg L⁻¹) (Clausen,

2000), ainda assim as concentrações removidas pelos isolados foram 2,5 vezes maiores comparados com o isolado estudado por Clausen (2000). Esta capacidade de sorção de cobre pode ser uma alternativa para a remoção do cobre do ambiente pelos microrganismos, tornando a biorremediação com bactérias resistentes uma prática viável em ambientes contaminados com cobre (Atlas & Bartha, 1997; Uslu & Tanyol, 2006; Vilar et al., 2007; Grimm et al., 2008). Pode-se dizer que organismos resistentes podem ser eficientes na remoção de metais pesados como o cobre, devido à sua capacidade de biossorção, se ligando ou absorvendo o metal.

5.5 CONCLUSÕES

Bactérias resistentes ao cobre isoladas de aveia preta *S. maltophilia* (A2), *P. putida* (A1) e *A. calcoaceticus* (A6) e de transagem *A. calcoaceticus* (T5) são encontrados no solo da região rizosférica de suas respectivas plantas hospedeiras. Estes isolados apresentam substancial resistência ao cobre nas diversas condições ambientais testadas. Todas as espécies em estudo são afetadas pelas condições de pH, temperatura e concentrações de cobre. Além disso, as concentrações de cobre retiradas do meio líquido pelos isolados em estudo são superiores aos trabalhos encontrados na literatura, mostrando alto potencial na utilização destes isolados para a biorremediação de áreas contaminadas com cobre.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**: Fundamentals and applications. 4ª ED, Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, 1997, 694p.
- CAMARGO, F.A.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.29, n.1-2, p.193-202, 2005.
- CHEN, Y.X.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; LUO, Y.M. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. **Environment International**, Witherslack, v.3, p.861-866, 2005a.
- CHEN, X.C.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; SHI, J.Y.; WU, W.X.; CHEN, Y.X. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.46, p.101-107, 2005b.
- CHEN, X.; SHI, J.; CHEN, Y.; XU, X.; CHEN, L.; WANG, H.; HU, T. Determination of copper binding in *Pseudomonas putida* CZ1 by chemical modifications and X-ray absorption spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.74, p.881-889, 2007.
- CLAUSEN, C.A. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. **Waste Management and Research**, Boca Raton, v.18, p.264-268, 2000.
- CONCEIÇÃO, D.P. **Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp. ES29**. 97f. 2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- GRIMM, A.; ZANZI, R.; BJÖRNBOM, E.; CUKIERMAN, A.L. Comparison of different types of biomasses for copper biosorption. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, p. 2559-2565, 2008.
- NEDER, R.N. **Microbiologia**: Manual de laboratório. 1ª ED. Nobel, São Paulo. 1992, 138p.
- NÓVOA-MUÑOZ, J.C.; QUEIJEIRO, J.M.G.; BLANCO-WARD, D.; ÁLVAREZ-OLLEROS, C.; MARTÍNEZ-CORTIZAS, A.; GARCÍA-RODEJA, E. Total copper content and its distribution in acid vineyards soils developed from granitic rocks. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.378, p. 23-27, 2007.
- ÖZER, A.; GÜRBÜZ, G.; ÇALIMLI, A.; KÖRBAHTI, B.K. Biosorption of copper(II) ions on *Enteromorpha prolifera*: Application of response surface methodology (RSM). **Chemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.146, p.377-387, 2009.
- PAGES, D.; ROSE, J.; CONROD, S.; CUINE, S.; CARRIER, P.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE**, Wyoming, v. 2, p.1-6, 2008.

- POIRIER, I.; JEAN, N.; GUARY, J.C.; BERTRAND, M. Responses of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* to an excess of heavy metals: Physiological and biochemical aspects. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v.406, p.76-87, 2009.
- RODRIGUEZ-MONTELONGO, L.R.; VOLENTINI, S.I.; FARÍAS, R.N.; MASSA, E.M.; RAPISARDA, V.A. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.451, p.1-7, 2006.
- SANTOS, H.P.; MELO, G.W.B.; LUZ, N.B.; TOMASI, R.J. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Comunicado Técnico nº49, Bento Gonçalves, RS, 2004. 10p.
- STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLANT, E.; NASCIMENTO, P.C.; SCHNEIDER, P. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS, UFRGS, 2002, 107p.
- TEDESCO, M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; WOLKWEIS, S. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2ªED. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1995. 1174p. Boletim Técnico, n. 5.
- THANGARAJ, K.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.99, n.7, p.2488-2494, 2008.
- TUNALI, S.; ÇABUK, A.; AKAR, T. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. **Chemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.115, p.203-211, 2006.
- TWISS, M.R.; ERRÉCALDE, O.; FORTIN, C.; CAMPBELL, P.G.C.; JUMARIE, C.; DENIZEAU, F.; BERKELAAR, E.; HALE, B.; REES, K.V. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, Bedfordshire, v.13, n.1, p.9-24, 2001.
- UMRANIA, V.V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.97, p.1237-1242, 2006.
- USLU, G.; TANYOL, M. Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.135, p.87-93, 2006.
- VILAR, V.J.P.; BOTELHO, C.M.S.; BOAVENTURA, R.A.R. Copper desorption from *Gelidium* algal biomass. **Water Research**, Oxford, v.41, n.7, p.1569-1579, 2007.
- VOSS, M.; THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.947-951, 2001.
- ZAKARIA, Z.A.; ZAKARIA, Z.; SURIF, S.; AHMAD, W.A. Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, Boston, v.146, n.2, p.30-38, 2007.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.38, p.291-316, 2006.

CAPÍTULO V

FITOEEXTRAÇÃO E FITOAUMENTAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS COM COBRE

6.1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo com metais pesados têm se tornado um problema grave, levando a perdas na agricultura e contaminando organismos vivos inclusive o homem. Além disso, os metais pesados não podem ser degradados e persistem no ambiente indefinidamente. Em solos de vitivinicultura, a adição de fungicidas à base de cobre é amplamente e constantemente utilizada para o combate de doenças foliares como o míldio e oídio (Peruch & Bruna, 2008), acumulando-se cobre no solo em altas concentrações. Em áreas de mineração de cobre, a contaminação de áreas adjacentes é inevitável, porém, áreas de deposição de rejeito de mineração, acentuam o problema, pois formam grandes áreas de deposição de um material com altas concentrações de cobre e são descartados no ambiente sem nenhum tratamento. Nesse contexto, é necessária a utilização de técnicas como a biorremediação para a recuperação destas áreas. A fitorremediação é um processo de biorremediação que utiliza plantas para remover metais pesados do ambiente pela absorção, acumulação ou transformação do metal em sua biomassa vegetal, sendo uma ferramenta de baixo custo e ambientalmente aceitável para a remediação de áreas contaminadas com metais pesados.

A aveia preta é uma planta de alta produção de massa e boa produção de grãos. Esta espécie tem sido utilizada como cobertura verde nos vinhedos, visando à proteção da superfície do solo contra o impacto direto da gota da chuva e redução do escoamento superficial e conseqüentemente melhora nos atributos físicos e químicos do solo. Contudo, em vários locais, a aveia preta e até mesmo outras espécies nativas, têm apresentado desenvolvimento baixo, clorose e morte de plantas, inviabilizando a produção e o manejo de cobertura verde nessas áreas pela alta concentração de cobre (Santos et al., 2004).

Devido à grande produção de massa vegetal, a aveia preta pode ser uma alternativa para a fitorremediação.

A fitorremediação está sendo amplamente utilizada para a biorremediação de metais pesados do solo em diferentes áreas contaminadas (Jiang et al., 2004; Chen et al., 2005; 2006; 2008; Ke et al., 2007; Sheng et al., 2008; Wang et al., 2008; Bhatti et al., 2009; Ma et al., 2009a; 2009b; 2009c). Porém, a fitorremediação pode apresentar baixa eficiência na remoção dos metais pesados do solo. Esta limitação pode ser diminuída quando é utilizada em conjunto com alternativas que envolvam o estímulo da microbiota rizosférica da planta, podendo ser uma estratégia mais eficaz a médio e longo prazo para a biorremediação *in situ* de locais contaminados com metais pesados (Khan et al., 2000). Em virtude disso, estão sendo utilizados microorganismos que possam promover a fitorremediação, onde a interação entre as raízes das plantas acumuladoras com os microorganismos podem auxiliar neste processo de fitorremediação (Chen et al., 2005; 2008; Khan, 2005; Madhaiyan et al., 2007; Wang et al., 2007; Dell'Amico et al., 2008; Kumar et al., 2008; Sheng et al., 2008; Xiong et al., 2008; Ma et al., 2009a; 2009b; 2009c). Estes microrganismos podem atuar diferentemente no auxílio da fitorremediação, onde eles podem favorecer a bioabsorção do metal, e conseqüentemente, reter na planta os metais pesados (Chen et al., 2008). Outros microorganismos podem produzir substâncias promotoras de crescimento, onde auxiliam o crescimento pela diminuição do impacto do estresse causado por concentrações tóxicas de metais pesados (Dell'Amico et al., 2008).

Bactérias promotoras de crescimento como *Enterobacter* sp. (Kumar et al., 2008), *Pseudomonas fluorescens* e *Microbacterium* sp. (Sheng et al., 2008), e *Achromobacter xylosoxidans* (Ma et al., 2009a) podem promover o crescimento de plantas pela produção de sideróforos, ácido indol acético e solubilização de fosfatos, auxiliando na fitorremediação, pelo melhor crescimento da planta e, conseqüentemente, maior absorção de metais pesados (Madhaiyan et al., 2007). A redução da toxicidade de metais pesados às plantas é outro mecanismo para melhora do crescimento das plantas em solos contaminados (Madhaiyan et al., 2007). Em virtude disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fitoextração do cobre por plantas de aveia preta em solos de vitivinicultura contaminados com cobre e em rejeito de

mineração de cobre, ambos em casa de vegetação. Além disso, a inoculação destas plantas com bactérias resistentes à cobre, isoladas da rizosfera de aveia preta, coletadas de áreas de vitivinicultura, foram testadas quanto à capacidade da fitorremediação do cobre destes solos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação e no Laboratório do Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. As amostras de solo de um Neossolo, de um Cambissolo e de mata nativa (Neossolo sem contaminação de cobre) foram coletadas na Estação Experimental da EMBRAPA Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS) em área de vitivinicultura com quarenta anos de cultivo. O rejeito de mineração de cobre foi coletado em áreas adjacentes às minas do Camaquã, em áreas de depósito deste rejeito. Os solos sob vitivinicultura foram classificados como NEOSSOLO Litólico distrófico típico e CAMBISSOLO Húmico alumínico típico (Streck et al., 2002). O solo foi coletado, seco ao ar e tamisado. Posteriormente, uma amostra de cada substrato foi realizada análise físico-química dos substratos conforme descrito na Tabela 6.1.

TABELA 6.1. Características químicas e físicas dos solos: Mata Nativa, Neossolo, Cambissolo e Rejeito.

Solo	pH	CTC	MO	Argila	Cu	Zn	Mn
	1:1	cmol _c kg ⁻¹	g kg ⁻¹	%	-----	mg kg ⁻¹	-----
Mata	5,8	15,5	4,2	25	3,8	8,1	59
Neossolo	6,3	17,2	2,6	19	207	19,0	55
Cambissolo	6,0	13,9	2,5	29	142	18,0	35
Rejeito	7,9	-	0,9	02	576	0,8	02
	Ca	Al	Mg	S	H + Al	P	K
	----- mg dm ⁻³ -----						
Mata	09,3	0,0	1,2	6,3	04,4	14	217
Neossolo	10,9	0,0	3,1	6,1	02,8	28	142
Cambissolo	07,8	0,0	2,1	5,9	03,5	27	167
Rejeito	24,2	0,0	1,7	-	12,3	32	32

6.2.1 Condições experimentais

Após a preparação e análise química e física dos solos, foram pesados subamostras de 1 kg e acondicionados em potes de plásticos com volume de

700 dm⁻³. Cada pote correspondeu a uma unidade experimental. Para a correção do pH, foi utilizado CaCO₃, para elevar o pH dos substratos à 6,5 quando necessário. Posteriormente, as unidades experimentais foram umedecidas com água deionizada à 80% da capacidade de campo, para a estabilização física dos substratos nos vasos. Os substratos utilizados foram: Mata Nativa; Neossolo; Cambissolo e Rejeito de mineração (40% do solo de Mata nativa e 60% de Rejeito).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. A aveia preta (*Avena sativa* L.) foi semeada com densidade de 20 sementes por vaso. Dez dias após a germinação das sementes, foi realizado desbaste mantendo-se quatro plantas por vaso até o final do experimento. As plantas foram irrigadas com água destilada todos os dias, para manter a umidade do solo próxima a 80% da capacidade de campo, obtida por pesagem. O experimento foi conduzido por 47 dias após a germinação das sementes.

6.2.2 Preparo do inóculo e inoculação

Os inóculos utilizados foram os isolados, avaliados e testados quanto à resistência ao cobre; A1 (*Pseudomonas putida*); A2 (*Stenotrophomonas maltophilia*) e A6 (*Acinetobacter calcoaceticus*) isolados da rizosfera de aveia (Capítulo anterior). Os isolados foram inoculados individualmente em 1000 mL de caldo nutritivo (CN) (5 g de peptona e 3 g de extrato de carne. E completado à 1 L, com água destilada) com três alças de inóculo crescidos previamente em placas de Petri com Agar nutritivo (AN) (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne e 15 g de Agar em 1 L de água destilada) contendo 300 mg kg⁻¹ de cobre (CuSO₄). Posteriormente, os frascos contendo CN com inóculo, foram incubados por 24 h à 30°C com agitação (150 rpm). Após o crescimento dos isolados, o inóculo foi levado à casa de vegetação, homogeneizado e inoculado 20 mL nos seus respectivos tratamentos: isolado A1 no Neossolo (NeoA1) e Cambissolo (CambA1); o isolado A2 no Neossolo (NeoA2) e Cambissolo (CambA2), e o isolado A6 no Neossolo (NeoA6) e Cambissolo (CambA6). A inoculação foi realizada em duas aplicações. A primeira inoculação foi realizada

aos 20 dias após a germinação (20 mL de inóculo) e a segunda aos 35 dias após a germinação (20 mL do inóculo).

6.2.3 Coleta, preparação e análise das plantas

Após 47 dias foi realizada a coleta total das plantas dos vasos de cultivo. As plantas foram devidamente fotografadas e etiquetadas antes e depois da separação das raízes do solo. Antes do corte das plantas, foi medida a altura de plantas. O solo foi separado das raízes com o auxílio de uma peneira de 3 mm e com a adição constante de água para a total remoção do solo aderido as raízes. Após este procedimento, as plantas foram separadas em parte superior (parte aérea), e parte inferior (radicular) por um corte no colo da planta para posterior análises físicas e químicas.

As quatro plantas por vaso foram medidas quanto à altura no dia da coleta, e posteriormente foi calculada a média entre as plantas. Após a pesagem da massa verde da parte aérea (MVPA) e radicular (MVR), as plantas foram secadas à 65°C em estufa com circulação de ar forçado, até peso constante. Após, foi realizado a pesagem da massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR), onde ambas foram trituradas para a análise química da massa seca.

Após a trituração da massa seca vegetal, foi realizada a análise química. Para análise do N, foi feita a cobertura das amostras com H₂O₂, H₂SO₄ e mistura de digestão, em bloco digestor, à temperatura de 310-330°C. Após decantação (6-12 horas), foi retirada uma alíquota (10-20 mL) do extrato para a determinação do NH⁴⁺, conforme Tedesco et al., 1995. A análise dos demais macronutrientes (P, K, Ca, e S) e dos micronutrientes (Zn, Cu, Mn e Fe) foi feita a cobertura das amostras com HNO₃ – HClO₄. O extrato foi deixado em repouso para decantação da sílica. A determinação dos nutrientes foi feita por espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES - Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry).

6.2.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise da variância e quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan $p < 0,05$.

Utilizou-se para a análise o programa estatístico SOC, desenvolvido pelo Núcleo Tecnológico para Informática NTIA/EMBRAPA (EMBRAPA, 1997).

6.3 RESULTADOS

Entre todos os tratamentos, o crescimento das plantas de aveia preta foram maiores no tratamento controle, sem contaminação de cobre (Mata Nativa), tendo altura média de 43 cm (Figura 6.1). Entre os tratamentos nos solos contaminados com cobre, os tratamentos inoculados com o isolado A1, tanto no Neossolo (NeoA1) quanto no Cambissolo (CambA1), a altura média de plantas foi superior aos demais tratamentos com média de 39 e 38 cm respectivamente, mostrando efeito positivo na inoculação das plantas de aveia. Outro isolado que obteve efeito positivo na altura média de plantas foi o isolado A2 quando inoculado ao Cambissolo (CambA2) com crescimento de mais de

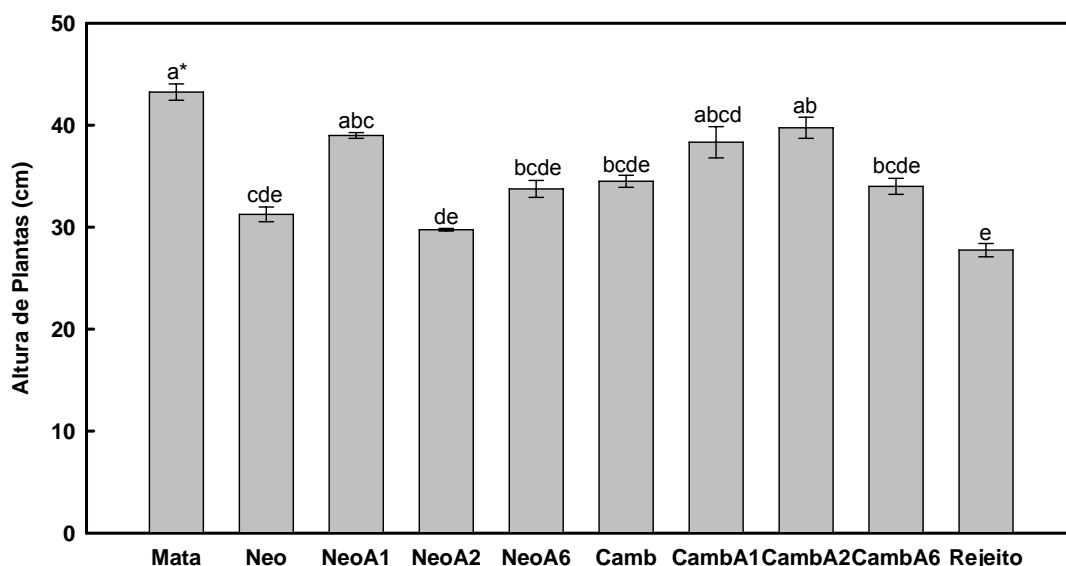


FIGURA 6.1. Altura de plantas de aveia após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos de vitivinicultura (Neossolo e Cambissolo). Barras indicam é o erro médio das médias. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ($p < 0,05$).

40 cm, não diferindo dos CambA1 e NeoA1 e também do tratamento controle positivo (Mata Nativa).

Entre os tratamentos, as plantas de aveia cultivadas em Neossolo e rejeito tiveram os menores valores MVPA, MVR, MSPA e MSR. Quando as plantas de aveia foram inoculadas com os isolados A1 e A6 no Neossolo (NeoA1 e NeoA6), ocorreu um aumento significativo da produção de MVPA 1,99 e 2,96 g, MSPA 0,33 e 0,46 g, MVR 2,47 e 3,96 g, e MSR 0,16 e 0,29 g respectivamente, onde as médias do isolado A6 não diferiram das médias do tratamento controle (Figura 6.2).

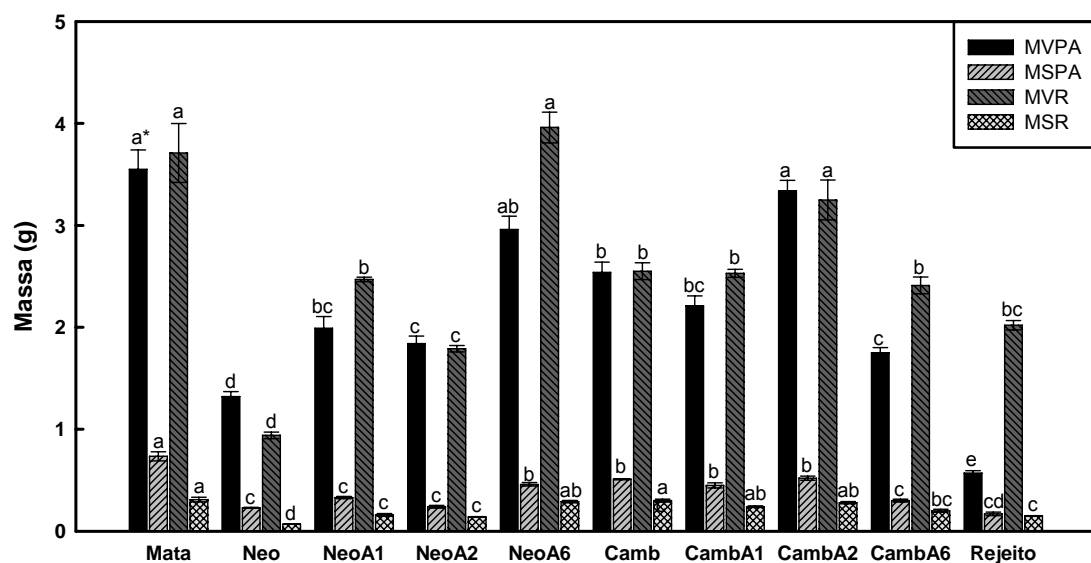


FIGURA 6.2. Massa verde (MVPA) e seca da parte aérea (MSPA), massa verde (MVR) e seca radicular (MSR) de plantas de aveia, após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração de cobre (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados: A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos de vitivinicultura (Neossolo e Cambissolo). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ($p < 0,05$).

Entre os tratamentos, a concentração de macronutrientes nas plantas cultivadas em Neossolo foram superiores aos demais tratamentos, como N 3,25%, P 0,54%, Ca 3,17% e S 0,92%. Para os micronutrientes, (Zn, Fe e Mn), os tratamentos com a inoculação dos isolados favoreceu o acúmulo na parte aérea das plantas, onde NeoA1 acumulou mais de 767 mg kg^{-1} de Zn, 337 mg kg^{-1} de Fe e 394 mg kg^{-1} de Mn, e o tratamento CambA6 obteve acúmulo de

mais de 700 mg kg⁻¹ de Zn, 819 mg kg⁻¹ de Fe e 442 mg kg⁻¹ de Mn (Tabela 6.2). Em geral, o tratamento com Cambissolo (Camb) apresentou as maiores concentrações de P 0,42%, K 3,17%, Ca 0,97% e S 0,51%, seguidas do tratamento com Neossolo (Neo), onde as médias das concentrações de macronutrientes foram de P 0,31%, K 2,32%, Ca 0,92%, e S 0,54%, não diferiram entre si. O tratamento CambA6 teve maior acúmulo de nitrogênio (2,24%), seguido do NeoA6 (N 2,21%, P 0,33% e K 2,44%), sendo isolado mais eficiente para a melhora da nutrição das plantas de aveia. Com relação aos micronutrientes na parte radicular da aveia preta, a maior absorção de Zn (1161,60 mg kg⁻¹) e Fe (8733,75 mg kg⁻¹) ocorreu nos tratamentos Neossolo (Neo) e Rejeito (controle negativo), respectivamente. Neste último tratamento ocorreu também o pico de absorção de Mn (334,18 mg kg⁻¹) (Tabela 6.3).

TABELA 6.2. Macro e micronutrientes da massa seca da parte aérea de plantas de aveia, após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos de vitivinicultura (Neossolo e Cambissolo).

Trat.	%			
	N	P	K	Ca
Mata	2,61±0,03abc*	0,24±0,01e	7,70±0,02ab	1,47±0,01c
Neo	3,25±0,06a	0,54±0,01a	7,81±0,13ab	3,17±0,02a
NeoA1	2,90±0,03abc	0,40±0,03cd	6,50±0,13ab	2,76±0,15ab
NeoA2	2,57±0,10abc	0,42±0,02bcd	8,16±0,09a	3,01±0,10ab
NeoA6	2,32±0,18c	0,27±0,01e	7,80±0,18ab	1,82±0,04bc
Camb	3,19±0,16a	0,48±0,02abc	7,65±0,25ab	2,90±0,06ab
CambA1	2,82±0,14abc	0,45±0,02ab	7,09±0,41ab	2,15±0,17bc
CambA2	2,51±0,08abc	0,49±0,01ab	7,57±0,11ab	1,99±0,02bc
CambA6	3,14±0,07ab	0,45±0,00ab	5,14±0,11b	2,51±0,07ab
Rejeito	2,36±0,05cb	0,27±0,02e	7,99±0,23ab	2,52±0,03ab
	mg kg ⁻¹			
	S	Zn	Fe	Mn
Mata	0,71±0,01ab	140,3±02,74d	355,5±11,17c	535,1±12,24a
Neo	0,92±0,02a	693,1±16,97ab	466,4±13,03bc	299,5±11,31bc
NeoA1	0,75±0,02ab	767,2±28,98a	337,0±11,48c	394,0±13,24ab
NeoA2	0,83±0,03ab	712,6±28,66a	462,5±24,98bc	382,2±16,13ab
NeoA6	0,59±0,02b	654,5±08,77ab	704,5±52,91ab	148,9±07,78e
Camb	0,68±0,01b	438,0±23,60bc	375,9±23,53c	135,0±05,04e
CambA1	0,58±0,04b	498,1±26,34bc	355,2±09,45c	125,5±02,70e
CambA2	0,57±0,02b	391,3±19,70cd	948,8±160,7a	126,4±05,42e
CambA6	0,85±0,01ab	700,3±05,44ab	819,1±41,51ab	442,6±03,63ab
Rejeito	0,69±0,02b	490,6±45,73bc	521,6±07,33bc	251,3±12,96bcd

*Valores são as médias ± erros médios. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a níveis de significância maiores que 95% (p < 0,05).

TABELA 6.3. Macro e micronutrientes da massa seca radicular de plantas de aveia, após crescimento em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos de vitivinicultura (Neossolo e Cambissolo).

Trat.	%			
	N	P	K	Ca
Mata	1,54±0,04d*	0,21±0,01d	1,79±0,02cde	0,85±0,01b
Neo	ND**	0,31±0,01bc	2,32±0,09bc	0,92±0,02b
NeoA1	1,74±0,03abcd	0,26±0,01cd	1,12±0,12e	0,89±0,04b
NeoA2	2,02±0,03abc	0,26±0,01cd	2,00±0,05bcd	0,94±0,03b
NeoA6	2,21±0,10ab	0,33±0,01b	2,44±0,06b	0,75±0,02b
Camb	1,46±0,04d	0,42±0,01a	3,17±0,13a	0,97±0,01b
CambA1	1,70±0,03abcd	0,30±0,01bc	1,85±0,15cde	0,99±0,02b
CambA2	1,76±0,04abcd	0,28±0,01bcd	1,95±0,02bcd	0,85±0,02b
CambA6	2,24±0,12a	0,27±0,01cd	1,48±0,05de	0,83±0,03b
Rejeito	ND	0,26±0,01cd	2,97±0,02ab	1,36±0,05a
	mg kg ⁻¹			
	S	Zn	Fe	Mn
Mata	0,40±0,01cd	162,6±05,71c	5111±156,1b	356,23±15,29a
Neo	0,54±0,01b	932,4±28,19a	3642±266,4cd	170,20±04,82bc
NeoA1	0,38±0,01cde	626,3±35,50b	4214±167,0cd	182,00±04,17b
NeoA2	0,41±0,00bc	1161,6±48,42a	1486±52,22e	122,80±04,68c
NeoA6	0,36±0,01e	555,8±12,20b	2867±07,89cd	105,97±05,41c
Camb	0,51±0,01b	461,9±25,10b	5290±52,83b	125,95±02,04c
CambA1	0,38±0,00cde	520,9±24,08b	2876±37,41cd	90,02±02,80c
CambA2	0,43±0,01bc	572,9±31,04b	3138±123,3cd	132,87±04,95c
CambA6	0,45±0,01bc	805,7±16,29ab	2767±51,45e	149,33±03,61c
Rejeito	0,64±0,01a	230,2±03,75c	8733±240,6a	334,18±08,31a

*Valores são as médias ± erros médios. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a níveis de significância maiores que 95% (p < 0,05)

**ND não determinado devido a baixa produção de matéria seca.

A Figura 6.3A mostra a fitotoxidez (como amarelamento e pontos de necrose nas folhas) do cobre nas plantas de aveia após 47 dias de cultivo em um Neossolo proveniente da uma área de vitivinicultura contaminada com altas concentrações de cobre. Já na Figura 6.3B, é apresentada a diferença entre os substratos em estudo sobre as plantas de aveia, onde estas plantas tiveram menor desenvolvimento quando cultivadas em rejeito, Neossolo e posteriormente Cambissolo, quando comparadas com o tratamento controle (Mata Nativa). O efeito dos isolados sobre as plantas de aveia em crescimento nos solos sob vitivinicultura, o Cambissolo e Neossolo, são demonstrados nas Figuras 6.3C e 6.3D, respectivamente. Observou-se o efeito benéfico às plantas de aveia após a inoculação do isolado A1 (Neossolo) e a inibição do desenvolvimento quando inoculadas com o isolado A6 neste mesmo solo.

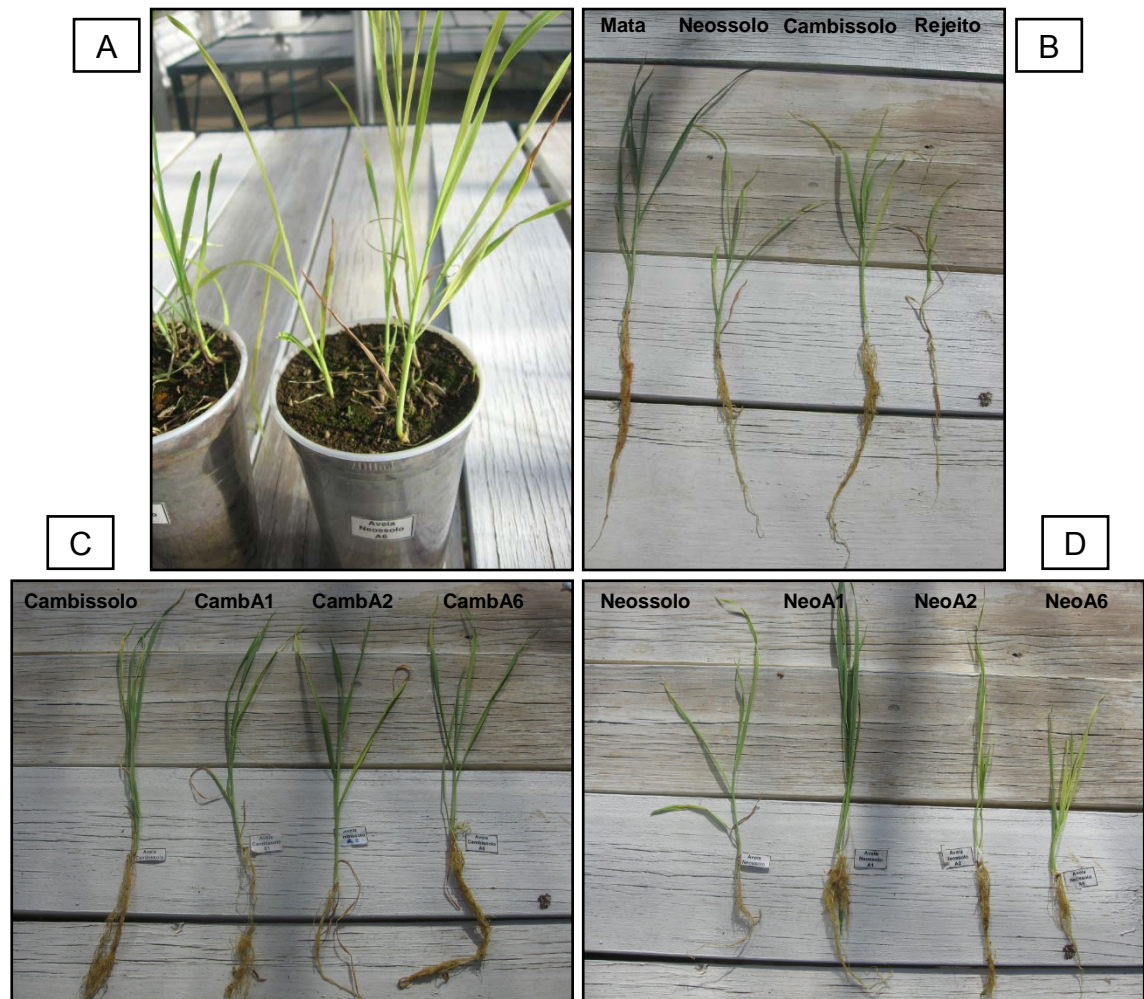


FIGURA 6.3. Toxicidade de cobre em plantas de aveia (*Avena sativa*) crescidas em solo vitivinícola contaminado com cobre (Neossolo) (A); efeito dos diferentes tipos de solo contaminados com cobre (B); efeito da inoculação de isolados resistentes ao cobre (A1, A2 e A6) em solo vitivinícola contaminado com cobre (Cambissolo) (C); e efeito da inoculação de isolados resistentes ao cobre (A1, A2 e A6) em solo vitivinícola contaminado com cobre (Neossolo) (D).

Os teores de cobre na massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR) e cobre total extraído pelas plantas de aveia preta após 47 dias de crescimento em três solos contaminados com cobre são mostrados na Figura 6.4. Os tratamentos que favoreceram a absorção do cobre pelas plantas de aveia e acúmulo na parte aérea foram o rejeito e o CambA2, onde acumulou-se mais de 170 e 127 mg kg⁻¹ de Cu, respectivamente. Embora as concentrações de cobre na parte aérea do tratamento CambA2 dos demais tratamentos em que as plantas apresentaram absorção menor não diferirem, nota-se que esta absorção foi quase duas vezes maior quando comparada com os demais. Por

outro lado, em relação ao cobre na parte radicular, ocorreu uma maior absorção deste elemento no tratamento com Neossolo (Neo, 1487,67 mg kg⁻¹), seguido do tratamento com Cambissolo (Camb, 1324,75 mg kg⁻¹) e o Cambissolo inoculado com o isolado A6 (CambA6, 1250,00 mg kg⁻¹).

Na avaliação das plantas cultivadas no Neossolo, houve maior absorção total de cobre entre todos os tratamentos (1549,91 mg de Cu kg⁻¹ de massa seca), sendo superior aos tratamentos subseqüentes, seguido do Cambissolo e do Rejeito com absorção total de 1379,62 e 1291,02 mg de Cu kg⁻¹ de massa seca, respectivamente. Quando foi inoculado o isolado A6 no Cambissolo houve uma maior extração total de cobre (1332,13 mg kg⁻¹ de Cu), embora, a inoculação com o isolado A2 proporcionou maior acúmulo de cobre na parte aérea das plantas (mais de 127 mg kg⁻¹ de Cu) (Figura 6.4).

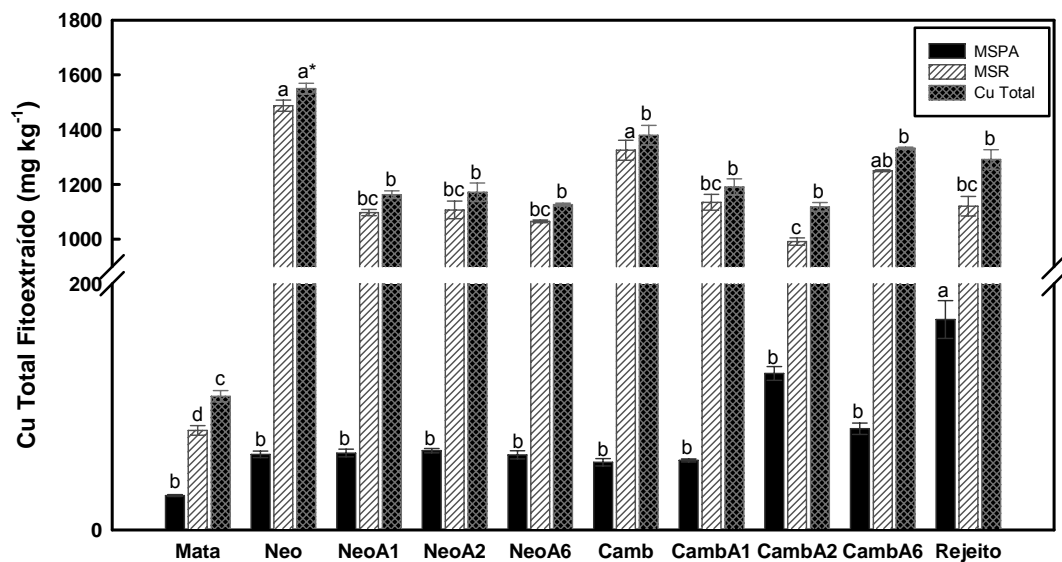


FIGURA 6.4. Concentrações de cobre na parte aérea e radicular e cobre total extraído por plantas de aveia em diferentes solos contaminados com cobre: Mata nativa (Controle); Neossolo (Neo); Cambissolo (Camb) e rejeito de mineração (Rejeito); e efeito da inoculação de três isolados em A1 (*P. putida*); A2 (*S. maltophilia*) e A6 (*A. calcoaceticus*) em dois solos de vitivinicultura (Neossolo e Cambissolo). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a níveis de significância maiores que 95% ($p < 0,05$).

6.4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo caracterizam a fitoextração de cobre por plantas de aveia preta e o efeito nutricional com a toxicidade deste elemento, juntamente com o efeito da inoculação de bactérias isoladas da rizosfera de plantas de aveia preta em áreas contaminadas com cobre como áreas de vitivinicultura e área de rejeito de mineração de cobre. Bactérias resistentes à metais pesados e isoladas da região rizosférica, podem ser utilizadas como bactérias promotoras de crescimento, proporcionando algum efeito benéfico à planta, como melhor crescimento vegetal ou até mesmo o aumento na absorção de metais pesados (Dell'Amico et al., 2008; Chen et al., 2008; Kumar et al., 2008; Sheng et al., 2008; Ma et al., 2009a; 2009b; 2009c).

A altura de plantas, MVPA, MVR, MSPA e MSR de aveia preta foram maiores no Cambissolo. Quando as plantas de aveia foram inoculadas com os isolados A1 e A6 e cultivadas em Neossolo com contaminação de mais de 200 mg kg⁻¹ de cobre, estes isolados promoveram o melhor crescimento para a planta, mostrando efeito benéfico à inoculação destes isolados altamente resistentes ao cobre, pela produção de massa com mais de 1 g/vaso, após 47 dias de cultivo em casa de vegetação. A produção de massa seca destas plantas foram inferiores às de *Elsholtzia splendens*, uma planta hiperacumuladora utilizada para a fitorremediação, onde esta planta produziu massa seca de mais de 7 g/vaso após 70 dias de cultivo em solo contaminado com 60 mg kg⁻¹ de cobre (Jiang et al., 2004).

As excreções dos microrganismos podem agir como agentes quelantes, podendo promover a absorção de metais pesados pelas plantas pelo aumento da biodisponibilidade destes metais. Estes compostos orgânicos podem se ligar aos metais pesados, anteriormente ligados ao solo, assim deixando os metais disponíveis para as plantas. Este comportamento foi observado com a

utilização de EDTA em solos contaminados com metais pesados, que melhorou a absorção destes metais (Khan et al., 2000). O isolado A2 promoveu a absorção de cobre pelas plantas de aveia, observando-se menor crescimento e maior incidência dos sintomas de toxidez ao cobre, resultado das concentrações encontradas na massa seca da parte aérea que foram duas vezes maior (127 mg kg^{-1}) do que os demais tratamentos. Em um trabalho semelhante com a inoculação de uma planta hiperacumuladora (*E. splendens*) foi observada a acumulação de até $100 \text{ mg de Cu kg}^{-1}$ de massa seca da parte aérea com a inoculação do isolado MS3, isolado da região rizosférica das raízes de *E. splendens* (Chen et al., 2005). Este isolado também proporcionou uma maior solubilização do cobre do solo para a solução do solo (Chen et al., 2005).

Outra explicação para a maior absorção de cobre proporcionada por microrganismos do solo localizados próximos às raízes das plantas, seria a redução de Cu(II) para Cu(I) pelas bactérias na região rizosférica, onde este metal se tornaria mais móvel, e conseqüentemente, pode ser transportado ou absorvido pela planta. Resultados de outros trabalhos mostram que a redução do cobre é um fator importante para a sua biodisponibilidade no ambiente (Capítulo III), bem como os isolados utilizados para este experimento são excelentes redutores de cobre (dados não apresentados).

Os outros isolados (A1 e A6) quando inoculados em Neossolo, melhoraram o crescimento da aveia preta como produção de massa da planta e acumulação de cobre na parte aérea da planta. Efeitos similares foram encontrados em outros trabalhos com Ni e Cd, onde bactérias promotoras de crescimento como *Methylobacterium oryzae* e *Burkholderia* sp. reduziram o efeito tóxico dos metais pesados (Ni e Cd) e promoveram o crescimento das plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Madhaiyan et al., 2007). Esta promoção do crescimento pode ser explicada pela produção de sideróforos, ácido indol acético e solubilização de fosfatos que melhoram a resistência ao estresse das plantas (Dell'Amico et al., 2008; Kumar et al., 2008; Sheng et al., 2008; Ma et al., 2009a; 2009b; 2009c).

As plantas de aveia preta foram mais eficientes na fitoextração de cobre em comparação a outras espécies utilizadas na fitorremediação de ambientes contaminados. Plantas de *Rosa grusss na teplitz* (Rosa vermelha) obtiveram

fitoextração máxima de 90 mg kg^{-1} de Cu quando as plantas foram submetidas a uma concentração de 800 mg L^{-1} de cobre (Bhatti et al., 2009), sendo que neste trabalho, as plantas de aveia extraíram mais de 170 mg de cobre por kg^{-1} de massa seca na parte aérea das plantas, no tratamento com Rejeito (576 mg kg^{-1} de cobre).

Metais pesados podem interferir na absorção e transporte de outros nutrientes e ocasionar distúrbios na nutrição mineral das plantas. Conseqüentemente, metais pesados podem resultar em efeitos fitotóxicos pela influência no metabolismo nutricional mineral das plantas (Monni et al., 2000). Neste estudo, o solo (Neossolo) sob vitivinicultura contaminado com cobre, obteve acréscimo nas concentrações de N, P, K, Ca, S, Zn e Fe na massa seca da parte aérea das plantas. Em outro trabalho com a avaliação nutricional ocorreu o oposto, que em plantas de *Rumex japonicus* reduziu a absorção de P e Fe, embora tenha aumentado as concentrações de Ca na parte aérea (Ke et al., 2007).

6.5 CONCLUSÕES

Plantas de aveia preta (*Avena sativa*) são eficientes para a fitoextração de cobre das áreas contaminadas em estudo. A inoculação das plantas com os isolados é benéfica para a fitorremediação. Os isolados *Pseudomonas putida* A1 e *Acinetobacter calcoaceticus* A6 promoveram o crescimento das plantas inoculadas como aumento na produção de massas seca e verde da parte aérea e radicular, e o isolado *Stenotrophomonas maltophilia* A2 aumenta a fitoextração do cobre pela parte aérea das plantas. Desta maneira, plantas de aveia preta juntamente com a inoculação de isolados altamente resistentes ao cobre, são uma alternativa viável para a utilização dos mesmos na fitorremediação de áreas contaminadas com cobre.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHATTI, H.N.; KHALID, R.; HANIF, M.A. Dynamic biosorption of Zn(II) and Cu(II) using pretreated *Rosa gruss an teplitz* (red rose) distillation sludge. **Chemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.148, p.434-443, 2009.
- BREMNER, J.M.; EDWARDS, H.P. Determination and isotope ratio analyses of different form of nitrogen in soils. I. Aparatus and procedures for destilation and determination for ammonium. **Soil Science Society American Proceedings**, Madison, v.29, n.5, p.504-507, 1965.
- CHEN, Y.X.; WANG, Y.P.; LIN, Q.; LUO, Y.M. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. **Environment International**, Witherslack, v.31, p.861-866, 2005.
- CHEN, Y.X.; WANG, Y.P.; WU, W.X.; LIN, Q.; XUE, S.G. Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.356, p.247- 255, 2006.
- CHEN, W.N.; WU, C.H.; JAMES, E.K.; CHANG, J.S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.151, p.364-371, 2008.
- DELL'AMICO, E.; CAVALCA, L.; ANDREONI, V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, p.74-84, 2008.
- JIANG, L.Y.; YANG, X.E.; HE, Z.L. Growth response and phytoextraction of cooper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. **Chemosphere**, Netherlands, v.55, p.1179-1187, 2004.
- KE, W.; XIONG, Z.T.; CHEN, S.; CHEN, J. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. **Environmental and Experimental Botany**, Pergamon, v.59, p.59-67, 2007.
- KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES, W.J. Role of plants, mycorrhizal and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, Netherlands, v.41, p.197-207, 2000.
- KHAN, A.G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Amsterdam, v.18, p.355-364, 2005.
- KUMAR, K.V.; SINGH, N.; BEHL, H.M.; SRIVASTAVA, S. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. **Chemosphere**, Netherlands, v.72, p.678-683, 2008.

- MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. **Journal of Environmental Management**, New York, v.90, p.831-837, 2009a.
- MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. **Chemosphere**, Netherlands, v.75, p.719-725, 2009b.
- MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.166, p.1154-1161, 2009c.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SA, T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**, Netherlands, v.69, 220-228, 2007.
- MONNI, S.; SELEMAA, M.; WHITE, C.; TUITTILA, E.; HUOPALAINEN, M.; Copper resistance of *Calluna vulgaris* originating from the pollution gradient of a Cu-Ni smelter, in southwest Finland. **Environmental Pollution**, Boston, v.109, p.211-219, 2000.
- PERUCH, L.A.M.; BRUNA, E.D. Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. 'Goethe'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, 2008.
- SANTOS, H.P.; MELO, G.W.B.; LUZ, N.B.; TOMASI, R.J. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Comunicado Técnico nº49, Bento Gonçalves, RS, 2004. 10p.
- SHENG, X.F.; XIA, J.J.; JIANG, C.Y.; HE, L.Y.; QIAN, M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. **Environmental Pollution**, Boston, v.156, p.1164-1170, 2008.
- STRECK, E. V.; KAMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P. **Solos do Rio Grande do Sul**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002, 107 p.
- TEDESCO, M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; WOLKWEIS, S. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2ªED. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1995. 1174p. Boletim Técnico , n. 5.
- XIONG, J.; HE, Z.; LIU, D.; MAHMOOD, Q.; YANG, X. The role of bacteria in the heavy metals removal and growth of *Sedum alfredii* Hance in an aqueous medium. **Chemosphere**, Netherlands, v.70, p.489-494, 2008.
- WANG, F.A.; LIN, X.G.; YIN, R. Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens* - a field case. **Environmental Pollution**, Boston v.147, p.248-255, 2007.
- WANG, Y.; LI, Q.; SHI, J.; LIN, Q.; CHEN, X.; WU, W.; CHEN, Y. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, p.1167-1177, 2008.

CAPÍTULO VI

ANÁLISE DA MICROBIOTA DO SOLO POR PCR-DGGE APÓS BIOLIXIVIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS COM COBRE

7.1 INTRODUÇÃO

O cobre é um nutriente essencial para todos os organismos vivos. Contudo, concentrações excessivas deste metal são tóxicas para a maioria destes organismos. Áreas contaminadas com cobre têm aumentado constantemente com o uso de fungicidas e fertilizantes na agricultura. Áreas de vitivinicultura são atualmente sítios em contaminação com cobre, devido ao tratamento contínuo com fungicidas a base de cobre. As áreas de mineração de cobre aumentam a contaminação deste metal em áreas adjacentes e também produzem grandes quantidades de resíduos. Estes resíduos são descartados em áreas adicionando altas concentrações de cobre, e conseqüentemente, poluição ambiental. A poluição com metais pesados podem causar mudanças na composição da comunidade microbiana (Atlas & Bartha, 1997).

Áreas contaminadas por metais pesados devem ser recuperadas, e processos de remediação são necessários para remover estes metais. Algumas técnicas como a biolixiviação e a biohidrometalurgia têm sido utilizadas para a extração de metais pesados ou descontaminação ambiental (Brierley & Brierley, 2001; Gonzalez-Toril et al., 2003; Demergasso et al., 2005; Halinen et al., 2009a; 2009b). A biolixiviação é uma tecnologia emergente com potenciais significativos para adicionar valor às indústrias de mineração, tanto quanto adicionar benefícios ambientais e sociais para todos os associados (Pradhan et al., 2008). Esta técnica também pode ser utilizada com alta eficiência para extração de cobre de rochas de calcopirita (Plumb et al., 2008; Pradhan et al., 2008). Aplicações de biolixiviação, envolve a presença de microrganismos acidófilos que crescem em uma faixa de pH entre 0 e 3, e oxidam íons de Fe(II) para Fe(III). O íon férrico hidrolisa facilmente e forma hidróxidos de Fe(III) ou jarosita. A precipitação da jarosita têm sido reportada

até em pH entre 1,35-1,5 (Atlas & Bartha, 1997). Especialmente para o cobre, a aplicação comercial da biohidrometalurgia começou com a biolixiviação do cobre nas áreas de mineração sub-marginais. Hoje, a biolixiviação é um processo muito barato para extrair cobre de rochas que não são economicamente processadas por algum outro método. Apesar do sucesso comercial da biolixiviação, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas para melhorar os componentes microbiológicos deste processo de lixiviação (Brierley & Brierley, 2001). Além do mais, é necessário saber quais processos e microrganismos estão agindo neste sítio.

A técnica de DGGE é uma ferramenta eficiente que tem sido utilizada com sucesso na investigação de microrganismos predominantes em diferentes ambientes e sítios (Iwamoto et al., 2000; Mohlenhoff et al., 2001; Gillan, 2004; Demergasso et al., 2005; Petersen & Dahllorf, 2005; Li et al., 2006; Hu et al., 2007; Wang et al., 2007; 2008a; 2008b; Anderson et al., 2008; Asakawa & Kimura, 2008; Dell'Amico et al., 2008; Diaz-Ramirez et al., 2008; Halinen et al., 2009a; 2009b; Martínez-Iñigo et al., 2009). O monitoramento de microrganismos no ambiente quando são afetados por metais pesados, também utiliza a técnica de DGGE (Gillan, 2004; Demergasso et al., 2005; Li et al., 2006; Hu et al., 2007; Wang et al., 2007; 2008a; 2008b; Anderson et al., 2008; Asakawa & Kimura, 2008; Dell'Amico et al., 2008; Martínez-Iñigo et al., 2009). Além disso, a identificação destes microrganismos bem como a caracterização da população nestas áreas pode fornecer informações úteis para futuros estudos em biorremediação e recuperação de sítios poluídos com cobre por microrganismos mais eficientes. Em virtude disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar condições ambientais para a biolixiviação em dois substratos. Utilizou-se solos contaminados com cobre de uma área de vitivinicultura e de rejeito de mineração de cobre como substratos para avaliar o efeito do Fe, ácido sulfúrico e clorídrico e das condições ótimas para a biolixiviação do cobre *ex situ*. A comunidade microbiana responsável pela lixiviação foi caracterizada pela técnica de PCR-DGGE.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da biolixiviação do cobre dos substratos em estudo foi realizada no Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. As análises de PCR-DGGE e a identificação dos microrganismos foram conduzidas nos Laboratórios do Departamento de Biologia da Universidade de Auburn de Montgomery (AUM), Alabama, USA.

7.2.1 Substratos utilizados

Os substratos foram coletados de duas áreas contaminadas no Sul do Brasil. O solo classificado como Neossolo foi coletado de uma área de vitivinicultura localizada em Bento Gonçalves, RS, na Estação Experimental da EMBRAPA (29°09'53,92"S e 51°31'39,40"O). O outro substrato foi coletado em uma área de rejeito de mineração de cobre, localizado na cidade de Caçapava do Sul, RS (30°30'45,74"S e 53°29'25,30"O). As características físicas e químicas destes substratos são apresentados na Tabela 7.1.

TABELA 7.1: Análise química e física dos substratos utilizados, Neossolo (vitivinicultura) e rejeito de mineração de cobre.

Substratos	pH	CTC	MO	Argila	Cu	Zn	Mn
	1:1	cmol _c dm ⁻³	g DM ⁻³	g kg ⁻¹	----- mg dm ⁻³ -----		
Neossolo	6,3	17,2	2,6	19	207	19,0	55
Rejeito	7,9	-	0,9	02	576	0,8	02
	Ca	Al	Mg	H + Al	S	P	K
	-----cmol _c dm ⁻³ -----				----- mg dm ⁻³ -----		
Neossolo	10,9	0,0	3,1	2,8	06,1	28	142
Rejeito	24,2	0,0	1,7	-	12,3	32	032

Os substratos foram coletados, secados, peneirados (peneira de 3 mm), homogeneizados e posteriormente pesados em amostras de 140 g dentro de

frascos de plástico com volume de 200 mL, utilizados como unidades experimentais. Após a pesagem das amostras, foram adicionados 10 mL de cada solução de tratamento (Tabela 7.2) nos respectivos substratos previamente identificados, e a umidade do solo foi ajustada a 80% da capacidade de campo com água deionizada.

TABELA 7.2: Soluções de tratamento aplicadas nos dois substratos e períodos para a biolixiviação do cobre.

Trat	Substrato	Soluções de Tratamento	Soluções de Extração	
			1ª condição	2ª condição
N1	Neossolo	H ₂ O (deionizada)	H ₂ O	H ₂ O
N2	Neossolo	HCl (0,01%)	H ₂ O	HCl
N3	Neossolo	H ₂ SO ₄ (0,128%)	H ₂ O	H ₂ SO ₄
N4	Neossolo	FeSO ₄ (1,35 mM)	H ₂ O	FeSO ₄
N5	Neossolo	FeSO ₄ (1,35 mM) + H ₂ SO ₄ (0,128%)	H ₂ O	FeSO ₄ +H ₂ SO ₄
N6	Neossolo	Sem tratamento-solo original	-	-
R1	Rejeito	H ₂ O (deionizada)	H ₂ O	H ₂ O
R2	Rejeito	HCl (0,01%)	H ₂ O	HCl
R3	Rejeito	H ₂ SO ₄ (0,128%)	H ₂ O	H ₂ SO ₄
R4	Rejeito	FeSO ₄ (1,35 mM)	H ₂ O	FeSO ₄
R5	Rejeito	FeSO ₄ (1,35 mM) + H ₂ SO ₄ (0,128%)	H ₂ O	FeSO ₄ +H ₂ SO ₄
R6	Rejeito	Sem tratamento-solo original	-	-

7.2.2 Biolixiviação dos substratos

O experimento foi conduzido em duas condições. Na primeira condição, a umidade do solo de todos os tratamentos foram ajustados com água deionizada e incubados à temperatura ambiente. A solução do solo foi obtida pelo método de deslocamento por coluna (Barber, 1984) utilizando água deionizada. Na segunda condição, a umidade do solo foi ajustada com as mesmas soluções de tratamento e os tratamentos foram incubados à temperatura controlada (30°C ± 1). Nesta condição, a solução dos substratos foi obtida da mesma forma da primeira condição, mas utilizando as mesmas soluções de tratamento (Tabela 7.2). Foram adicionados 30 mL de água ou soluções de tratamento após atingir 100% da capacidade de campo dentro das amostras, e foi conduzido por 8 h de acordo com cada condição experimental. Após a coleta das soluções, o pH da solução e a concentração de cobre na solução dos substratos foram analisados. A concentração de cobre na solução

foi analisada por ICP-OES e o pH da solução foi mensurada por pH-metro (Mark Analion PM 608).

Após a aplicação dos tratamentos da primeira condição aos substratos, os mesmos foram incubados por 39 dias à temperatura ambiente (entre 20 e 33°C). Após a incubação, a solução dos substratos foi coletada três vezes, sendo 40, 50, e 60 dias após a instalação do experimento. Durante este período, foi adicionado aos substratos 50 mL de cada solução de tratamento, e a umidade do solo elevada à 80% da capacidade de campo com água deionizada. Para a primeira amostragem da solução dos substratos foi adicionado 10 mL a mais, das suas respectivas soluções de tratamento. Para a segunda e terceira amostragem foi adicionado 20 mL de cada solução de tratamento dentro das suas respectivas amostras e incubadas até sua coleta.

A segunda condição foi conduzida após a terceira coleta da solução dos substratos. Posteriormente, as amostras de substratos foram drenadas à temperatura ambiente (por 15 dias), e em seguida, inicializado o período de incubação. Neste período, foram adicionadas somente as soluções de tratamento em cada amostra por 30 dias e incubadas à temperatura controlada de 30°C (± 1). A solução dos substratos foi coletada duas vezes, sendo 105 e 115 dias após o início do experimento. A umidade do solo foi ajustada duas vezes por semana à 80% da capacidade de campo com as mesmas soluções de tratamento.

7.2.3 Extração do DNA

Após analisar todas as soluções dos substratos, as amostras foram coletadas e estocadas em freezer (-4°C) até a extração de DNA. A extração do mesmo foi realizada para todos os tratamentos com a utilização do kit UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MOBIO, USA), com as seguintes modificações. Foi utilizado 0,5 g de amostra de cada substrato (solo e rejeito). As amostras pesadas foram colocadas dentro dos tubos (impact beads), sem a solução previamente adicionadas pelo fabricante, e adicionado 1 mL de tampão estéril 1 x TAE (20 mM Tris, 10 mM acetate, 0,5 mM EDTA pH 7.4). Após, as amostras foram colocadas horizontalmente no Vórtex por 1 min em máxima velocidade. Após este procedimento, estes tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, e foi recolhido o sobrenadante para os seguintes

procedimentos de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração do DNA, ele foi utilizado para a amplificação por PCR.

7.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para amplificar o gene do RNA ribossomal da região 16S do DNA genômico. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 338F-CG (5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGG CGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCA-3') e 519R - (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'). A reação de mistura para PCR consistia em 25 µL de PCR master mix (Promega, Madison, WI), amostra de DNA genômico (2 µL), oligonucleotídeo iniciador 338F (10 µL=5 pmol), oligonucleotídeo iniciador 519R (10 µL=5 pmol) e completado à volume final de 50 µL com água livre de nucleases. O gene 16S rRNA foi amplificado utilizando 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial à 95°C por 5 min.; subsequente desnaturação à 95°C por 0,5 min; temperatura de anelamento à 50°C por 1 min.; temperatura de extensão à 72°C por 1 min e extensão final à 72°C por 5 min.). Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% por eletroforese.

7.2.5 Análise de eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

As análises de DGGE foram realizadas com o sistema universal de detecção de mutação universal DCODE (Biorad, Hercules, CA, USA). O produto do PCR gerado pelos oligonucleotídeos iniciadores 338F-CG e 518R foram colocados dentro de um gel de policrilamida 8% (p/v), buffer 1x TAE (20 mM Tris, 10 mM acetato, 0,5 mM EDTA pH 7.4), e espaçadores de 1 mm e placas com dimensões de 16 x 16 cm. O gel de policrilamida foi confeccionado com gradiente desnaturante linear de uréia e formamida entre 40% e 60% (onde 100% de desnaturação contém 7 M uréia e 40% formamida) pelo marcador de gradiente (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As condições de eletroforese foram: corrida durante 4 h à 200 W em 1x TAE buffer à temperatura constante de 60°C. As placas de géis foram resfriadas em banho de gelo por 10 min, e os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) por 2 h, e descorados em buffer 1x TAE por mais 2 h. O gel descorado foi posicionado em um trans-illuminator UV e digitalizado com uma

câmera digital. As bandas dos géis de DGGE foram cortadas com giletes novas e estéreis. As bandas cortadas foram armazenadas dentro de tubos eppendorfs novos de 1,5 mL contendo 20 µL de água livre de nucleases. Para a retirada do DNA de dentro das bandas dos géis de poliacrilamida, foi realizado três ciclos de congelamento e aquecimento (-80 e 50°C respectivamente), e 1 µL do DNA diluído foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores 338F-CG e 519R. As condições do PCR foram discutidas na seção deste procedimento.

7.2.6 Similaridade das seqüências de DNA e análise filogenética

Após o PCR das bandas dos géis, a análise das seqüências de DNA e pesquisas de homologia foi utilizada a análise BLAST com as bases de dados de seqüência de nucleotídeos (blastn). O Genbank BLAST (N) foi utilizado para as pesquisas de homologia. As análises filogenéticas foram conduzidas com o auxílio do programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007).

7.3 RESULTADOS

A biolixiviação nos diferentes tratamentos apresentaram a mesma tendência na primeira condição experimental, quando foram comparados com o tratamento controle (N1) no solo de vitivinicultura (Figura 7.1). A primeira condição experimental foi representada pelas três primeiras amostragens (coletas) em cada tratamento, e foi menos eficiente na biolixiviação do cobre quando comparada com a segunda condição. Os tratamentos na quinta coleta que receberam ácidos (N2, N3 e N5) apresentaram a maior biolixiviação de cobre, quando comparados aos demais, extraindo concentrações de 21,44; 82,56 e 59,91 mg de cobre por kg^{-1} de solo, respectivamente. Além do mais, as concentrações de cobre biolixiviados em todos os tratamentos na segunda condição foram superiores a 11 mg kg^{-1} , e a maior extração de cobre ocorreu com a quinta coleta, utilizando-se o tratamento com H_2SO_4 (N3) com mais de 82 mg kg^{-1} de cobre biolixiviado do solo após 115 dias de incubação. Por outro lado, a primeira condição não atingiu mais de $1,42 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo (N5, 2ª Coleta).

O tratamento com ácido sulfúrico H_2SO_4 (R3) apresenta biolixiviação de $2,60 \text{ mg kg}^{-1}$ na quarta coleta da solução do substrato, e o tratamento com ferro e ácido junto (FeSO_4 e H_2SO_4 (R5)) obteve os valores mais altos na biolixiviação do cobre na quarta e quinta coleta com $15,08 \text{ mg kg}^{-1}$ e $20,12 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, quando comparados com os outros tratamentos no rejeito de mineração de cobre (Figura 7.2). A segunda condição experimental mostrou melhores resultados na biolixiviação do cobre neste substrato em estudo.

Na primeira condição experimental, ocorreu um pequeno aumento no pH entre as três coletas nos dois substratos em estudo (Tabela 7.3). Após o início da segunda condição, o pH foi reduzido drasticamente no solo de vitivinicultura,

pH 7,0 e 8,28, para pH entre 2,39 e 5,54. Este efeito não foi tão acentuado no rejeito de mineração de cobre, em que o pH apresentou-se entre uma faixa de 6,38 e 7,13 na segunda condição. O tratamento com a maior redução de pH foi o N5 com ferro e ácido combinados ($\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{SO}_4$) de um pH 7,51 na terceira coleta, para pH 2,37 na quarta coleta da solução do solo.

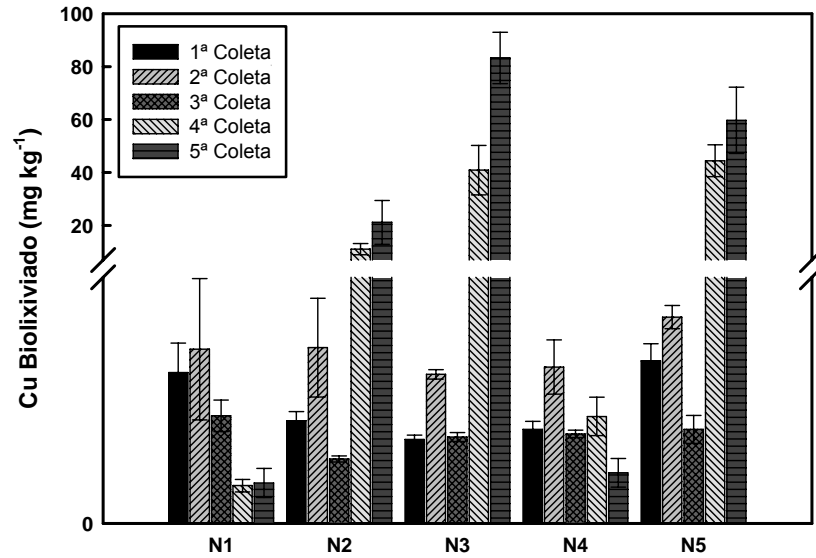


FIGURA 7.1. Biolixiviação do cobre do solo de vitivinicultura (Neossolo) contaminado com cobre (mg de Cu por kg^{-1} de solo) com diferentes tratamentos: N1= H_2O , N2= HCl , N3= H_2SO_4 , N4= FeSO_4 e N5= $\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{SO}_4$. Barras indicam o erro médio.

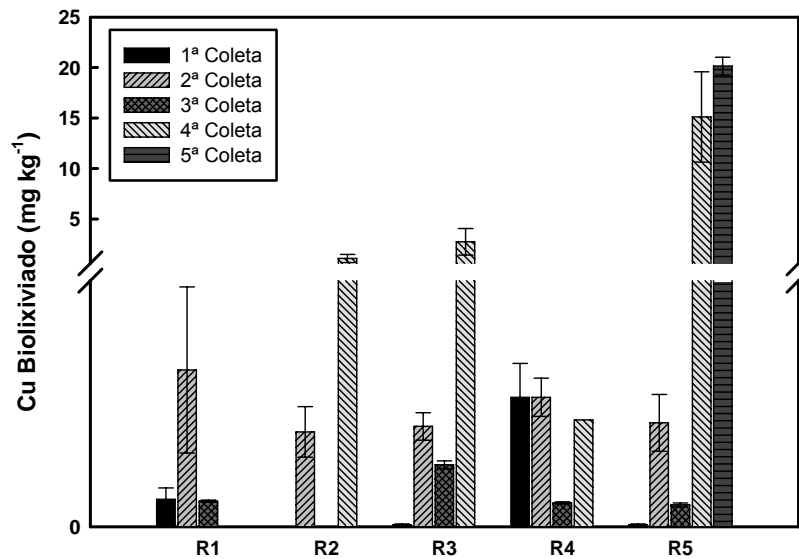


FIGURA 7.2. Biolixiviação do cobre de rejeito de mineração de cobre (mg de Cu por kg^{-1} de solo) com diferentes tratamentos: R1= H_2O , R2= HCl , R3= H_2SO_4 , R4= FeSO_4 e R5= $\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{SO}_4$. Barras indicam o erro médio.

TABELA 7.3. pH da solução, após a extração das soluções dos diferentes substratos (Neossolo (N) e rejeito de mineração de cobre (R)) com diferentes tratamentos.

Tratamento	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	4ª Coleta	5ª Coleta
----- pH -----					
N1	6,75±0,01*	7,99±0,15	8,13±0,11	5,31±0,13	5,54±0,10
N2	6,63±0,10	7,72±0,20	7,74±0,19	4,60±0,13	3,75±0,21
N3	6,69±0,12	7,41±0,19	7,26±0,51	2,92±0,11	2,39±0,28
N4	6,67±0,15	7,49±0,09	7,10±0,21	5,20±0,01	4,34±0,22
N5	6,78±0,20	7,81±0,11	7,51±0,12	2,37±0,07	2,93±0,11
R1	7,65±0,18	7,98±0,00	8,00±0,10	7,30±0,01	7,00±0,03
R2	7,63±0,01	7,92±0,01	7,92±0,11	7,15±0,07	6,56±0,31
R3	7,86±0,13	7,99±0,12	8,06±0,07	7,28±0,12	6,86±0,11
R4	7,83±0,15	8,02±0,09	8,28±0,01	7,35±0,11	7,13±0,21
R5	7,77±0,09	7,93±0,14	8,12±0,18	6,68±0,32	6,38±0,10

* Valores indicam as médias ± erro médio.

A Figura 7.3 mostra as fotos dos perfis dos géis de poliacrilamida após a análise de PCR-DGGE, indicando o número de bandas detectadas em cada tratamento. O número de bandas detectadas em cada tratamento do solo de vitivinicultura contaminado com cobre foram quatro diferentes bandas: A, B, C e D (Foto 1. Neossolo), e duas bandas diferentes no rejeito de mineração com os diferentes tratamentos: A e B (Foto 2. Rejeito). Neste último perfil, somente o tratamento com HCl (R2) apresenta somente a banda A no perfil, e os demais tratamentos apresentam as bandas A e B.

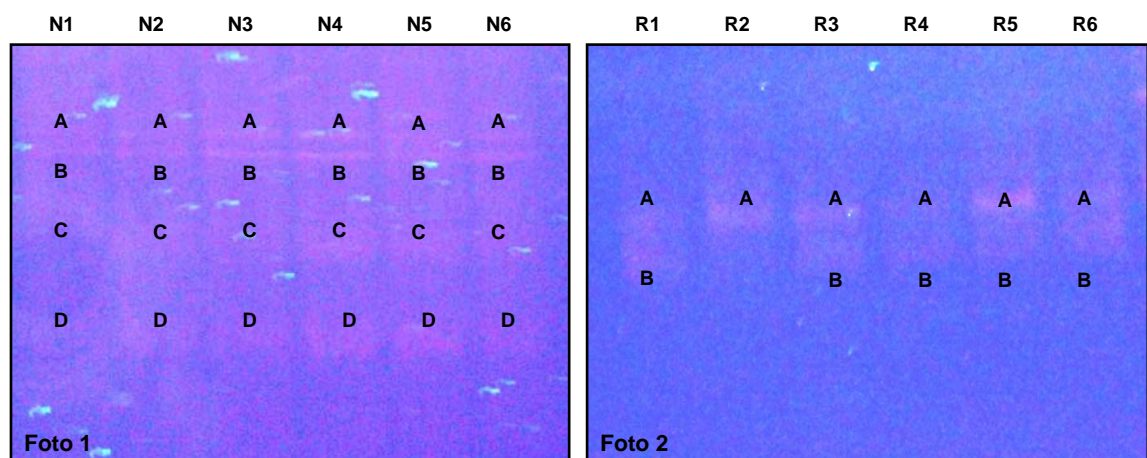


FIGURA 7.3. Perfis dos géis de DGGE. Foto 1: bandas (A, B, C e D) nas amostras dos tratamentos em Neossolo (N); Foto 2: bandas (A e B) nas amostras dos tratamentos em rejeito de mineração de cobre (R).

Trinta e cinco bandas foram cortadas e sequenciadas dos géis de DGGE de solo de vitivinicultura e rejeito de mineração de cobre (Figura 3), e 28 bandas foram identificadas pela análise da seqüência do gene do RNA ribossomal da região 16S (Tabela 4). A Figura 4 apresenta a relação filogenética entre as bandas identificadas das duas áreas contaminadas com cobre em estudo. O tamanho das seqüências de nucleotídeos utilizadas para a análise no Genbank blast e para a construção da árvore filogenética, foram entre 165 à 184 bases de ácidos nucléicos.

TABELA 7.4. Composição das espécies identificadas referentes ao gel de PCR-DGGE do Neossolo (N) e do rejeito de mineração de cobre (R), após o período de incubação.

Trat-Banda	Identificação	Nº de Acesso	Similaridade (%)
N1-A	<i>Rhodobacter</i> sp.	GQ351416.1	85
N1-B	<i>Silicibacter</i> sp.	CP000377.1	89
N1-C	<i>Bacillus</i> sp.	EU834945.1	76
N1-D	<i>Paracoccus</i> sp.	GQ324230.1	88
N2-A	<i>Pediococcus</i> sp.	FJ609993.1	82
N2-B	Myxococcales	EU437496.1	80
N2-C	<i>Clostridium</i> sp.	FJ609998.1	75
N2-D	<i>Paracoccus</i> sp.	GQ324230.1	70
N3-A	<i>Thiomonas</i> sp.	FJ628383.1	86
N3-B	Firmicutes	EF491067.1	75
N3-C	<i>Caulobacter vibrioides</i>	AY512823.1	87
N3-D	<i>Paracoccus</i> sp.	GQ324230.1	91
N4-A	<i>Rhodobacter</i> sp.	GQ351416.1	68
N4-B	Sphingobacteria	EU328071.1	80
N4-D	<i>Paracoccus</i> sp.	GQ324230.1	92
N5-A	<i>Serratia</i> sp.	FJ609989.1	78
N6-C	Actinomycetales	GQ351423.1	80
N6-D	<i>Clostridium</i> sp.	DQ196621.2	84
R1-A	<i>Sphingomonas</i> sp.	EF554984.1	88
R1-B	Sphingobacteria	EF664090.1	73
R2-A	<i>Sphingomonas</i> sp.	EU196323.1	80
R3-A	<i>Sphingomonas</i> sp.	EU196323.1	89
R3-B	<i>Sphingomonas</i> sp.	FM881808.2	77
R4-A	<i>Sphingomonas</i> sp.	GQ169809.1	91
R4-B	<i>Paracoccus</i> sp.	GQ324230.1	81
R5-A	<i>Sphingomonas</i> sp.	GQ169809.1	86
R5-B	<i>Paracoccus</i> sp.	GQ324230.1	87
R6-B	<i>Enterobacter</i> sp.	FJ609991.1	82

No solo de vitivinicultura, dois isolados foram identificados como *Rhodobacter* sp. (no tratamento-banda N1-A e N4-A), um como *Silicibacter* sp. (N1-B), um como *Bacillus* sp. (N1-C), quatro como *Paracoccus* sp. (N1-D; N2-D; N3-D e N4-D) todos na banda D, um como *Pediococcus* sp. (N2-A), um como Myxococcales (N2-B), dois como *Clostridium* sp. (N2-C e N6-D), um

como *Thiomonas* sp. (N3-A), um como Firmicutes (N3-B), um como *Caulobacter vibrioides* (N3-C), um como Sphingobacteria (N4-B), um como *Serratia* sp. (N5-A), e um como Actinomycetales (N6-C) (Tabela 4). No rejeito de mineração de cobre, foram identificados seis isolados como *Sphingomonas* sp. (R1-A; R2-A; R3-A; R3-B; R4-A e R5-A), um como Sphingobacteria (R1-B), dois como *Paracoccus* sp. (R4-B e R5-B), e um como *Enterobacter* sp. (R6-B) (Tabela 7.4).

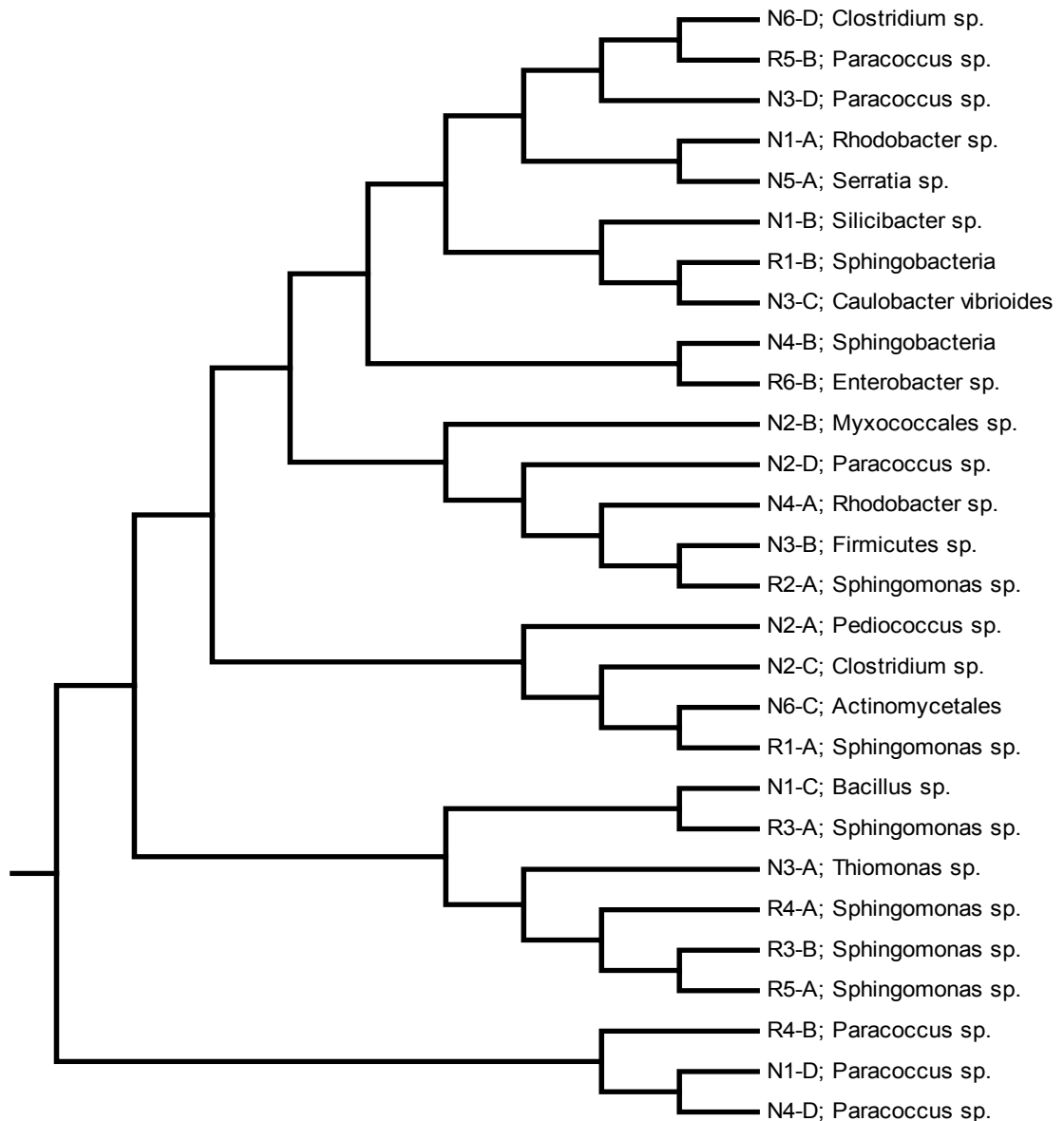


FIGURA 7.4. Árvore filogenética mostrando o agrupamento entre os organismos identificados das bandas extraídas dos géis de PCR-DGGE de Neossolo de área de vitivinicultura (N) e área de rejeito de mineração de cobre (R) baseados na sequência do gene do RNA ribossomal da região 16S. O comprimento da sequência de nucleotídeos utilizadas foi entre 165 e 184 bases de ácidos nucléicos.

7.4 DISCUSSÃO

O cobre é um micronutriente essencial para os microrganismos vivos, mas em altas concentrações é considerado um metal tóxico aos organismos. A biolixiviação pela microbiota de áreas contaminadas (Iwamoto et al., 2000; Halinen et al., 2009a; 2009b) e estudos com biohidrometalurgia (Brierley & Brierley, 2001; Gonzalez-Toril et al., 2003), especificamente com calcopirita (Rubio & Frutos, 2002; Plumb et al., 2008; Pradhan et al., 2008), têm recebido atenção especial ultimamente. Neste trabalho foram utilizados princípios de biolixiviação de cobre e biohidrometalurgia para remover o cobre de dois diferentes sítios contaminados com cobre (área de produção vitivinícola com 40 anos de cultivo e área de rejeito de mineração de cobre). Além disso, a análise de DGGE tem sido utilizada para o levantamento dos microrganismos dominantes no ambiente (Muyzer et al., 1993; Iwamoto et al., 2000; Mohlenhoff et al., 2001; Gillan, 2004; Petersen & Dahllorf, 2005; Li et al., 2006; Hu et al., 2007; Asakawa & Kimura, 2008; Diaz-Ramirez, et al., 2008; Martínez-Iñigo et al., 2009).

Os tratamentos foram baseados nos princípios de biolixiviação e biohidrometalurgia, onde o ácido sulfúrico pode promover a remoção do cobre pela redução do pH e fonte de enxofre para os microrganismos autotróficos acidófilos, que utilizam este elemento como fonte de energia para a remoção do cobre do solo e liberá-lo para a solução (Atlas & Bartha, 1997). Os tratamentos foram planejados com base na concentração de íons H^+ do tratamento com HCl (N2 ou R2). O tratamento com H_2SO_4 (N3 ou R3) foi planejado com a mesma concentração de H^+ do tratamento com HCl. O tratamento com $FeSO_4$ (N4 ou R4) obteve a mesma concentração de SO_4^{2-} do tratamento com H_2SO_4 , e o tratamento com H_2SO_4 e $FeSO_4$ (N5 e R5) obteve duas vezes a concentração de SO_4^{2-} e a mesma concentração de íons H^+ e

ferro dos respectivos tratamentos. O tratamento com íons ferro foi utilizado, porque o ciclo do ferro é um importante elemento nos processos de biolixiviação, pois vai ser reduzido ou oxidado, dependendo da concentração de oxigênio no solo e pela importância da oxidação do sulfeto (Malki et al., 2006). Entre os tratamentos utilizados, os que obtiveram maior remoção do cobre dos substratos via solução, foram os tratamentos com a utilização do H_2SO_4 (N3 e R3; N5 e R5).

Entre as duas condições para a biolixiviação, a segunda condição, sem a adição de água no sistema e temperatura controlada à 30°C, foi a mais eficiente do que a primeira condição, com a adição de água e temperatura ambiente. Na primeira condição ocorreu um pequeno aumento do pH da solução dos substratos entre as três primeiras coletas, nos dois sítios em estudo. Na segunda condição, o pH da solução do solo de vitivinicultura foi drasticamente reduzido. Este efeito não foi tão alto no rejeito de mineração de cobre, isto demonstra que o poder tampão do rejeito é alto. No caso, o rejeito de mineração tem quase três vezes a concentração de cobre do que o solo de vitivinicultura, mas o cobre no rejeito é fortemente ligado e estável em suas estruturas. Além do mais, o pH do solo é um importante fator para a biolixiviação dos minerais, onde alguns autores verificaram uma biolixiviação de 12% do cobre total com pH 1,5 e menos de 1% quando o pH esteve em uma faixa de 2,5 à 3,0 (Halinen et al., 2009a). Este efeito foi observado neste trabalho, porque os valores de pH final estiveram entre 2,39 e 5,54 no solo de vitivinicultura, e entre 6,38 e 7,13 no rejeito de mineração. Porém, outro trabalho mostrou que o microrganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* teve a maior biolixiviação quando o pH inicial do solo foi 7,0, quando comparado com pH 3,0 (Kumar & Nagendran, 2007). O pH e a temperatura são considerados os dois fatores ambientais mais indicados para retirar os metais dos solos contaminados (Halinen et al., 2009b). Isto pode explicar porque a biolixiviação do cobre não foi tão alta na primeira condição experimental, e bem maior na segunda condição experimental, com maior temperatura e maior acidificação, pela não adição de água (pH da água entorno de 7,0).

Após o período de condução do experimento (115 dias), foi extraído o DNA dos substratos (solo e rejeito) e utilizado para analisar a comunidade microbiana dos substratos pelo método de PCR-DGGE. Com isto, foi

identificado mais de um microrganismo por banda no gel do PCR-DGGE do solo de vitivinicultura. Os microrganismos identificados como *Silicibacter* sp., Myxococcales, Firmicutes, e Sphingobacteria foram encontrados na banda “B” deste solo. Para outros autores, é notório que uma banda possivelmente pode representar mais de uma espécie (Heuer & Smalla, 1997) e também, algumas bactérias podem produzir mais de uma banda pelo método de DGGE (Muyzer et al., 1993). Comparando a análise dos dados obtidos neste estudo, com outro estudo de um solo de vitivinicultura contaminado com cobre (Dell’Amico et al., 2008), foi verificado que há uma diversidade similar em algumas espécies como *Bacillus* sp. e *Sphingomonas* sp., encontradas nos dois estudos. Também foi verificado neste trabalho, que o microrganismo *Sphingomonas* sp. apresentou uma maior frequência em todos os tratamentos no rejeito de mineração de cobre, menos no tratamento controle R6 (rejeito natural, sem adição de tratamentos).

Para as amostras de solo de vitivinicultura foi verificado um distúrbio na comunidade microbiana como nos tratamentos controles (N6 e N1). A comunidade microbiana natural deste solo foi Actinomycetales e *Clostridium* sp. (N6), e *Rhodobacter* sp., *Silicibacter* sp., *Bacillus* sp., *Paracoccus* sp. (N1), pois as espécies *Silicibacter* sp. e *Bacillus* sp., e a Actinomycetales não foram encontradas após o período de incubação e a adição dos tratamentos. Os resultados também concordam com outro trabalho com o monitoramento da comunidade microbiana em água subterrânea pelo método de DGGE, onde foi demonstrado que a comunidade bacteriana foi afetada após o começo dos tratamentos e mudou aos 45 e 60 dias. Somente após este período formou-se uma comunidade relativamente estável, mas diferente da estrutura da comunidade original (Iwamoto et al., 2000). Por outro lado, nas amostras de rejeito de mineração de cobre ocorreu o oposto, mantendo a comunidade microbiana e a menor diversidade de microrganismos entre os tratamentos.

O isolado *Paracoccus* sp., é um microrganismo litotrófico da oxidação do enxofre que utiliza o sistema Sox como a sua principal rota de energia das bactérias com respiração facultativa da classe *Alphaproteobacteria* (Ghosh & Dam, 2009). Este isolado utiliza a oxidação do SO_4^{2-} como fonte de energia, onde ele foi encontrado nos tratamentos N3 e N4 no solo de vitivinicultura, e nos tratamentos R4 e R5 no rejeito de mineração de cobre, onde houve a

adição de SO_4^{2-} nos tratamentos. A espécie *Sphingomonas* sp. tem sido encontrada em sítios poluídos, como em sistemas de tratamento de indústrias de clorpirifos (Li et al., 2007), e também com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Pinyakong et al., 2004; Tao et al., 2007; Liu et al., 2009). Os isolados *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. foram encontrados em sítios contaminados com metais pesados (Turpeinen et al., 2004), mostrando que são isolados resistentes à estes metais. Alguns membros da ordem *Myxococcales* como *Anaeromyxobacter* sp. podem ser importantes membros na redução do ferro da microbiota do solo (Treude et al., 2003). Mostrando que estes isolados tiveram importância na biolixiviação do cobre nos substratos estudados.

7.5 CONCLUSÕES

Em geral, a segunda condição aplicada, com temperatura controlada (30°C) e sem a adição de água no sistema, é mais eficiente para a biolixiviação do cobre quando comparado com a primeira condição (temperatura ambiente e com adição de água nos tratamentos). A adição de ácido sulfúrico apresenta maior biolixiviação quando adicionado aos substratos. Na comunidade de microrganismos encontrados após a aplicação dos tratamentos e analisadas pelo método de DGGE, são encontradas basicamente bactérias gram positivo. O filo Firmicutes como *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp., é encontrado no solo de vitivinicultura contaminado com cobre. Foi encontrado o isolado *Paracoccus* sp. em alguns tratamentos, onde sua principal rota metabólica é a oxidação do SO_4^{2-} , importante para a biolixiviação do cobre. Os microrganismos identificados como *Sphingomonas* sp. são amplamente encontrados no substrato de rejeito de mineração de cobre. Estes isolados conhecidos por suas características de resistência à metais pesados são possíveis candidatos à biorremediação, especialmente nestas áreas contaminadas em estudo.

7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; HANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ANDERSON, I.C.; PARKIN, P.I.; CAMPBELL, C.D. DNA- and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, p.2358-2365, 2008.
- ASAKAWA, S.; KIMURA, M. Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, p.1322-1329, 2008.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4 edn, New York. Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, 1997, pp.694.
- BARBER, S.A. **Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1984, 550p.
- BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, Cape Town, v.59, p.233-239, 2001.
- DELL'AMICO, E.; MAZZOCCHI, M.; CAVALCA, L.; ALLIEVI, L.; ANDREONI, V. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. **FEMS Microbiological Research**, Amsterdam, v.163, p.671-683, 2008.
- DEMERGASSO, C.S.; GALLEGUILLOS P.P.A.; ESCUDERO G.L.V.; ZEPEDA A.V.J.; CASTILLO, D.; CASAMAYOR, E.O. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. **Hydrometallurgy**, Cape Town, v.80, p.241-253, 2005.
- DIAZ-RAMIREZ, I.J.; ESCALANTE-ESPINOSA, E.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; RAMIREZ-SAAD, H. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Netherland, v.62, p.21-30, 2008.
- GILLAN, D.C. The effect of an acute copper exposure on the diversity of a microbial community in north sea sediments as revealed by DGGE analysis-the importance of the protocol. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v.49, p.504-513, 2004.
- GONZALEZ-TORIL, E.; GOMEZ, F.; RODRIGUEZ, N.; FERNANDEZ-REMOLAR, D.; ZULUAGA, J.; MARIN, I.; AMILS, R. Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for Biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, Cape Town, v.71, p.301-309, 2003.
- GHOSH, W.; DAM, B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam (2009), doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00187.x

- HALINEN, A.K.; RAHUNEN, N.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. Heap bioleaching of a complex sulfide ore: Part I: Effect of pH on metal extraction and microbial composition in pH controlled columns, **Hydrometallurgy**, Cape Town, (2009a), doi:10.1016/j.hydromet.2009.04.005.
- HALINEN, A.K.; RAHUNEN, N.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. Heap bioleaching of a complex sulfide ore: Part II. Effect of temperature on base metal extraction and bacterial compositions. **Hydrometallurgy**, Cape Town, (2009b), doi:10.1016/j.hydromet.2009.04.004.
- HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: VANELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Eds.), **Modern soil microbiology**. Dekker, New York, 1997, p.353-373.
- HU, Q.; DOU, M.; QI, H.; XIE, X.; ZHUANG, G.; YANG, M. Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v.19, p.1114-1119, 2007.
- IWAMOTO, T.; TANI, K.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, Y.; KITAGAWA, M.; EGUCHI, M.; NASU, M. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.32, p.129-141, 2000.
- KUMAR, R.N.; NEGENDRAN, R. Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Chemosphere**, Netherlands, v.66, p.1775-1781, 2007.
- LI, Z.; XU, J.; TANG, C.; WU, J.; MUHAMMAD, A.; WANG, H. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. **Chemosphere**, Netherlands, v.62, p.1374-1380, 2006.
- LI, X.; HE, J.; LI, S. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. **FEMS Research in Microbiology**, Amsterdam, v.158, n.2, p.143-149, 2007.
- LIU, Y.J.; ZHANG, A.N.; WANG, X.C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. **Biochemical Engineering Journal**, Farmington Hills, v.44, n.2-3, p.187-192, 2009.
- MALKI, M.; GONZÁLEZ-TORIL, E.; SANZ, J.L.; GÓMEZ, F.; RODRÍGUEZ, N.; AMILS, R. Importance of the iron cycle in biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, Cape Town, v.83, p.223-228, 2006.
- MARTÍNEZ-IÑIGO, M.J.; PÉREZ-SANZ, A.; ORTIZ, I.; ALONSO, J.; ALARCÓN, R.; GARCÍA, P.; LOBO, MC. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and b-galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. **Chemosphere**, Netherlands, v.75, p.1376-1381, 2009.
- MOHLENHOFF, P.; MULLER, L.; GORBUSHINA, A.A.; PETERSEN, K. Molecular approach to the characterization of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.195, p.169-173, 2001.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, G.G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.695-700, 1993.

- PETERSEN, D.G.; DAHLLOF, I. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.53, p.339-348, 2005.
- PINYAKONG, O.; HABE, H.; KOUZUMA, A.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.238, n.2, p.297-305, 2004.
- PLUMB, J.J.; MCSWEENEY, N.J.; FRANZMANN, P.D. Growth and activity of pure and mixed bioleaching strains on low grade chalcopyrite ore. **Minerals Engineering**, Falmouth, v.21, p.93-99, 2008.
- PRADHAN, N.; NATHSARMA, K.C.; RAO, K.S.; SUKLA, L.B.; MISHRA, B.K. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. **Minerals Engineering**, Falmouth, v.21, p.355-365, 2008.
- RUBIO, A.; FRUTOS, F.J.G. Bioleaching capacity of an extremely thermophilic culture for chalcopyritic materials. **Minerals Engineering**, Falmouth, v.15, p.689-694, 2002.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, p.1596-1599, 2007.
- TAO, X.; LU, G.; DANG, Z.; YANG, C.; YI, X. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v.42, n.3, p.401-408, 2007.
- TREUDE, N.; ROSENCRANTZ, D.; LIESACK, W.; SCHNELL, S. Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.44, n.2, p.261-269, 2003.
- TURPEINEN, R.; KAIRESALO, T.; HÄGGBLUM, M.M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.47, n.1, p.39-50, 2004.
- WANG, Y.P.; SHI, J.Y.; WANG, H.; LIN, Q.; CHEN, X.C. CHEN, Y.X. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.67, p.75-81, 2007.
- WANG S.; LI Q.; LIANG, W.; JIANG, Y.; JIANG, S. PCR-DGGE analysis of nematode diversity in Cu-contaminated soil. **Pedosphere**, Nanjing, v.18, n.5, p.621-627, 2008a.
- WANG, Y.P.; LIB, Q.B.; SHIA, J.Y.; LINA, Q.; CHENA, X.C.; WUA, W.; XU, Y. Chen Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, pT.1167-1177, 2008b.

8. CONCLUSÕES FINAIS

A avaliação de mecanismos e estratégias para o uso de microrganismos e de plantas para a remediação de áreas contaminadas com cobre foi a meta principal deste trabalho. Para atingir esta meta, utilizaram-se áreas de vitivinicultura e de rejeito de mineração com altas concentrações de cobre onde foram realizados cinco estudos com metas específicas como: a) isolamento e caracterização de bactérias resistentes ao cobre, com capacidade de remoção deste elemento; b) avaliação da sorção e da redução do cobre por isolado resistente ao cobre e dos fatores ambientais que afetam essa atividade; c) isolamento e caracterização de microrganismos do solo rizosférico de aveia preta e transagem crescendo em ambiente contaminado com cobre e avaliação das condições ótimas de crescimento dos isolados e a capacidade de biossorção em meio líquido; d) avaliação do potencial de fitoextração do cobre por aveia preta e a fitoaumentação desta planta por bactérias resistentes à cobre; e) avaliação das condições ambientais para a biolixiviação em dois substratos (solo e rejeito) contaminados com cobre e caracterizar a comunidade microbiana responsável pela lixiviação do cobre.

Em relação às metas específicas deste trabalho, foi identificado por técnicas de biologia molecular um isolado do gênero *Staphylococcus*, com alta resistência e capacidade de absorção ao cobre. Isolados do gênero *Bacillus* também apresentaram o mesmo comportamento frente ao cobre, sendo que uma espécie de *B. pumilus* apresentou alta adsorção específica do cobre. Também foi identificado um isolado de *Pseudomonas putida* com alta tolerância, redução e remoção de Cu(II), com efeito marcante da temperatura, pH e concentração do cobre nessa atividade.

Em relação aos isolados do solo e do rejeito, foi constatada uma comunidade bacteriana diferenciada habitando na rizosfera da aveia preta e da

transagem. De modo geral, verificou-se a presença de espécies resistentes ao cobre nas diversas condições ambientais avaliadas, identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter calcoaceticus*. Estas espécies removeram cobre do meio líquido testado em quantidades superiores as descritas na literatura.

A aveia preta (*Avena sativa*) foi eficiente para a fitoextração de cobre das áreas contaminadas em estudo. A fitoaumentação, com a inoculação das plantas com os isolados *P. putida* e *A. calcoaceticus*, mostrou-se eficiente para a fitorremediação pois promoveu o desenvolvimento da parte aérea e das raízes das plantas inoculadas. Foi observado ainda que o isolado *S. maltophilia* A2 auxiliou na fitoextração do cobre pela parte aérea das plantas.

A biolixiviação ou a biohidrometalurgia foi testada como outra estratégia para o uso de microrganismos para remover o cobre de ambientes contaminados. Bactérias do gênero *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp., foram encontradas nos tratamentos em que foi avaliada a lixiviação do cobre. Também foi detectado bactéria do gênero *Paracoccus* sp., envolvidos na oxidação do SO_4^{2-} , importante para a biolixiviação, bem como microrganismos identificados como *Sphingomonas* sp., amplamente encontrados no rejeito de mineração de cobre. Em relação à lixiviação, constatou-se que a temperatura controlada a 30°C, a ausência de água no sistema e a adição de ácido sulfúrico foram mais eficiente para o processo.

De modo geral, o trabalho comprovou que a eficiência da biorremediação do cobre nos ambientes contaminados dependeu de vários fatores, entre estes, o isolamento, a identificação e a seleção de microrganismos e plantas resistentes e eficazes na remoção e transformação do cobre, bem como as condições que afetam a dinâmica do cobre nos organismos e no ambiente. Os resultados aqui produzidos nas condições avaliadas e os organismos identificados demonstram potencial para a utilização na remoção do cobre em áreas de vitivinicultura e áreas de rejeito de mineração de cobre.

9. RESUMO BIOGRÁFICO

Robson Andreazza, filho de Luiz Andreazza e Geneci Peixoto Andreazza, nasceu em 14 de novembro de 1979, em São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul. Estudou no Colégio Rui Barbosa e completou sua formação elementar. O ensino médio foi realizado Colégio Técnico Estadual Cruzeiro do Sul, obtendo o grau de Técnico Agrícola. Em 1998 ingressou no Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, graduando-se como Engenheiro-Agrônomo em 2004. Em março de 2004 iniciou seus estudos de Mestrado em Ciência do Solo no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, obtendo o grau de Mestre em Ciência do Solo em Fevereiro de 2006. Em março de 2006 iniciou seus estudos de Doutorado em Ciência do Solo no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No período de agosto de 2008 a agosto de 2009 realizou estágio de doutoramento na Universidade de Auburn, Alabama, sob a orientação do Professor Benedict Okeke. Casou-se com Simone Pieniz em abril de 2008. Atualmente, é membro da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo e da Sociedade Americana de Microbiologia.

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](#)