

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

ESTUDO DA VIABILIDADE DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS POR METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS ATRAVÉS DA BACTÉRIA BACILLUS CEREUS

**RENATA BRENDA FRANCO DA ROCHA¹, CAROLINE DA SILVA DA
CONCEIÇÃO², JORGE DINIZ DE OLIVEIRA³ IVANEIDE DE OLIVEIRA
NASCIMENTO⁴**

AFILIAÇÃO

¹Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – Centro de Ciências Exatas,
Naturais e Tecnológicas - R. Godofredo Viana, 1300 - Centro, Imperatriz - MA, 65900-000.

RESUMO

As atividades agrícolas constituem uma das mais importantes fontes não pontuais de poluição por metais potencialmente tóxicos. Frente a isso diversas técnicas de remediação de solos contaminados estão surgindo, os métodos convencionais para remover os metais tóxicos do ambiente incluem precipitação, floculação e membrana filtrante, porém, são processos onerosos. Contudo, os tratamentos biológicos vêm ganhando espaço, com ampla aceitação pela sociedade, devido o baixo custo e alta aplicabilidade, a biorremediação utilizando microrganismos, revela uma técnica promissora e viável, reduzindo o efeito negativo desses metais no ambiente. Diante disso, o presente trabalho realizou a análise da aplicação da rizobactéria *Bacillus cereus* em solo agrícola oriundo de cultivo de milho visando a remoção dos metais zinco e níquel. No estudo foram analisados os parâmetros de pH em água e KCl, que indicou o solo como muito ácido, realizou-se também Ponto de Carga Zero, acidez trocável, que constatou uma grande quantidade de Al^{3+} , e a quantificação de matéria orgânica do solo estudado. Para analisar a tolerância das bactérias às concentrações de metais no solo foi realizado o estudo da Concentração Mínima Inibitória. Por fim, a bactéria foi aplicada no solo e assim foi realizado o experimento de biorremediação, com o monitoramento de 15 dias. A bactéria *Bacillus cereus* apresentou boa tolerância à concentração mais elevada de zinco e a concentração intermediária de níquel. A capacidade e eficiência de absorção dos metais pelas bactérias chegou a $688,5\text{ mg g}^{-1}$ e $75,6\%$, respectivamente, para íons zinco, e $237,0\text{ mg g}^{-1}$ e $85,4\%$, respectivamente, para íons níquel. Portanto, a bactéria analisada apresentou boa tolerância a altas concentrações de Níquel e Zinco, assim como alta capacidade e eficiência na remoção dos íons metálicos do solo, após 2 e 5 dias de contato com o solo, tornando-a um microrganismo viável no processo de biorremediação de solos contaminados com metais potencialmente tóxicos.

PALAVRAS-CHAVE: Rizobactéria; Metais potencialmente tóxicos; Remoção.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

INTRODUÇÃO

As atividades agrícolas constituem uma das mais importantes fontes não pontuais de poluição por metais potencialmente tóxicos. Produtos agrícolas usados com finalidade corretiva ou nutricional, possuem uma composição que contém metais potencialmente tóxicos, e podem ser uma fonte de contaminação sendo que, o solo já é um sistema natural rico, composto por minerais, matéria orgânica, gases, líquidos e organismos com interações dinâmicas (Yu et al., 2019).

Frente a isso, várias técnicas de remediação de solos contaminados por metais potencialmente tóxicos estão surgindo, métodos convencionais são processos onerosos, contudo, os tratamentos biológicos vêm ganhando espaço. A utilização de microrganismo como ferramenta para a remediação de ambientes contaminados é chamada de biorremediação, o microrganismo atua degradando biologicamente, imobilizando, ou transformando os contaminantes, presentes tanto em águas subterrâneas quanto em solos, em substâncias finais de menor toxicidade (Chen et al., 2015; Reddy e Adams, 2015).

A bactéria *Bacillus cereus* é uma espécie amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo, água, e vegetação. São caracterizadas por formar esporos que possuem características de serem termorresistentes, isso ocorre principalmente devido à transferência horizontal de genes mediada por plasmídeos, os quais contêm genes relacionados com mecanismos de resistência. (Patiño-Navarrete; Sanchis, 2017). Os grupos funcionais hidroxila, carbonila e carboxila estão presentes nas paredes celulares de bactérias do gênero *Bacillus sp*, interagindo com metais, absorvendo-os em sua membrana celular (Ren et al., 2015).

Nesse contexto, o presente trabalho busca avaliar o efeito da biorremediação por intermédio da rizobactéria *Bacillus cereus* em solo de área de cultivo de milho, dopados por zinco e níquel para avaliar a remoção destes metais, também busca contribuir com dados científicos que possibilite o tratamento de áreas contaminadas por estes metais, expandindo os estudos de biorremediação mediante o emprego de rizobactérias *Bacillus cereus*.

METODOLOGIA

Na pesquisa foram utilizadas amostras de solos oriundos de cultivo de milho na zona rural do município Davinópolis – MA. A coleta foi feita em seis pontos. Após a coleta o solo

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

foi seco ao ar por 10 dias, triturado e passado em peneira de 2 mm, logo após o mesmo foi armazenado em frascos de polietileno à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$).

Para a caracterização do solo foi realizado determinação de pH em H_2O e KCl 1 mol L^{-1} . Para isso, 10 gramas de solo foram pesados em um béquer e adicionados 25 mL de água destilada para a leitura do pH em água. A mistura foi mantida em agitação por 40 minutos e deixada em repouso por 1 hora, e posteriormente filtrada através de papel filtro quantitativo (Whatman 44).

Para a leitura do pH em KCl 1 mol L^{-1} , o mesmo procedimento foi repetido, substituindo a água destilada pelo cloreto de potássio. Em ambas as leituras, o pH foi medido utilizando-se pH-metro digital, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7 (Vettori, 1969). As análises foram feitas em triplicata.

A partir dos valores de $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ e pH_{KCl} foi estimado os valores de ΔpH pela Equação 1 (Mekaru e Uehara, 1972). Segundo Prado (2003) a determinação dos parâmetros de pH nos permite determinar o Ponto de Carga Zero utilizando a Equação 2 proposta por Uehara (1972).

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{KCl}} - \text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{pH}_{\text{PCZ}} = 2 \text{pH}_{\text{KCl}} - \text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} \quad \text{Equação 2}$$

Para determinação do teor de matéria orgânica foram pesadas 2g das amostras e submetidas à calcinação por 4 horas, em forno mufla a 550°C . Decorrido o tempo, o cadinho foi resfriado em dessecador e novamente pesado para determinar a porcentagem de matéria orgânica do solo. A porcentagem de MO foi obtida utilizando a Equação 3.

$$\% \text{ MOS} = \frac{P_1 - P_2}{P} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

% MOS= Teor em porcentagem de matéria orgânica; P_1 = Peso do cadinho + amostra antes da calcinação; P_2 = Peso do cadinho + amostra após a calcinação; P = Massa do solo isenta de umidade.

Para determinação da acidez trocável do solo foram pesados 10 g de solo e adicionado 50 mL de KCl 0,1 mol L^{-1} , a mistura foi agitada e deixada em repouso durante 30 minutos, em seguida foram filtradas e adicionada duas porções de 10 mL de KCl . Foi adicionado ao filtrado 6 gotas de fenolftaleína e titulado com solução padrão de NaOH 0,1 mol L^{-1} até aparecimento de cor rosa (Embrapa, 1979). A acidez trocável foi determinada pela Equação

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

4:

$$\text{Acidez Trocável (cmol kg}^{-1}\text{)} = \frac{V \times N \times 100}{P} \quad \text{Equação 4}$$

V = volume de NaOH gasto na titulação (mL); N = normalidade do NaOH (0,1 N); P = peso da amostra (kg).

A bactéria utilizada para o processo de biorremediação, são pertencentes à coleção de microrganismos multifuncionais da Micoteca Gilson Soares da Silva da Universidade Estadual do Maranhão. Para a multiplicação da bactéria, foi feito o cultivo em meio BDA (batata, dextrose e ágar), por 48h, a aproximadamente 28° C, para aplicação no solo autoclavado, foi preparada uma suspensão bacteriana, a concentração da suspensão foi ajustada a 540 nm para A = 0,5 (10⁸ UFC) em Espectrofotômetro. Para o ajuste da concentração utilizou-se a Equação 5 abaixo:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad \text{Equação 5}$$

C₁ = Leitura do espectrofotômetro; C₂ = Concentração esperada (0,5 AA); V₁ = Volume de bactéria esperado; V₂ = Volume de solução total.

Para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da rizobactéria *Bacillus cereus*, cultivou-se a mesma em 10 mL de meio de cultura LB líquido, sob agitação horizontal de 110 rpm, incubadas à 28°C por 4 dias. Este meio de cultura foi suplementado com doses de metais potencialmente tóxicos Zn (5 mg L⁻¹; 10 mg L⁻¹; 15 mg L⁻¹) e Ni (1 mg L⁻¹; 1,5 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹) em três repetições. Também realizou-se o procedimento sem a adição das soluções de metais sendo determinados como grupo controle.

Para evitar a precipitação dos metais, foi acrescido TRIS ao meio de cultura na concentração de 6,0 g L⁻¹ (Mergeay et al., 1985). Ao final do período de incubação, a quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de meio líquido foi realizada através da absorbância em Espectrofotômetro UV-Vis.

Para avaliar o potencial de biodegradação dos metais, foram realizadas cinco coletas, no tempo zero, após o período de 2, 5, 10 e 15 dias. Após o tempo previsto para cada condição, as amostras de solo foram homogeneizadas e pesadas 10 gramas, realizou-se a lavagem do solo com 40 mL de solução tampão fosfato de sódio, por duas vezes e filtradas, conforme Moreira et al. (1993) e Pot et al. (1993). Após a filtragem, a biomassa foi seca em estufa a 65° C por 2 horas, descompactada e colocada em frascos de polietileno. Em seguida

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

foram pesadas 4 gramas da biomassa e adicionadas 40 mL da solução de Mehlich, a mistura foi agitada por 5 minutos. Em seguida as amostras foram filtradas e armazenadas em recipientes de polipropileno para ser realizada a determinação das concentrações dos íons metálicos em Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS). Os testes foram realizados em triplicata. A capacidade de remoção dos metais foi calculada pela Equação 6:

$$Q_e \text{ (mg Kg}^{-1}\text{)} = \frac{(Q_i - Q_f) \times V}{m} \text{ Equação 6}$$

Q_e : Capacidade de remoção (mg Kg⁻¹); Q_i = Concentração inicial (mg L⁻¹); Q_f = Concentração final (mg L⁻¹); m : Massa (Kg); V : Volume (L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 indica que os valores de pH do solo em água e KCl permaneceram na faixa de 3, sendo caracterizados como muito ácidos (Gastalho et al. 2009). Os valores obtidos para o pH favorecem a disponibilidade, a solubilidade e a possível lixiviação dos metais potencialmente tóxicos como Ni(II) e Zn(II) (Awokunmi et al., 2015). O valor do Δ pH obtido demonstra que o solo possui cargas negativas na superfície das partículas coloidais, o que, por sua vez, favorece a adsorção de cátions.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros físico-químicos do solo da área investigada no município de Davinópolis-MA.

Pontos	Parâmetros físico-químicos					
	pH _{H2O}	pH _{KCl}	Δ pH	Ponto de Carga Zero	Acidez Trocável	Matéria Orgânica (%)
P1	3,76	3,20	-0,56	2,65	0,66	13,92
P2	3,56	3,38	-0,18	3,19	0,42	11,75
P3	3,42	3,28	-0,14	3,05	0,78	12,79
P4	3,38	3,14	-0,24	2,89	0,78	15,33
P5	3,52	3,21	-0,31	2,89	1,41	16,12
P6	3,44	3,17	-0,27	2,90	2,28	14,31

Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

O Ponto de Carga Zero (PCZ) é o ponto no qual a superfície das partículas coloidais do solo possui uma carga líquida nula, resultando a adsorção de cátions e ânions na mesma proporção (Gama 2013). A tabela indica que o solo possui carga negativa, pois o valor de

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

pH_{H_2O} esteve acima do valor do pH_{PCZ} , a tabela também revela a presença de Al trocável, segundo Sobral et al. (2015) quando o valor de Al^{3+} é maior que $0,5 \text{ cmol}_c$ pode ser prejudicial, o solo estudado apresenta uma grande quantidade de Al, podendo causar efeitos de toxicidade, visto que, é um fator limitante de crescimento para as plantas.

Os valores de matéria orgânica foram altos, Alcântara e Pierangeli (2011) afirmam que valores acima de 10%, indicam predominância de compostos orgânicos. A quantidade de MO obtida formam complexos ou quelatos quando reagido com metais, podendo haver a formação de complexos organometálicos, que facilitam a disponibilidade e a dispersão desses metais, aumentando os riscos de toxicidade para o solo.

A concentração mínima inibitória é a concentração necessária de metal, em mg L^{-1} , para inibir o crescimento bacteriano, as concentrações utilizadas não demonstraram capacidade suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Nos testes realizados, o crescimento da bactéria em maior quantidade ocorreu no meio de cultura com a concentração mais elevada de zinco, 15 mg L^{-1} , resultando em $11,72 \times 10^{10}$ UFC. Em relação ao níquel, o maior crescimento ocorreu em uma concentração intermediária de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, $10,4 \times 10^{10}$ UFC, seguido por uma redução na concentração subsequente.

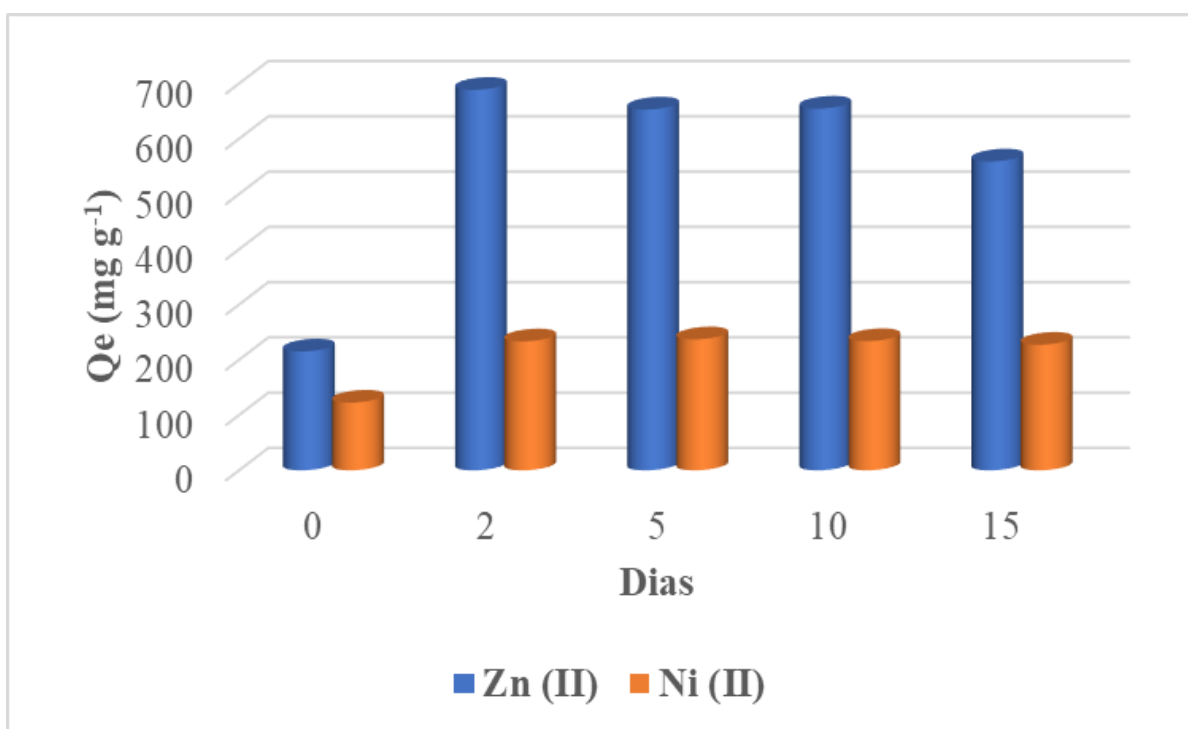
O teste de biorremediação revela que a bactéria *Bacillus cereus* mostrou-se eficaz na capacidade de remoção das espécies metálicas estudadas (Figura 1), esse resultado é influenciado pela presença dos grupos funcionais presentes na parede celular bacteriana, responsável pela adsorção de metais. A bactéria apresentou maior capacidade de remoção no tempo de 2 dias para zinco e 5 dias para níquel, removendo respectivamente $688,5 \text{ mg g}^{-1}$ íons metálicos, com uma eficiência de 75,6 %, e $237,0 \text{ mg g}^{-1}$ íons metálicos, com eficiência de 85,4 %.

Nota-se que no gráfico houve variações na capacidade de remoção ao longo do período investigado, esse comportamento pode ser explicado pelo crescimento bacteriano, onde há produção de novas células adsorvendo esses metais, e fase de morte celular da bactéria, que reduz a população em uma taxa logarítmica. (Tortora, 2012). Com base nos resultados, a bactéria *Bacillus cereus* apresentou-se eficiente na remoção dos metais investigados (Figura 1). Isso demonstra que a espécie bacteriana estudada pode ser utilizada

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

como ferramenta para a biorremediação em tratamento de áreas contaminadas com os metais, zinco e níquel.

Figura 1. Capacidade de remoção de Zinco e Níquel pela bactéria *Bacillus cereus*.



Q_e = capacidade de remoção (mg g^{-1})

CONCLUSÕES

Com base nos parâmetros do solo, a matéria orgânica, alta acidez e presença de cargas negativas em sua superfície facilitam a absorção de cátions, como metais potencialmente tóxicos. Observou-se também que a bactéria *Bacillus cereus* possui tolerância quando adicionadas a um meio com as concentrações investigadas de níquel e zinco, notou-se que a mesma apresenta capacidade de remoção dos íons metálicos, removendo mais íons de zinco, com alto índice de eficiência para níquel. Sendo assim, as bactérias *Bacillus cereus* podem ser utilizadas como ferramenta biotecnológica para remediação de solos contaminados por Ni (II) e Zn (II).



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alcântara, A.J.O. Composição gravimétrica dos resíduos sólidos urbanos e caracterização química do solo da área de disposição final do município de Cáceres-MT. Mato Grosso. 2010. 89f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres.
- Awokunmi, E.; Ibigbami, O.A.; Asaolu, S.S.; Adefemi, O.S.; Gbolagade, A.Y. Sequential Extraction of Heavy Metals from Soil Samples Collected from Selected Cocoa Farmland in Erijiyan, Ekiti State, Nigeria. *International Journal of Environmental Protection*, 2015, v. 5. 52-56
- Chen, M.; Xu, P.; Zeng, G.; Yang, C.; Huang, D.; Zhang, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavymetals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 2015, 33, 6, 745–755.
- EMBRAPA. Manual de Métodos de análises do solo. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de solos. Rio de Janeiro, 1979.
- Gama, J.A.G. Avaliação dos teores de metais potencialmente tóxicos na microbacia do riacho barra grande localizada no entorno do lixão municipal da cidade de Imperatriz - MA; Goiânia. 2013. 59f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Ciências Ambientais e Saúde) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia.
- Gastalho, C.; Barreiro, I.; Ribeiro. Determinação do pH e acidez de uma amostra de solo. Coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia, 20 e 27 de Nov. 2009.
- Mekaru, T.; Uehara, G. Anion adsorption in ferruginous tropical soils. *Soil Science Society America Proceedings*, 1972, v. 36. 296-300.
- Mergeay, M.; Nies, D.; Schlegel, H.G.; Gertis, J.; Charles, P.; Van Gusegem, F. *Alcaligenes Eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmidbound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162, 1, 328-334.
- Moreira, F. M. S.; Gillis, M.; Pot, B.; Kersters, K.; Franco, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic And Applied Microbiology*, 1993, 16, 135–146.
- Patiño-Navarrete, R.; Sanchis, V. Evolutionary processes and enviromental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Research in Microbiology*, v. 198, n.4, p.309-318, 2017.
- Prado, R. M. A. A calagem e as propriedades físicas de solos tropicais: Revisão de literatura. *Revista De Biociência*, 2003, 3, 9, 7-16.
- Pot, B.; Vandamme, P.; Kersters, K. Analysis of electrophoretic wholeorganism protein fingerprints. In: Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (Eds.), *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. First edition, Wiley, Chichester, NY, 1994. p. 493–521.
- Reddy, K. R.; Adams, J. A. Sustainable remediation of contaminated sites. New York: Momentum Press, Llc, 2015; pp. 268.



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Ren. G.; Jin. Y.; Zhang. C.; Gu. H.; Qu. J. Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb(II). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 Jul;117:141-8.

Sobral, L.F.; Barreto, M.C.V.; Silva, A.J.; Anjos, J.L. Guia prático para interpretação de resultados de análises de solos. Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015, 13 p.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Microbiologia [Recurso Eletrônico], Tradução: Aristóbolo Mendes Da Silva ... [Et Al.]; Revisão Técnica: Flávio Guimarães Da Fonseca. – 10. Ed. – Dados Eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

Vettori, L. Métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: Escritório de Pedologia e Fertilidade de Solos, 1969. (Boletim Técnico, 7).

Yu, H.; Zou, W.; Chen, J.; Chen, H.; Yu, Z.; Huang, J.; Tang, H.; Wei, X.; Gao, B. Biochar Amendment improves crop production in problem soils: a review. *Journal of Environmental Management*, 2019, 232, 8–21.