

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROCESSOS TECNOLÓGICOS E AMBIENTAIS

Débora Hidalgo Espinetti Rocco

**ANÁLISE DA BIOACUMULAÇÃO DE CHUMBO, COBRE E CÁDMIO
EM MEIO AQUOSO UTILIZANDO *Bacillus subtilis***

Sorocaba/SP

2020

Débora Hidalgo Espinetti Rocco

**ANÁLISE DA BIOACUMULAÇÃO DE CHUMBO, COBRE E
CÁDMIO EM MEIO AQUOSO UTILIZANDO *Bacillus subtilis***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angela Faustino Jozala

Sorocaba/SP

2020

Débora Hidalgo Espinetti Rocco

**ANÁLISE DA BIOACUMULAÇÃO DE CHUMBO, COBRE E
CÁDMIO EM MEIO AQUOSO UTILIZANDO *Bacillus subtilis***

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr.(º) José Martins de Oliveira Júnior

Universidade de Sorocaba (UNISO)

Professor Dr. (º) Darllan Collins da Cunha e Silva

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Professor Dr. (ª) Angela Faustino Jozala

Universidade de Sorocaba (UNISO)

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que
contribuíram de alguma forma durante o
trajeto para a realização desse trabalho,
tornando possível a realização desse sonho.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meu marido pelo apoio e compreensão ao longo de toda a minha jornada acadêmica. A minha mãe e meus filhos por todo o apoio, paciência e incentivo.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Angela Faustino Jozala pela ajuda, pelos ensinamentos e por todos os momentos de paciência e compreensão, o seu apoio foi fundamental para que mais um ciclo fosse completado, meu muitíssimo obrigado.

À Universidade de Sorocaba, pela bolsa de estudos fornecida, que tornou possível a conclusão dessa trajetória.

Aos laboratórios LAPETOX (Laboratório em Pesquisa Toxicológica da UNISO), LaMInFe (Laboratório de Microbiologia Industrial e Processos Fermentativos) e Lafinau (Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso), onde desenvolvi a maior parte da minha pesquisa.

À Universidade Federal do ABC, que realizou parte das minhas análises que foram fundamentais para o meu estudo.

Às minhas colegas de laboratório, em especial a Nathane De Marco, por toda a ajuda que me deram durante o período do mestrado, e por toda a contribuição para a realização desse trabalho.

Ao professor José Martins de Oliveira, por todo o tempo, paciência e toda a ajuda no desenvolvimento das análises, essenciais para o desenvolvimento da tese.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram para a conclusão dessa tese, aqui externo todos os meus sentimentos de agradecimento e gratidão.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

RESUMO

A biorremediação é uma técnica inovadora para a remoção e recuperação de áreas contaminadas, envolvendo o uso de microrganismos para reduzir ou recuperar poluentes como os metais pesados, os transformando em formas menos perigosas. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade bioacumulação dos metais pesados chumbo, cobre e cádmio pela bactéria *Bacillus subtilis* em amostras de água. Para tanto, foi realizado o isolamento do *B. subtilis* utilizando uma placa com meio de cultivo *Tryptone Soy Broth* (TSB ágar). E a partir de uma colônia isolada foi iniciado o pré-cultivo do processo, utilizando erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de TSB, submetidos a agitação a 35°C, 150 rpm por 24h. Para as análises de bioacumulação soluções matrizes iniciais de chumbo a 500 ppm, o cobre e cádmio a 100 ppm, foram preparados. Inicialmente, foi delineada a curva de crescimento do *Bacillus subtilis* em TSB₁₀₀, e TSB₃₃ (diluído em 33% da concentração padrão) para comparar com as análises de crescimento da bactéria em água contendo os metais. Todas as soluções foram colocadas em agitação a 150 rpm, 35 °C por períodos de de 1h a 144h. Em cada tempo de cultivo, amostras foram retiradas para análise de crescimento das bactérias por Sistema de Filtração Sterifil com membranas de 0,22 µm. A análise dos metais pesados ocorreu por Fluorescência de raios- X, ICP/MS e MEV. Os resultados demonstraram que o *B. subtilis* apresentou resistência ao chumbo, cádmio e cobre em água, mesmo em altas concentrações foi capaz de bioacumular os metais, mostrando uma eficiência de remoção em água de 99,5% para o chumbo; 86% para o cobre e 72,5% para o cádmio. Conclui-se que o sistema utilizando bactérias do tipo Bacilos pode ser eficiente em bioacumular metais pesados de soluções aquosas, e pode ser empregada como um tratamento econômico para a biorremediação de efluentes industriais e áreas contaminadas com metais pesados. No entanto, ainda se faz necessário um entendimento maior da etapa de otimização da implementação em áreas contaminadas.

Palavras-chave: Bactérias. Bioacumulação. Biorremediação. Metais Pesados.

ABSTRACT

Bioremediation is an innovative technique for the removal and recovery of contaminated areas, involving the utilization of microorganisms to reduce or recover pollutants such as heavy metals, transforming them into less dangerous forms or bioaccumulating them. The aim of this study was to evaluate the capacity of bioaccumulation of the heavy metals such as lead, copper and cadmium by *Bacillus subtilis* in water. For this reason, *B. subtilis* was isolated using a Petri plate with Tryptone Soy Broth (TSB agar) culture medium. The pre-culture was started from a one colony, using 250mL erlemeyers containing 50 mL of TSB, developed at 35 °C, 150 rpm for 24h. For bioaccumulation analyzes, initial matrix solutions of lead at 500 ppm, copper and cadmium at 100 ppm were prepared. Initially, the growth curve of *B. subtilis* was outlined in TSB₁₀₀, and TSB₃₃ (diluted in 33% of the standard concentration) to compare with the growth analysis of the bacteria in water containing the metals. All solutions were placed in preparation at 150 rpm, 35 ° C for periods of 1h to 144h. At each cultivation time, they are removed for analysis of bacterial growth by the Sterifil Filtration System with 0.22 µm membranes. An analysis of heavy metals by X-ray fluorescence, ICP / MS and SEM. The results showed *B. subtilis* resistance to lead, cadmium and copper in water, even at high levels, and its was able to bioaccumulate the metals, showing a water removal efficiency of 99.5% for lead; 86% for copper and 72.5% for cadmium. It is concluded that the system using Bacillus type bacteria can be efficient in bioaccumulating heavy metals in aqueous solutions, and can be used as an economic treatment for the bioremediation of industrial effluents and areas contaminated with heavy metals. However, to optimize the implementation in contaminated areas it will need more studies about it.

Key-words: Bacteria. Bioaccumulation. Bioremediation. Heavy metals

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Pb - Chumbo

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

As - Arsênio

B - Boro

Cd - Cádmio

Cu - Cobre

Hg - Mercúrio

Mo - Molibdênio

Ni - Níquel

Pb - Chumbo

Se - Selênio

Cr - Crômio

Zn - Zinco

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

mL - Mililitros

µL – Microlitros

nm – Nanômetros

TSB - *Tryptone Soy Broth*

ppm - Parte por milhão

ICP/MS - Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

HNO₃ - Ácido Nítrico

Pb(C₂H₃O₂)₂ - Acetato de chumbo

Cd(NO₃)₂ - Nitrato de cádmio

CuSO₄·5H₂O - Sulfato de cobre

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

UFC/g - Unidade formadora de colônia por gramas

CIM - Concentração Inibitória Mínima

MeHg - Metil Mercúrio

ICP-OES - Espectroscopia de Emissão Óptica Plasma Acoplada Indutivamente

VRQ – Valor de Referência de Qualidade

AP – Área com Potencial de Contaminação

EDS – Espectroscopia por energia dispersiva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Concentrações consideradas seguras para saúde humana em solos e águas.....	20
Figura 1. Isolamento da bactéria <i>B. subtilis</i> em meio de cultura ágar utilizando alça de inoculação.....	25
Figura 2. Curva de calibração do chumbo	29
Figura 3. Curva de calibração do cobre.....	31
Figura 4. Curva de calibração do cádmio	32
Quadro 2. Curva de calibração do chumbo, cádmio e cobre no mesmo sistema	32
Figura 5. Comparação entre as metodologias de absorbância e filtração para análise das curvas de crescimento bacteriano, utilizando meio de cultura TSB 100%.	35
Figura 6. Comparação entre as metodologias de absorbância e filtração para análise das curvas de crescimento bacteriano, utilizando meio de cultura TSB 33%.	36
Figura 7. Análise do crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> e o consumo de chumbo (Pb) em meios líquidos constituídos por meio de cultura diluído (TSB ₃₃) e água.	37
Figura 8. Análise de crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> e o consumo de Cobre e Cádmio em meios líquidos constituídos por meio de cultura diluído (TSB ₃₃) e água.	41
Figura 9. Análise de crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> e remoção do Chumbo, Cobre e Cádmio em água.	43
Figura 10. Eficiência de remoção dos metais.....	45
Figura 11. Microanálise qualitativa (espectro) de elementos químicos presentes na amostra chumbo.....	46
Figura 12. MEV do <i>Bacillus subtilis</i> na amostra de chumbo em água e espectro de EDS para a área analisada.	47
Figura 13. Distribuição dos elementos e imagem do <i>Bacillus subtilis</i>	48
Figura 14. Microanálise qualitativa (espectro) de elementos químicos presentes na amostra (TSB ₃₃).....	49

SUMÁRIO

1 - JUSTIFICATIVA.....	12
2 - OBJETIVO GERAL.....	14
2.1 - Objetivos Específicos	14
3 - REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 - Metais pesados e seus efeitos no meio ambiente.....	15
3.2 - Chumbo, Cobre e Cádmio	16
3.3 - Normas, padrões e regulamentações dos metais pesados no meio ambiente.....	19
4 - BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS POR BACTÉRIAS	20
6 - MATERIAL E MÉTODOS	24
6.1 - Lavagem de vidrarias.....	24
6.2 - Viabilidade do <i>Bacillus subtilis</i>.....	24
6.2.1 - <i>Pré-cultivo</i>	24
6.2.2 - <i>Análise do crescimento <i>Bacillus subtilis</i></i>	25
6.3 - Eficiência do <i>Bacillus subtilis</i> na Biorremediação dos metais pesados.....	26
6.3.1 - <i>Solução matriz dos metais pesados.....</i>	26
6.3.2 - <i>Concentração inibitória mínima - CIM</i>	26
6.3.3 - <i>Análise do crescimento em contato com metal</i>	27
6.4 - Quantificação dos metais.....	28
6.4.1 - <i>Curva analítica para fluorescência de raios-X</i>	28
6.4.2 - <i>Análise do Chumbo em Fluorescência de raios- X.....</i>	29
6.4.3 - <i>Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP/MS).....</i>	31
6.4.4 - <i>Microscópio eletrônico de varredura (M.E.V)</i>	33
6.5 - Eficiência de remoção e quantidade de metal adsorvida ou bioacumulada	34
6.6 - Análise estatística	34
7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

7.1 - Avaliação do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> em meio de cultura padrão 35	
7.2 - Biorremediação dos metais em meio líquido por cultivo de microrganismo em batelada.....	37
7.2.1 - <i>Análise da bioacumulação do Chumbo</i>	37
7.2.2 - <i>Análise da bioacumulação de cobre e cádmio.</i>	41
7.2.3 - <i>Análise da bioacumulação dos metais chumbo, cobre e cádmio no mesmo sistema</i>	43
7.3 - Eficiência de remoção dos metais.....	45
7.4 - Microscopia eletrônica das amostras e EDS	46
8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 JUSTIFICATIVA

As atividades humanas aumentaram as emissões de metais pesados no meio ambiente. A poluição por metais pesados representa uma grande ameaça para os ecossistemas devido aos seus efeitos tóxicos. Esses elementos, mesmo com baixas concentrações, são muito reativos e podem provocar uma série de distúrbios metabólicos nos organismos, tais como infertilidade, baixa nas defesas imunológicas, diminuição do crescimento e patologias que podem levar à morte dos indivíduos (KARRI, *et al.*, 2018).

O crescente aumento das contaminações por metais pesados no meio ambiente tem sido acompanhado pela preocupação com a disseminação desses elementos aos ecossistemas e a saúde humana (SILVA; FUGIL; MARINI, 2015).

A disponibilidade de metais pesados no solo vem sendo associada à aplicação de corretivos e adubos agrícolas, utilização de água de irrigação contaminada ou de produtos como lodo de esgoto, compostos de lixo urbano e resíduos diversos de indústria ou mineração. Esses elementos quando depositados na camada agricultável do solo ficam disponíveis na solução e prontamente disponíveis para as plantas, tornando-se fonte de contaminação para toda a cadeia trófica (FREITAS *et al.*, 2020; VENEGAS *et al.*, 2015).

Dentre os principais metais poluentes, os que merecem maior preocupação são o Arsênio (As), Boro (B), Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Mercúrio (Hg), Molibdênio (Mo), Níquel (Ni), Chumbo (Pb), Selênio (Se), Crômio (Cr) e Zinco (Zn). Alguns desses elementos são essenciais para plantas, mas em excesso podem se tornar prejudicial o seu desenvolvimento e afetar a saúde dos animais e do homem. Vale destacar que o mercúrio, o cádmio, o cromo, arsênio, cobre e o chumbo, estão entre os mais perigosos, causando grandes problemas para o meio ambiente e para a saúde humana (PAZ- FERREIRO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Diante desse cenário é possível encontrar alternativas para tentar minimizar os problemas ambientais causados por metais pesados utilizando processos de biorremediação. Os processos de biorremediação utilizam organismos vivos e suas enzimas na biodegradação de compostos tóxicos,

visando à sua erradicação, redução ou transformação em substâncias menos tóxicas (LEONEL *et al.*, 2018).

Por esta razão o principal objetivo desse trabalho foi utilizar um microrganismo para bioissorção dos metais pesados em amostras de água. Para tanto, a dissertação transcorrerá sobre alguns conceitos fundamentais, descrição dos materiais utilizados e das metodologias aplicadas nos ensaios realizados, incluindo os procedimentos seguidos, resultados obtidos nos ensaios, seguido pela discussão, e conclusões.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de bioacumulação dos metais chumbo, cobre e cádmio pela bactéria *Bacillus subtilis* em amostras de água.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento do *Bacillus subtilis* em meio de cultivo padrão;
- Avaliar o comportamento do *Bacillus subtilis* em amostras com chumbo, cádmio e cobre em água e utilizando substrato;
- Analisar a eficiência da remoção e biacumulação do *Bacillus subtilis* em amostras de água contaminadas com chumbo, cobre e cádmio.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Metais pesados e seus efeitos no meio ambiente

Os metais pesados são elementos químicos metálicos, de peso atômico relativamente alto, que em concentrações elevadas são muito tóxicos à vida. São elementos não biodegradáveis e apresentam, geralmente, mais de um estado de oxidação. Esses diferentes estados de oxidação determinam sua mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade, sendo introduzidos nas águas e no solo através das atividades industriais, causando grandes contaminações, diminuindo significativamente a permanência desses metais nos minérios, bem como a produção de novos compostos, além de alterar a distribuição desses elementos no planeta (GONÇAVES JR *et al.*, 2014).

O ciclo natural dos metais pesados envolve as águas dos recursos hídricos. Esses contaminantes fazem parte dos sedimentos nos corpos d'água, produzindo um aumento progressivo de suas concentrações no tempo e posterior bioacumulação, ou seja, podem ser acumulados no organismo dos seres vivos. Seus efeitos negativos podem ser assimilados no fitoplâncton e incorporados na cadeia alimentar, levando a graves alterações ecológicas e biológicas (NUNES; JESUS, 2019).

Os metais pesados são encontrados de forma solúvel no solo, onde são facilmente absorvidos pelas plantas, aumentando o risco de entrarem na cadeia trófica, e também podem ser lixiviados pelo perfil do solo, oferecendo risco de poluição para as águas (SILVA, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

Os metais têm grande afinidade com sedimentos finos e suas concentrações são controladas por processos que regem o transporte e deposição dos sedimentos. Um dos mais importantes fatores que influenciam a capacidade de adsorção dos metais contaminantes nas partículas inorgânicas é a dimensão da partícula, pois a fração fina é eletricamente ativa e possui uma grande superfície específica para adsorver os metais (MARX; KAMBER, 2014).

Nesse estudo será feita uma breve revisão bibliográfica sobre os metais pesados chumbo, cobre e cádmio, abordando as principais utilidades, funções e efeitos no meio ambiente e na saúde humana.

3.2 Chumbo, Cobre e Cádmio

O chumbo é um metal abundante na crosta terrestre amplamente distribuído e pode ocorrer devido a emissões vulcânicas, “intemperismo” das rochas ou da litosfera e emissões marítimas. Em razão de numerosas utilizações em processos industriais, o chumbo representa um dos contaminantes mais comuns no ambiente, porém este metal não desempenha nenhuma função fisiológica conhecida no organismo de animais e humanos e é um metal tóxico considerado não-essencial e acumulativo (CONSALTER, *et al.*, 2019).

O chumbo é utilizado em grande escala na fabricação de baterias de chumbo, de soldas, munições, pigmentos e ligas metálicas. Durante muito tempo tem se empregado o chumbo como manta protetora para blindagem de radiação em equipamento de raios-X e reatores nucleares (SANTOS; MONTEIRO; MAINIER, 2015).

Em geral, sua origem na água e no solo vem da poluição por efluentes industriais ou por mineração. Existem duas classes de compostos de chumbo: os inorgânicos, que são os formados por sais e óxidos de chumbo, e os orgânicos que são o chumbo tetraetila e o chumbo tetrametila. Uma vez absorvidos, todos os compostos inorgânicos atuam no organismo da mesma forma. Os compostos orgânicos são lipossolúveis e podem ser absorvidos pela pele e por via respiratória. Por serem lipossolúveis haverá um predomínio dos transtornos nervosos. A absorção do chumbo pelo corpo humano é lenta e depende não só da dose como também de fatores como a idade do indivíduo, condições fisiológicas e nutricionais e possivelmente fatores genéticos (TORRES, 2011).

Os adultos podem absorver até 10% do que foi ingerido, e em crianças a taxa de absorção pode chegar a 50%. Distribui-se fácil e rapidamente por todos os tecidos, além de passar a barreira encefálica e a placentária, sendo secretado no leite materno. A meia vida de eliminação de chumbo do organismo no sangue é de 25 a 30 dias em adultos, em crianças sob exposição ambiental a baixas doses é de 10 a 12 meses, em tecidos moles em geral 60 dias, nos ossos, trabecular de 90 a 120 dias e cortical de 25 a 30 anos (CAPITANI, 2009).

Após absorvido, o chumbo não é distribuído de forma homogênea no organismo. No sangue o chumbo circulante está quase sempre associado aos eritrócitos, sendo em seguida distribuído aos tecidos moles (maiores concentrações no fígado e rins) e aos minerais (ossos e dentes). Os ossos são principais compartimentos onde o metal se armazena, cerca de 90% do chumbo encontrado no organismo está depositado nos ossos sob a forma de trifosfato (COUTINHO, 2017).

A presença do chumbo no corpo humano pode ser prejudicial à saúde, mesmo em exposições pequenas. A toxidez aguda do chumbo é caracterizada por queimaduras na boca, sede intensa, inflamação do trato intestinal, ocasionando diarreias e vômitos, dores abdominais diversas, confusão mental, distúrbios visuais, anemia e convulsões. Substitui o Cálcio afetando, dessa forma, toda a formação óssea, provocando a queda dos dentes e osteoporose (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

O cobre é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas quando em excesso, afeta a dinâmica no sistema solo-planta e suas interações em elevadas concentrações no solo e, por conseguinte, nas células vegetais, passa a ter efeito tóxico, inibindo o crescimento e desenvolvimento das plantas (LI *et al.*, 2014). É um micronutriente essencial para o correto funcionamento do organismo, atuando como cofator em diferentes processos biológicos corporais, incluindo a respiração mitocondrial, a maturação do colágeno, a síntese de melanina, a defesa antioxidante, o metabolismo do ferro, a biossíntese de neurotransmissores, entre outros (ZORTÉA *et al.*, 2016).

O cobre é utilizado como condutor para circuitos elétricos e eletrônicos, em bobinas e comutadores de motores elétricos, em interruptores elétricos, tubulações, aquecedores, na construção civil, plantas de processamento químico e farmacêutico, em catalisadores, trocadores de calor industriais e automotivos e produtos domésticos, incluindo utensílios de cozinha (SILVA *et al.*, 2020).

A ingestão de cobre pode causar dor de cabeça, náuseas, tonturas, vômitos e diarreia, taquicardia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, hematúria, hemorragia aguda digestiva, insuficiência hepática e renal, e morte.

A exposição cutânea pode induzir respostas alérgicas em pessoas sensíveis (NOVAES, *et al.*, 2018).

Já o cádmio é encontrado naturalmente na crosta terrestre em associação com vários metais. Assim, pode ser extraído como produto secundário durante o processamento de zinco, chumbo ou cobre. Os compostos de cádmio presentes no ambiente são encontrados simultaneamente através de dois processos, sendo o primeiro por fontes naturais que incluem atividade vulcânica, intemperismo de rochas, incêndios florestais e mobilização de solos. O segundo processo acontece por meio de atividades antrópicas como derivados de baterias, pigmentos, estabilizadores plásticos, pesticidas e fertilizantes, processamento de borracha, processo de galvanização, combustão fóssil e incineração de resíduos (Angelis *et al.*, 2017).

A exposição em humanos por cádmio pode ocorrer através da alimentação, da ingestão de água contaminada, por inalação e tabagismo. O cádmio tem uma meia-vida biológica relativamente longa de 20 anos e em doses agudas pode afetar os rins, fígado, testículos e intestino. A ingestão, pode ocasionar sérios problemas de saúde como a doença conhecida como “Itai-Itai”, que tem como principais sintomas fortes dores nos ossos e frequentes fraturas. A longo prazo, a exposição ocupacional ao cádmio causa efeitos crônicos graves, como alterações pulmonares caracterizadas principalmente por doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema, além de distúrbios crônicos dos túbulos renais (ROCHA, 2016; FRANCO; MUNOZ; GARCIA, 2016).

O cádmio atinge o organismo da maioria dos animais e chega a corrente sanguínea se ligando à albumina, sendo então transportado até o fígado, onde induz a síntese de metalotioneína. O cádmio é um elemento com capacidade biocumulativa que pode competir com elementos essenciais, além de causar diversas alterações no organismo, como desregulação hormonal, estresse oxidativo e apoptose. No sistema reprodutor masculino, o cádmio pode prejudicar o funcionamento normal do sistema, gerando menor capacidade reprodutiva (NAN *et al.*, 2017).

3.3 Normas, padrões e regulamentações dos metais pesados no meio ambiente

Devido ao potencial tóxico dos metais pesados, existem legislações específicas para o controle e o monitoramento da qualidade das águas residuais que são depositadas em corpos hídricos dulcícolas, salobres e 31 marinhos. No Brasil, observa-se a atuação da Resolução nº 430, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2011), que determina limites permitidos de concentração de compostos químicos inorgânicos e orgânicos contidos em efluentes e águas residuais, para que estes sejam depositados em ambientes naturais sem ocasionar prejuízos na comunidade biológica, nem alterações físicas e químicas significativas na qualidade de água.

Já a resolução, nº 420 de 28 de dezembro de 2009, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade (VRQ) do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

No âmbito do Estado de São Paulo, o Decreto Estadual nº 59.263/2013, que regulamenta a Lei nº 13.577/2009, para disciplina de proteção da qualidade do solo contra alterações nocivas por contaminação, e estabelece as condições que deverão ser observadas no monitoramento preventivo das áreas com potencial de contaminação (AP) onde ocorre o lançamento de efluentes ou resíduos no solo como parte de sistemas de tratamento ou disposição final.

Os valores de concentrações consideradas seguras para saúde humana de cádmio, cobre e chumbo, orientados para solos e águas subterrâneas, água potável e padrões para lançamento de efluentes podem ser observados no Quadro 1.

Quadro 1. Concentrações consideradas seguras para saúde humana em solos e águas

	Chumbo	Cádmio	Cobre	
Solos e águas subterrâneas	72 mg Kg ⁻¹	1,3 mg Kg ⁻¹	60 mg Kg ⁻¹	CONAMA 420/2009
Lançamento de efluentes	0,5 mg/L	0,2 mg/L	1,0mg/L	CONAMA 430/2011
Padrões em água potável	10 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	2.000 µg L ⁻¹	PORTARIA 2.914/2011

Fonte: Adaptado de CETESB.

4 BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS POR BACTÉRIAS

A busca por alternativas viáveis para conter a poluição vem crescendo e o estabelecimento de leis internacionais que regulam a questão do gerenciamento ambiental, aliado à pressão por parte de governos e opinião pública, faz com que grandes esforços venham sendo dedicados ao desenvolvimento de tecnologias mais limpas para o tratamento de resíduos e a remediação de ambientes contaminados. Uma alternativa eficaz para degradar contaminantes tóxicos do solo e da água é o processo biológico de biorremediação (FRANCISCO; QUEIROZ, 2018).

A biorremediação pode ser definida como um processo de tratamento que utiliza o metabolismo de microrganismos para remoção de poluentes tóxicos, com o objetivo de reduzir sua concentração a níveis aceitáveis, transformando-os em compostos menos tóxicos. Essa técnica é bastante promissora, pois visa à minimização dos impactos antrópicos e à reestruturação dos habitats naturais. Essa tecnologia oferece uma maior segurança, uma menor perturbação ao meio ambiente e também é uma ferramenta eficiente a custos mais baixos que os métodos convencionais de remediação (PEREIRA; FREITAS, 2012).

A biorremediação possui grande aplicabilidade e a otimização do seu processo depende das condições ambientais, do tipo de contaminante e da

técnica empregada. Os tratamentos se diferenciam por ser “in situ” (quando é realizado no próprio local) ou “ex situ”, (quando há remoção do contaminante para tratamento em outro ambiente) (PERUZZO *et al.*, 2018).

As bactérias se destacam dentre a diversidade de microrganismos viáveis para biorremediação em decorrência da sua maior velocidade de crescimento em comparação aos fungos e leveduras, quando em condições favoráveis. O consórcio de microrganismos também pode proporcionar uma completa bioissorção dos contaminantes. Então, microrganismos que não apresentam potencial para bioissorção completa de determinado composto, poderão transformá-lo em uma substância menos tóxica e mais biodisponível para um segundo microrganismo (TOMASSONI *et al.*, 2014).

O mecanismo bioquímico microbiano não é capaz de degradar um átomo contaminante, mas sim de mudar o estado de oxidação do metal, permitindo a sua detoxificação. Independente das reações que ocorram, provavelmente, o metal ainda permanecerá no local, já que as bactérias possuem capacidade para concentrar ou remover metais, seja em forma de precipitados ou de substâncias voláteis, transformando as espécies em compostos menos tóxicas e mais facilmente disponíveis (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

São diversos os mecanismos que os microrganismos utilizam em resposta aos metais pesados. Esses mecanismos podem ser codificados por genes cromossomais ou plasmidiais, e englobam fixação desses metais em complexos intracelular e extracelular, extrusão de íons metálicos por transporte ativo, reações de oxidação, redução, metilação e desmetilação (LEEDJARV; IVASK; VIRTÁ, 2008).

O processo de captação dos metais pode ocorrer de duas formas: por bioacumulação e bioissorção. A bioacumulação ocorre quando um íon metálico é captado por meio do material biológico com atividade metabólica. E a bioissorção envolve duas fases, a adsorção e a absorção. A adsorção é independente de energia e atividade metabólica, chamada também de captação passiva. E a absorção depende de energia e metabolismo (MUSTAPHA; HALIMOON, 2015).

As principais bactérias utilizadas em biorremediação são os gêneros *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*,

Arthrobacter, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* e *vibrio* (NITSCHKE; PASTORE, 2002; JACQUES *et al.*, 2019; SAGARKAR *et al.*, 2014).

O gênero *Bacillus*, em especial o *Bacillus subtilis* compreende um grupo de bactérias Gram-positivas largamente utilizada em processos biotecnológicos industriais para a produção de antibióticos, enzimas, produtos agroativos, entre outros. São microrganismos altamente resistentes em condições adversas presentes no meio ambiente, devido a capacidade de formação de esporos, que suportam extremos de pH e temperatura, dessecação, radiação UV e diversos produtos químicos como pesticidas e fertilizantes (OLIVEIRA, 2006).

Condições ambientais extremas, condicionam a célula bacteriana a entrar em estágio de dormência, de crescimento lento ou de fase estacionária. Quando isso ocorre, as células ensaiam respostas adaptativas como desenvolvimento da motilidade, transformação genética do DNA exógeno e produção da enzima surfactina. Já quando ocorre escassez de nutrientes, as células formam endósporo, o que proporciona a paralização do ciclo de crescimento e divisão célula (FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

O interesse biotecnológico do *Bacillus subtilis* se destaca por causa do seu mecanismo metabólico de produção de lipopeptídios, que são moléculas anfifílicas com propriedades biossurfactantes e antimicrobianas. A produção de lipopeptídios, associada a capacidade de formação de esporos, contribui para a utilização comercial desse microrganismo em função das múltiplas aplicações biológicas, principalmente pela atividade antagônica contra diversos fito patógenos (STEIN, 2005).

O biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* possui atividade anfifílica que agem nas interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre elas, e assim tornando os compostos mais miscíveis. Devido a essa característica, os biossurfactantes são utilizados na indústria farmacêutica, de petróleo, cosméticos, na agricultura na formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal,

detergentes, processamento de alimentos, tratamento e processamento de metais, entre outros (SILVA, 2007).

6 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Industrial e Processos Fermentativos na Universidade de Sorocaba (UNISO), em Sorocaba/ SP.

6.1 Lavagem de vidrarias

Foi realizado um Banho de Ácido-Base em todas as vidrarias utilizadas neste projeto. O banho foi realizado aplicando solução de HNO₃ 1M por 12h; após este tempo, as vidrarias foram dispostas por mais 12h em solução de NaOH 1M em solução alcoólica 50%; após este período de tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água destilada e dispostas a secagem em estufa incubadora (Quimis – Diadema, São Paulo, Brasil) por 24h. O banho foi uma etapa importante para retirar qualquer impureza das vidrarias que pudesse alterar os resultados das análises.

Após o Banho de Ácido-Base, as vidrarias e os meios de cultivo foram submetidos ao processo de esterilização por vapor saturado sobre pressão a 121 °C por 30 minutos, a fim de promover completa eliminação de quaisquer formas de microrganismo presentes.

6.2 Viabilidade do *Bacillus subtilis*

6.2.1 Pré-cultivo

O pré-cultivo da bactéria foi realizado a partir do isolamento das colônias em placa (Figura 1), contendo meio de cultivo *Tryptone Soy agar* (TSA), utilizando a bactéria em estoque congelada. As colônias foram isoladas da placa utilizando uma alça de inoculação, e armazenada em estufa a 35°C por 24h. Após esse período, foi retirada uma colônia da placa e disposta em frasco

Erlemeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo Trypticase Soy Broth (TSB). O frasco foi colocado em agitador de bancada a 35°C, 150 rpm por 24h.

Figura 1. Isolamento da bactéria *B. subtilis* em meio de cultura ágar utilizando alça de inoculação.



Fonte: Elaboração própria

6.2.2 Análise do crescimento *Bacillus subtilis*

Para a curva de crescimento foram utilizados os meios de cultura TSB e a água destilada. Os meios foram preparados em Erlenmeyers de 125 mL da seguinte forma, (i) Meio 33% foi utilizado 34 mL de água destilada estéril contendo 6 mL de TSB; (ii) Meio padrão 40mL. Ambos os meios foram inoculados com 1mL do pré-cultivo. Os frascos foram colocados em agitação a 150 rpm, 35 °C em diferentes períodos de tempo 4h, 8h, 18h, 20h, 24h, 48h, 72h, 96h. Ao final de cada período amostras foram coletadas e analisado o crescimento através de metodologias de absorbância e filtração.

Para metodologia de filtração, amostras de 10 mL foram submetidas ao Sistema de Filtração Sterifil (Millipore) através de membranas de 0,22 µm. Após a filtração as membranas foram colocadas em estufa 50 °C por 10 minutos e em seguida colocadas em dissecador por 15 minutos para resfriar e pesadas. Cada membrana foi pesada antes e depois da filtração.

Para a espectrofotometria o equipamento foi ajustado para 600 nm, e separado uma aliquota 200 µL de cultivo da curva de crescimento do *Bacillus subtilis* conforme eram retiradas da agitação em cada período, e dispostos em placa de 96 poços em triplicata para análise.

6.3 Eficiência do *Bacillus subtilis* na Biorremediação dos metais pesados

6.3.1 Solução matriz dos metais pesados

Para a preparação das soluções de estoque de metal pesado foi utilizado matrizes de 1000 ppm em água Milli-Q dos compostos acetato de chumbo $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (Grau de pureza mínima 98%), nitrato de cádmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (Grau de pureza mínima 99%) e sulfato de cobre $\text{CuSO}_{4.5}\text{H}_2\text{O}$ (grau de pureza mínima 98%), disponíveis no laboratório. Para a solução com chumbo foi utilizada diluição para a concentração de 500 ppm. Já as soluções com cobre e cádmio foram diluídos para a concentração de 100 ppm. Todas as soluções foram diluídas a partir das matrizes (1000ppm) e utilizando água estéril.

6.3.2 Concentração inibitória mínima - CIM

Para verificar a sensibilidade do microrganismo aos metais pesados, foi realizada a metodologia CIM adaptada de Ataíde *f.*, (2017), utilizando metais para determinar as concentrações utilizadas no experimento. A metodologia do CIM foi adaptada em microplacas de 96 poços. Estas adaptações permitiram a realização de duplicata do ensaio. Em doze poços, da microplaca de 96, foram distribuídos 100 µL de meio de cultura em cada poço, exceto para o poço número 1.

No primeiro poço da série, foi adicionado 200 µL da solução filtrada, assim sendo transferido 100 µL do poço 1 para o poço 2, foi repetida a transferência

sucessiva até o poço 11. Foi adicionado em todos os poços, exceto para o de número 11, 10 µL do inóculo (microrganismos em teste) em concentração conhecida, estipulada em 10^6 UFC/ mL. Os poços 11 e 12, como controle negativos (Meio de cultura + antimicrobiano) e positivo (Meio de cultura + inóculo), respectivamente. A placa foi tampada. Incubada à temperatura de 37°C para o crescimento dos microrganismos em questão, por 24h. Após este período, procede-se à leitura do resultado, inoculando 5 µL de cada poço em placas de Petri contendo Agar TSB. O CIM será o poço de maior diluição em que se verifica a ausência de crescimento bacteriano.

6.3.3 *Análise do crescimento em contato com metal*

Para análise do crescimento do *Bacillus subtilis* em meio de cultura contendo Pb foram elaborados três soluções diferentes: (i) Solução A (controle) contendo 34 mL de água estéril + 6 mL de TSB + 1 mL de pré cultivo (controle). (ii) Solução B contendo 20 mL de matriz de metal + 14 mL de água estéril + 6 mL TSB + 1 mL de pré cultivo. (iii) Solução C contendo 20 mL de matriz de metal + 20 mL de água estéril + 1 mL de pré cultivo. Todas as soluções ficaram com um volume total de 41 mL e concentração de 500 ppm do metal.

As soluções foram colocadas em agitação 150 rpm, 35° C por períodos de 4h, 8h, 18h, 24h, 48h, 72h e 96h. Posteriormente, a Solução C foi definida como melhor metodologia e períodos de 1h, 2h30, 120h e 144h foram acrescentados.

Para análise do crescimento em amostras contendo cádmio e cobre foi utilizada apenas a solução C, contendo um volume de 41 mL e a concentração de 100 ppm. colocadas em agitação a 150 rpm, 35 °C por periodos de 0h, 1h, 2:30h, 4h, 8h, 18h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h.

Após cada período as amostras foram coletadas e uma aliquota de 10 mL foi filtrada em Sistema de Filtração Sterilil com membranas de 0,22 µm. Após a filtração as membranas foram colocadas em estufa 50 °C por 10 minutos e em seguida colocadas em dissecador por 15 minutos para resfriar. Cada membrana

foi pesada antes e depois da filtração. Também foi separado 5 mL de cada solução para serem analisadas por Fluorescência de Raios X e ICP/MS.

Por último, foi preparado uma nova curva de crescimento utilizando uma matriz contendo chumbo, cádmio e cobre em água no mesmo sistema. Para a solução foi utilizado 20 mL de matriz + 20 mL de água estéril + 1 mL de pré cultivo. As soluções ficaram com 41 mL e a concentração com 100 ppm. As amostras foram colocadas em agitação por períodos de 10 minutos, 30 minutos, 1h, 2h, 8h, 24h, 48h e 144h. Conforme as soluções foram sendo retiradas, foi separado uma aliquota de 5 mL para análise no ICP/MS, e 10 mL para filtração em Sistema de Filtração Sterifil com membranas de 0,22 µm. Após a filtração, as membranas foram colocadas em estufa 50 °C por 10 minutos, e em seguida colocadas em dissecador por 15 minutos para resfriamento para pesagem.

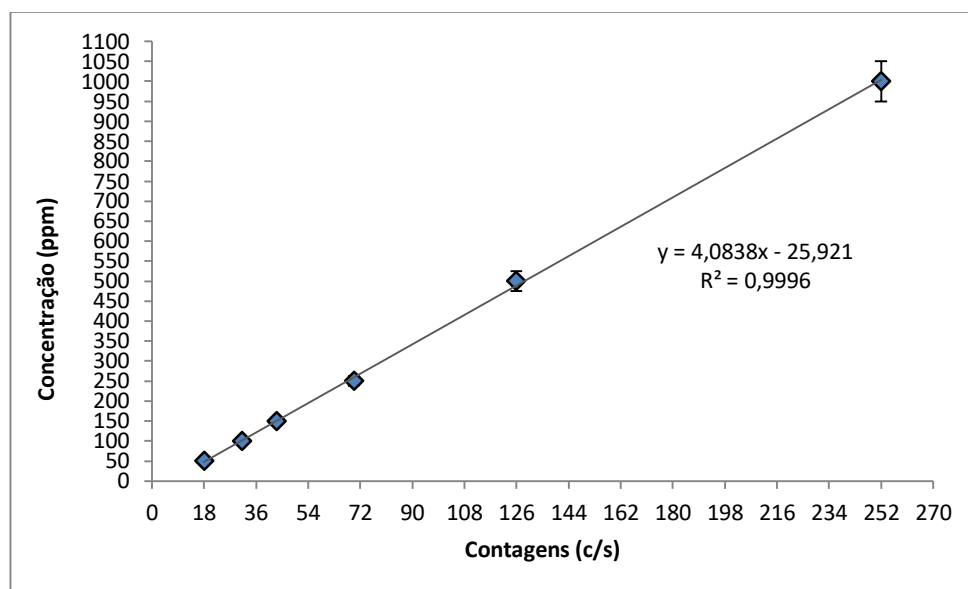
6.4 Quantificação dos metais

6.4.1 Curva analítica para fluorescência de raios-X

Para a calibração do equipamento de Fluorescência de raios-X foi realizada a diluição das amostras a partir da matriz do chumbo de 1000 ppm nas concentrações de 500 ppm, 250 ppm, 150 ppm, 100 ppm e 50 ppm.

A Figura 2 apresenta os dados de uma das curvas de calibração do chumbo (1000 ppm).

Figura 2. Curva de calibração do chumbo



Fonte: Elaboração própria

6.4.2 Análise do Chumbo em Fluorescência de raios- X

Para as análises foi realizado um teste para verificar se o chumbo precipitava. Foi colocado 10 mL de água + 5 mg de chumbo (500 ppm) em tubo falcon, homogeneizado e centrifugado a 5000 rpm, 4 °C por 20 minutos. Após a centrifugação foi analisado por Fluorescência de raios- X 5 mL da parte superior do tubo e na sequência 5 mL da parte inferior do tubo. Com isso, foi possível verificar que o metal estava por toda a amostra, indicando que não houve precipitação do chumbo.

Os ensaios com chumbo foram realizados a partir da curva de crescimento do microrganismos. As amostras foram retiradas da agitação após cada período, centrifugadas a 5000 rpm, 4 °C por 20 minutos, em seguida foi separado o sobrenadante e congelado para as análises no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso (LAFINAU) por Fluorescência de raios- X por Dispersão de Energia. Foi escolhido o sobrenadante para as análises ao invés do precipitado

por economia dos materiais e por conta do descarte no final do experimento, pois se fosse utilizado o material precipitado, seria necessário o preparo de uma quantidade maior de solução para obter a quantidade de massa celular necessária para as análises.

A técnica de fluorescência de raios- X consiste na emissão de raios- X característicos de um material que foi excitado por meio de bombardeio com raios- X de alta energia ou raios gama. Como cada elemento possui um conjunto único de níveis de energia atômica, emite um conjunto único de raios- X, característicos de tal elemento. Portanto, a presença de raios- X característicos indica diretamente a presença de um determinado elemento. Além disso, a intensidade de uma linha de raios- X depende do número de átomos correspondentes que foram excitados, permitindo a identificação e quantificação dos elementos químicos presentes em uma amostra (POLES *et al.*, 2016).

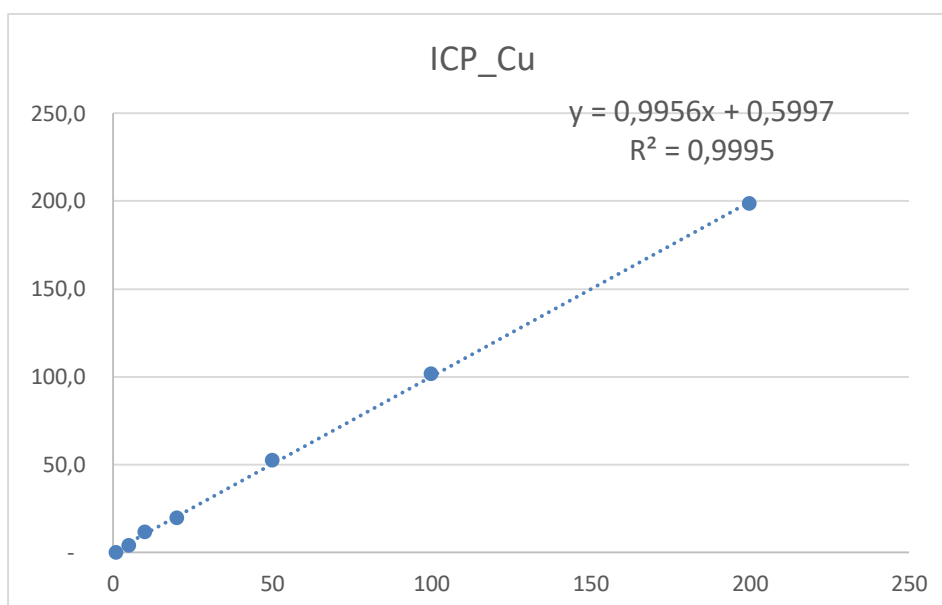
As amostras foram analisadas no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso (LAFINAU). O equipamento de fluorescência por raios-X utilizado neste trabalho é um sistema compacto, comercializado pela empresa Amptek (Bedford, Massachusetts, EUA) (<https://www.amptek.com/>), composto por um detector de silício (Silicon Drift Diode) de 25 mm² de área e com 500 µm de espessura, protegido por uma janela de 12,5 µm de berílio. A fonte de raios-X utilizada para a excitação das amostras consiste em um tubo de raio-X em miniatura com um ânodo de prata (Ag), comercializado pela empresa Amptek (Bedford, Massachusetts, EUA). O tubo de raios-X foi configurado para funcionar com tensão de 30 kV e corrente de 10 µA. Todas as medidas foram realizadas em ar e o tempo de excitação das amostras foi ajustado em 300 segundos (tempo vivo). Um colimador com uma abertura de 2 mm foi posicionado na saída da fonte de raios-X. O sistema EDXRF foi calibrado através do uso de amostras de controle. Além disso, foram utilizados o software ADMCA fornecido pela Amptek (Bedford, Massachusetts, EUA) para aquisição e controle de dados. As análises qualitativa e quantitativa foram feitas pelo software XRS-FP TM também fornecido pela Amptek (Bedford, Massachusetts, EUA).

6.4.3 Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP/MS)

Para a calibração do equipamento de ICP/MS foi realizada a diluição das amostras a partir da matriz do chumbo, cádmio e cobre de 500 ppm nas concentrações de 250 ppm, 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm e 50 ppm.

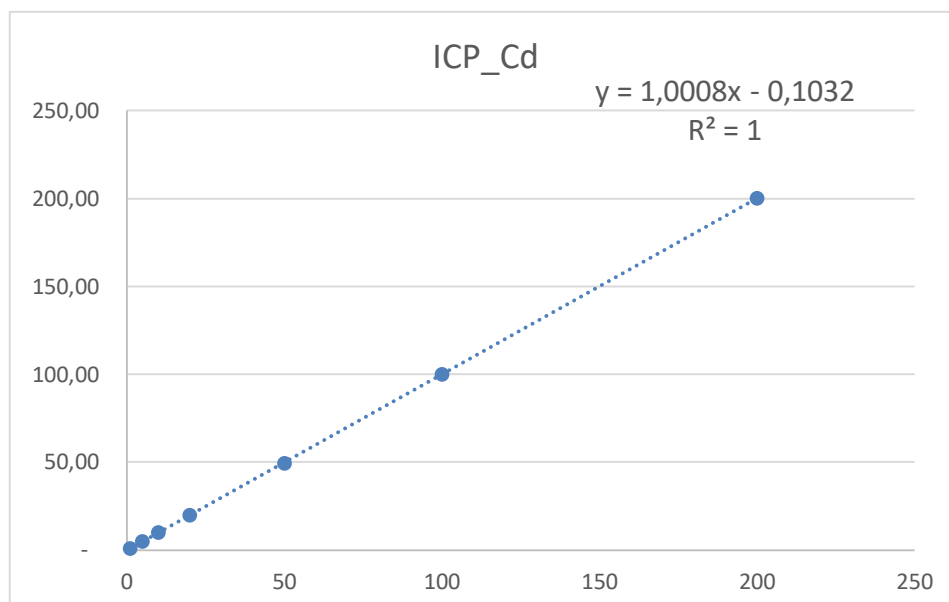
A Figura 3 apresenta os dados da curva de calibração do cobre.

Figura 3. Curva de calibração do cobre



Fonte: Elaboração própria

A Figura 4 apresenta os dados da curva de calibração do cádmio.

Figura 4. Curva de calibração do cádmio

Fonte: Elaboração própria

O Quadro 2 apresenta os valores de calibração do chumbo, cádmio e cobre no mesmo sistema.

Quadro 2. Calibração do chumbo, cádmio e cobre no mesmo sistema

Calibração dos metais no mesmo sistema			
Tempo	Cádmio ppm	Cobre ppm	Chumbo ppm
0	100	100	100
10 min	47,6	158	33
30 min	35,2	132,7	28,7
1h	44,8	158,4	33,6
2h	34,7	155,7	14,5
8h	48,7	165,9	16,5
24h	49,5	166,7	11,9
48h	42,9	180	21,5
144h	40,3	182,9	12

Fonte: Elaboração própria

Os ensaios com cádmio, cobre e com os metais no mesmo sistema (chumbo + cádmio + cobre) foram realizados a partir das respectivas curvas de crescimento. As amostras foram retiradas da agitação após cada período, centrifugadas a 5000 rpm, 4 °C por 20 minutos, em seguida separado o sobrenadante e congelado e analisadas na Universidade Federal do ABC por ICP/MS.

As determinações dos elementos químicos foram realizadas usando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) com célula de colisão (7900, Agilent, Hachioji, Japão). O equipamento foi operado com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair, Brasil). O sistema de introdução de amostras foi composto por uma câmara de spray UHMI de dupla passagem Scott de quartzo e um nebulizador MiraMist® conectado por tubos Tygon®. As condições operacionais estavam de acordo com Pedron *et al.*, (2016). As amostras foram acidificadas (1% v v⁻¹) com HNO₃ 14 M sub-fervido (Synth, Brasil) e injetadas diretamente no ICP-MS.

Os padrões para calibração foram preparados diluindo os comerciais (10000 ppm adquiridos da Perkin Elmer, EUA) em HNO₃ 1% v.v⁻¹ no intervalo de 0 a 200 ppm. O coeficiente de correlação para curvas de calibração foi de 0,999. O desempenho do método foi controlado pela análise de espaços em branco do reagente e material de referência SRM 1640a Natural Water do "Instituto Nacional de Padrão e Tecnologia", (PEDRON *et al.*, 2016).

6.4.4 Microscópio eletrônico de varredura (M.E.V)

Para as análises de microscopia eletrônica foi utilizado o material precipitado das amostras de meio de cultivo com chumbo e TSB₃₃. As amostras foram previamente liofilizadas e fixadas com fita carbono, submetidas a metalização por 2 minutos (DH-29010SCTR Smart Coater) e lidas (região da parte central das amostras) no equipamento de microscopia eletrônica de varredura (JSMIT200).

6.5 Eficiência de remoção e quantidade de metal adsorvida ou bioacumulada

A capacidade de bioacumulação por via metabólica dos metais na massa de bactéria presente no meio (Q) foi avaliado utilizando a equação 1 (Eq.1) adaptada de (Al-Gheeth *et al.*, 2017).

$$Q_{max} = \frac{V \cdot (C_i - C_f)}{M} \quad (1)$$

Onde:

Q_{max} = capacidade de adsorção/bioacumulação dos metais por grama de massa de bactéria (mg/g)

C_i = concentração inicial de metal no instante 0 (mg/L)

C_f = concentração final de metal em cada período de tempo (mg/L)

V = volume do meio (L)

M = Peso seco da bactéria (g)

Já a eficiência de remoção modificada de (Xu *et al.*, 2019) foi avaliada pela equação 2 (Eq. 2).

$$E\% = \frac{c_i - c_f}{c_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$E\%$ = eficiência de remoção porcentagem.

C_i = concentração inicial de metal

C_f = concentração final de metal em cada período de tempo.

6.6 Análise estatística

As análises de crescimento do *Bacillus subtilis* foi realizada por ferramenta estatística *test t Student* e ANOVA uma via, seguida de *Tukey test*.

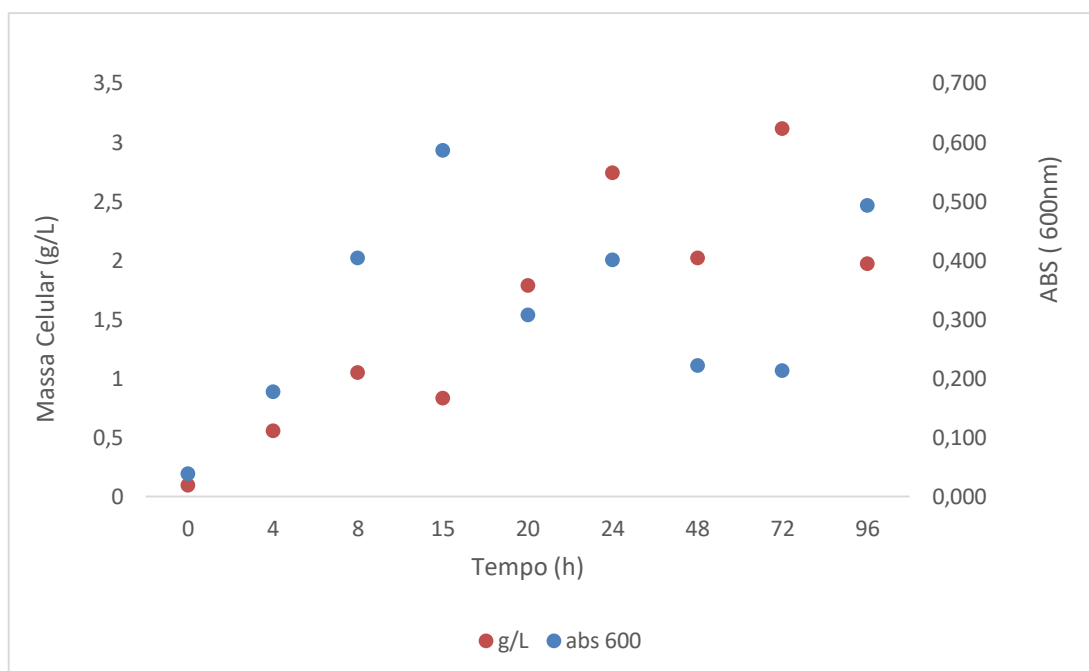
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Avaliação do crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura padrão

Os resultados obtidos da análise de crescimento evidenciaram comportamentos díspares entre os meios de cultura como mostra a Figura 5. Cabe ressaltar que os resultados coletados deste ensaio foram a base para avaliar a adaptação do microrganismo nos ensaios com metais sem adição de fontes nutricionais extras – trecho que será discutido adiante no texto.

A Figura 5 apresenta os resultados do crescimento bacteriano das metodologias de filtração com membranas (massa celular g/L) e a absorbância (abs 600nm), em meio de cultivo padrão TSB com e sem diluição, considerados 100%.

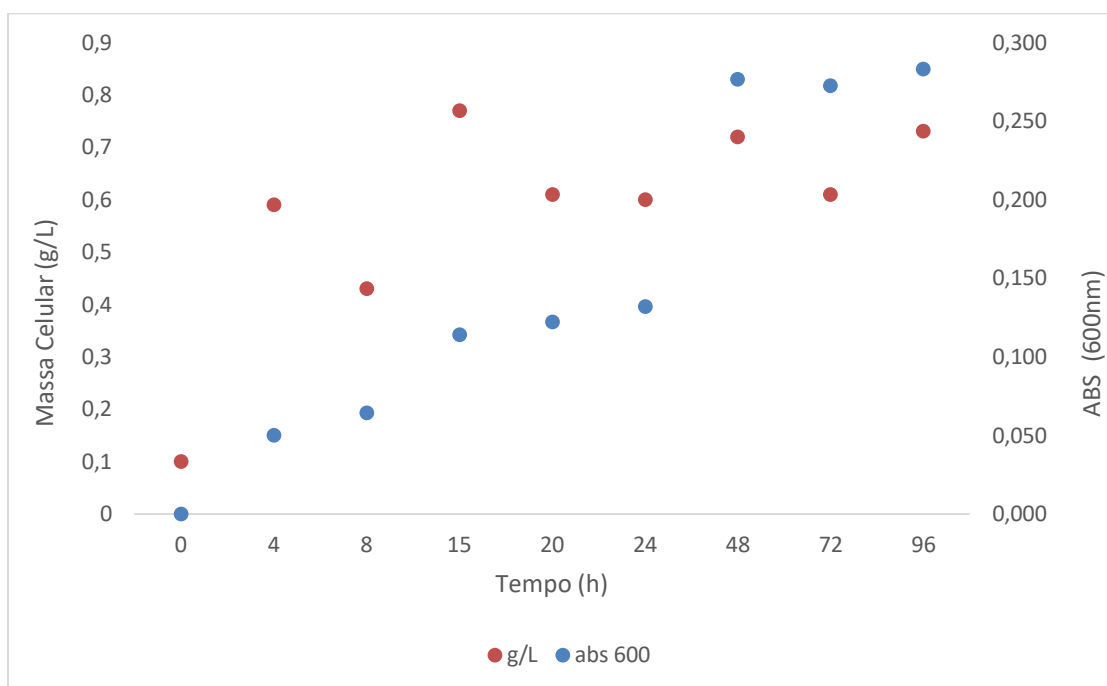
Figura 5. Comparação entre as metodologias de absorbância e filtração para análise das curvas de crescimento bacteriano, utilizando meio de cultura TSB 100%.



* As análises de massa (g/L) e absorbância da bactéria foram realizados em triplicata, produzindo um erro experimental de $p < 0.01$. Fonte: Elaboração própria

A Figura 6 apresenta os resultados do crescimento bacteriano das metodologias de filtração com membranas (massa celular g/L) e a absorbância (abs 600nm), em meio de cultivo padrão TSB com e sem diluição, considerados 33%.

Figura 6. Comparação entre as metodologias de absorbância e filtração para análise das curvas de crescimento bacteriano, utilizando meio de cultura TSB 33%.



* As análises de massa (g/L) e absorbância da bactéria foram realizados em triplicata, produzindo um erro experimental de $p < 0.01$. Fonte: Elaboração própria

Foi possível observar através das Figuras 5 e 6 que no meio de cultura TSB 33% o crescimento foi mais discreto que no meio 100%. Isso ocorreu pois as fontes nutricionais disponíveis foram reduzidas. Porém, existe uma tendência de aumento no crescimento, em ambos os meios, em aproximadamente 4 horas de cultivo. A máxima concentração de massa celular observada para os meios de cultura foi de aproximadamente 3 g/L para o TSB₁₀₀ em 72 horas de cultivo e de 0,6-0,7 g/L para TSB₃₃ entre 15 horas e 96 horas de cultivo.

Pelo teste *test t Student*, comparando o grupo peso, no meio TBS₃₃ foi significativamente menor em todos os tempos, exceto 48 horas e 72 horas,

nesses dois tempos, independente da concentração de 100% ou 33%, o crescimento foi igual.

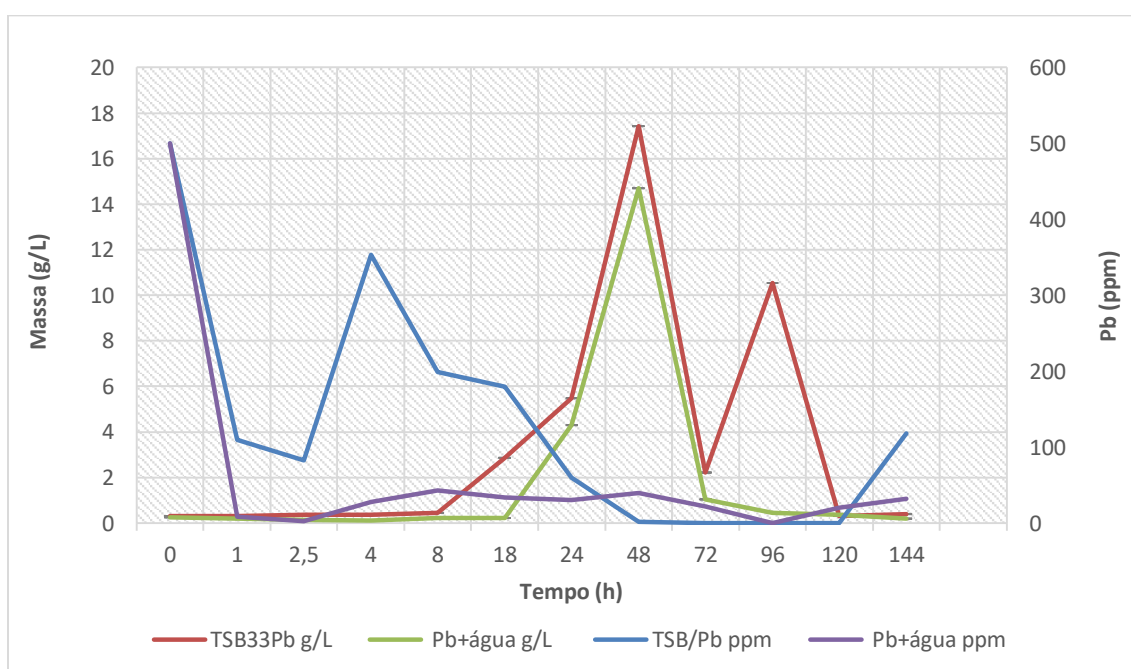
Esses resultados indicam que a melhor metodologia para avaliar o crescimento do microrganismo frente aos metais é a determinação por concentração – massa celular em g/L. E ainda, indicam que podemos conduzir os ensaios utilizando metal reduzindo em 70% os componentes nutricionais do meio de cultura (TSB 33%).

7.2 Biorremediação dos metais em meio líquido por cultivo de microrganismo em batelada

7.2.1 Análise da bioacumulação do Chumbo

As análises dos sobrenadantes por Fluorescência de raios- X para verificar a remoção de chumbo pelo microrganismo *Bacillus subtilis* em meio líquido, meio de cultura TSB₃₃ e água, e o comportamento do microrganismo com relação ao seu crescimento podem ser observados através da Figura 7.

Figura 7. Análise do crescimento do *Bacillus subtilis* e o consumo de chumbo (Pb) em meios líquidos constituídos por meio de cultura diluído (TSB₃₃) e água.



* As análises de massa (g/L) da bactéria foram realizados em triplicata, produzindo um erro experimental de $p < 0.05$. Fonte: Elaboração própria

O ensaio em meio de cultura (TSB₃₃), contendo 500 ppm de chumbo, representado pela linha verde, iniciou com a massa celular na concentração de 0,31 g/L do microrganismo e na primeira hora de cultivo o valor do chumbo foi reduzido 5 vezes, passando de 500 ppm para 100 ppm. Entretanto em 4 horas de cultivo houve um aumento de 3 vezes da concentração do chumbo, passando de 100 para 350 ppm.

Do período inicial até o 8 horas houve bioacumulação ou adsorção do metal pela bactéria e não houve crescimento da massa celular, sendo a concentração de metal (mg) bioissorvido por grama de bactéria Q_{max} de 16 mg/g para 1 hora até 20 mg/g em 8 horas.

Podemos observar na Figura 7 que a concentração do chumbo variou até 18 horas de cultivo, chegando a aproximadamente 180 ppm e o valor de Q_{max} observado foi de 3 mg/g, 6 vezes menor do que em 8 horas. Indicando uma possível melhora do processo de adsorção.

Entretanto, a partir de 24 horas foram observadas as principais diferenças com relação ao crescimento do microrganismo, pois a massa celular no cultivo que aumentou 17 vezes atingindo 5,47 g/L e a concentração do chumbo reduziu 8,3 vezes do valor inicial, atingindo o valor de 60ppm e um Q_{max} de 0,5mg/g. Em 48 horas de cultivo o valor da massa celular aumentou 56 vezes, chegando a 17,42 g/L e o não foi encontrado chumbo na amostra, essa condição se manteve até 120h, mantendo um Q_{max} 0. Porém, em 144h do cultivo o valor da concentração do chumbo foi aproximadamente 100 ppm e a massa celular semelhante a fase inicial 0,39 g/L e o Q_{max} de 14 mg/g.

Já para o ensaio em água contendo 500 ppm de chumbo, representado pelo tracejado roxo e pontilhado vinho, a massa celular do microrganismo apresentou a concentração de 0,24 g/L e na primeira hora de cultivo o valor do chumbo observado foi 61 vezes menor, passando de 500 ppm para 8 ppm, observado um Q_{max} 9 mg/g.

Entre 4 e 72 horas de cultivo houve um aumento e oscilação na concentração do chumbo entre 20 e 40 ppm. Em 96 horas de cultivo não foi encontrado chumbo na amostra e a concentração celular foi de 0,44 g/L e Q_{max} de 0. Isso pode ocorrer devido a fenômenos de adsorção e dessorção do metal. Entretanto, em 120 e 144h do cultivo o valor da concentração do chumbo aumentou sendo 20 e 30 ppm, respectivamente e a massa celular de 0,36 e 0,19 g/L, Q_{max} 7 mg/g. A massa de bactéria (g/L) foi significativamente menor no meio contendo somente água, sendo $p < 0.05$, mostrando diferença quando comparado ao tempo zero. Já para o meio contendo TSB ($p < 0.05$) apenas no tempo 120 horas não houve diferença estatística.

Parte das amostras foram analisadas por fluorescência de raios-X, por conta da alta concentração contida nas amostras e por não ter interferência de leitura do equipamento para esse elemento. As análises por fluorescência de raios x por dispersão de energia puderam confirmar que a maior parte do chumbo ficou depositado no material precipitado composto pelo microrganismo. Alguns trabalhos descrevem a Espectrometria de Fluorescência de raios-X como uma técnica não destrutiva que permite identificar os constituintes de uma amostra (líquidos, sólidos ou pós) qualitativa e quantitativamente, com a vantagem de uma fácil preparação da amostra, (RAMACHANDRA, 2016; FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

Zhao *et al.*, (2019) avaliaram os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* na redução dos íons de prata em nanopartículas de prata e observaram ainda, que esse microrganismo poderia catalisar a redução de corantes orgânicos e reduzir a contaminação por Ag^+ e Pb^{2+} na água.

Os mesmos pesquisadores em estudo recente Zhao *et al.*, (2020), relatam que o mecanismo do *Bacillus subtilis* para a remediação de metais permanece desconhecido. Já Abdel *et al.*, (2005) e Al-Gheeti *et al.*, (2017), afirmam que os diferentes microrganismos sejam gram-positivos, gram-negativos e filamentosos tem a capacidade de adsorver metais em sua membrana celular.

Em nosso estudo com o chumbo observamos através dos resultados que pode haver um consumo desse metal pelo microrganismo e também uma bioacumulação. Quando utilizado o meio de cultura TSB₃₃ sem o chumbo a máxima concentração celular foi de 0,7 g/L e quando havia chumbo na solução

o maior valor de massa celular observado foi de 17,42 g/L. O mesmo pode ser observado em água, que apresentou um valor de 14,7 g/L de massa celular. Porém, essa alta concentração de massa não está relacionada a máxima adsorção do metal.

A remoção máxima de chumbo em meio de cultura (TSB₃₃) pela biomassa bacteriana foi registrada no períodos de 48 horas com o consumo de 99,7% e 72 horas com o consumo total do metal, alcançando 100% de remoção de chumbo. Já no ensaio em água a remoção máxima registrada ocorreu no período de 96 horas com remoção de 100% do metal. Enquanto que, na primeira hora do processo a remoção de chumbo teve o melhor resultado de eficiência chegando a 98,4%.

Al-Ghethi *et al.*, (2017) relatam que uma das considerações na utilização de biomassa bacteriana na remoção de metais pesados é a bioacumulação. Os autores inativaram termicamente a Biomassa de *Bacillus subtilis* 2012WTNC e observaram um valor bioadsorção - Q_{max} superior a 150 mg/g.

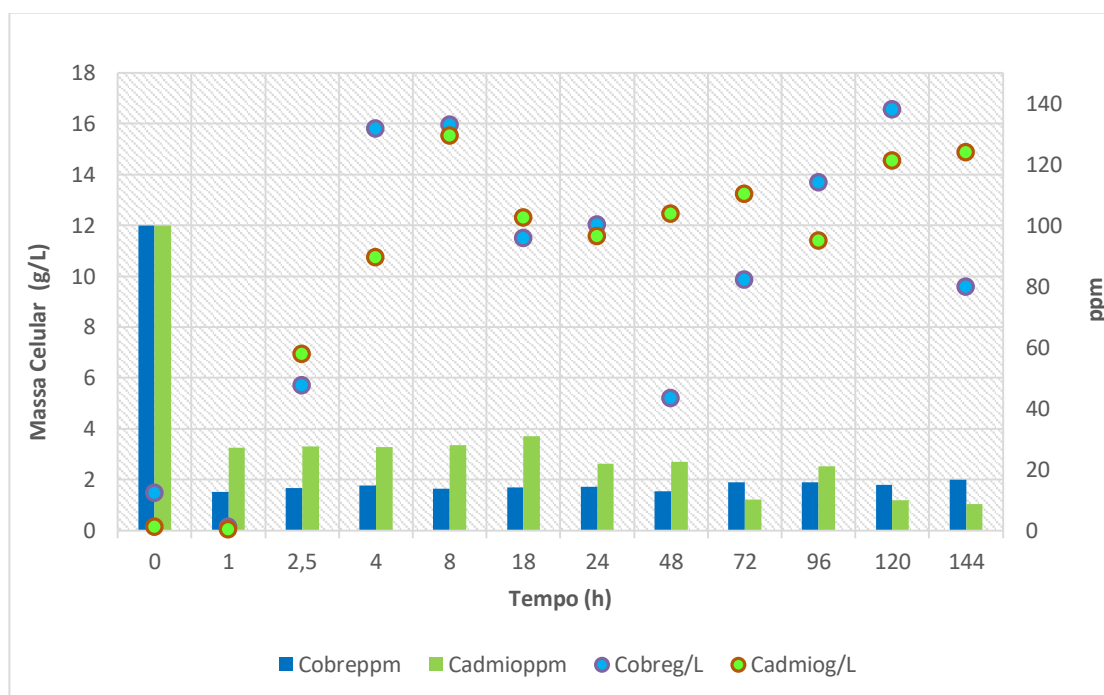
Em nosso estudo, extrapolando o volume de meio para um valor semelhante ao que autores utilizaram no trabalho de 2017, nosso valor de Q_{max} é 2 vezes menor. Isso pode estar relacionado a nossa cepa estar ativa e parte do metal ser quelado pelo biossurfactante produzido pela bactéria durante o período de cultivo, como reportado por Huang e Liu (2013). Estes autores estudaram a potencialidade da bactéria produtora de biossurfactante *Pseudomonas sp.* LKS06 para remover íons Cd (II) e Pb (II) de uma solução aquosa. Eles concluíram que a biomassa do microrganismos é um bioadsorvente alternativo para remover íons Cd (II) e Pb (II) de águas residuais industriais. Além disso, e que biossurfactante produzido pela *Pseudomonas* pode quelar os metais.

De acordo com Al-Gheeti *et al.*, (2017), a alta eficiência de remoção de células bacterianas tolerantes é explicada como resultado de mutação causada pela exposição a altas concentrações de metais pesados, Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺, que são de natureza mutagênica.

7.2.2 Análise da bioacumulação de cobre e cádmio.

A análise do cobre e cádmio utilizado pelo microrganismo *Bacillus subtilis* em água e o comportamento do microrganismo com relação ao seu crescimento podem ser observados através da Figura 8.

Figura 8. Análise de crescimento do *Bacillus subtilis* e o consumo de Cobre e Cádmio em meios líquidos constituídos por meio de cultura diluído (TSB₃₃) e água.



* As análises de massa (g/L) da bactéria foram realizados em triplicata, produzindo um erro experimental de $p < 0.05$. Fonte: Elaboração própria

O ensaio em água contendo 100 ppm de cobre, representado pelas barras em azul, na Figura 8, apresentou massa celular do microrganismo com a concentração inicial de 1,46g/L e na primeira hora de cultivo o valor do cobre foi reduzido 8 vezes, passando de 100 ppm para 13 ppm, permanecendo até o período de 8 horas. Apresentando uma capacidade de bioacumulação do metal Q_{max} de 32,78mg/g na 1 hora e de 0,24mg/g em 8h. Após o período de 8 horas houve uma redução da massa celular até o período de 48 horas, em seguida

houve novo aumento de massa celular, que permaneceu até o período de 120 horas. O concentração de cobre variou entre 12,5 ppm e 16,5 ppm durante todo o processo, apresentando melhor resultado de remoção do cobre na primeira hora, com 87,4% de eficiência de remoção. O Q_{max} variou entre 0,24 e 0,39 mg/g para todos os tempos avaliados.

Dhanwal *et al.*, (2018), conseguiu eficiência de bioissorção de Cu_4 de 87,16% em meio de cultura com 50 ppm. Já Pérez *et al.*, (2020), descreve que a dinâmica de remoção de íons por biomassa bacteriana ocorre rapidamente nos primeiros tempos de contato biomassa-metal.

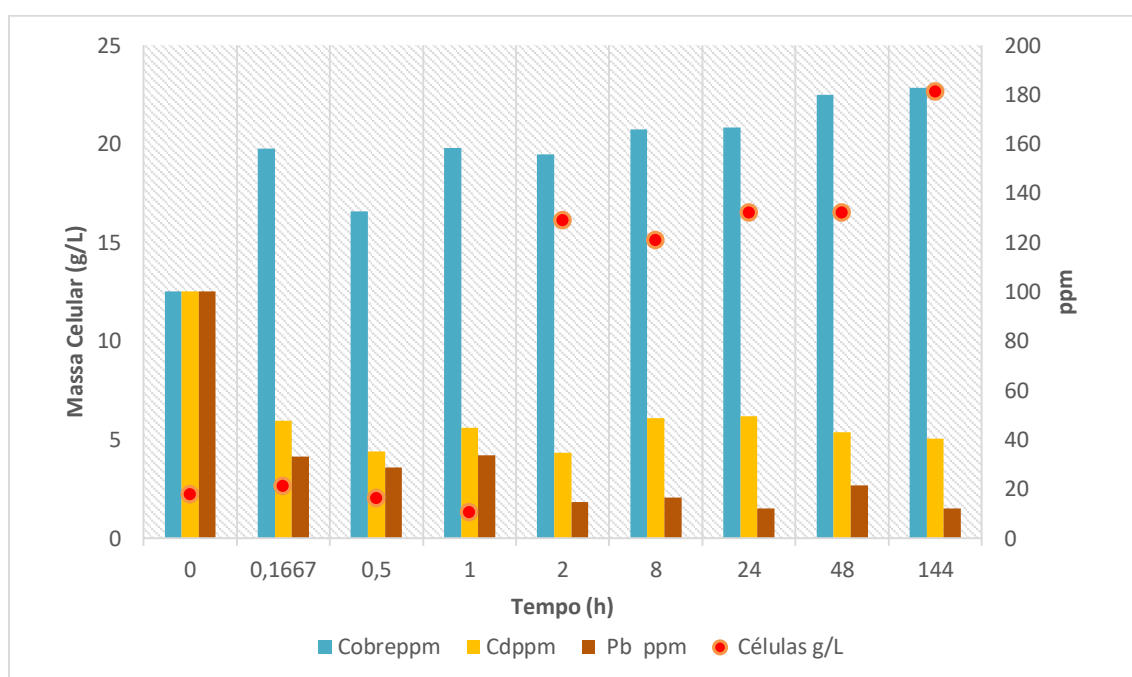
O ensaio em água contendo 100 ppm de cádmio representado pelas barras verdes, na figura 5, apresentou massa celular do microrganismo com a concentração de 0,12 g/L na primeira hora de cultivo, o valor do cádmio foi reduzido quase 4 vezes, passando de 100 ppm para 27 ppm e apresentando um Q_{max} de 110mg/g. O valor de 27 ppm permaneceu assim no período de 2,5 horas. Nos períodos entre 4 horas e 144 horas a concentração da massa celular variou entre 11 g/L e 15,5 g/L. O período de 8 horas teve o maior aumento de massa celular chegando a 15,5 g/L, e redução da concentração do cádmio em 3,6 vezes, passando de 100 ppm para 28 ppm. No período de 72 horas a redução da concentração de cádmio foi de 10 vezes, passando de 100 ppm para 10 ppm. Já no período de 96 horas houve redução da massa celular para 11,4 g/L com aumento da concentração do cádmio para 21 ppm. Os melhores resultados de eficiência de remoção de cádmio, foram obtidos na primeira hora de cultivo com 73,7%. O Q_{max} variou entre 0,28 e 0,30 mg/g, entre 8 a 144 horas.

O estudo de Syeda e Chinthala (2015), pode mostrar a ligação de íons metálicos nas paredes celulares das células bacterianas, indicando claramente que os íons de Cd (II), Cu (II) e Pb (II) foram adsorvidos na superfície de *Bacillus subtilis* após bioissorção. Em nosso estudo, existe evidências de que uma parte do metal foi utilizada como metabólito e outra parte foi adsorvida, pois os ensaios foram realizadas em água, não havendo a possibilidade de desenvolvimento do microrganismo sem uma fonte nutricional.

7.2.3 Análise da bioacumulação dos metais chumbo, cobre e cádmio no mesmo sistema

Pensando em um sistema onde os metais estariam juntos, foi realizada a análise da remoção de 100 ppm de chumbo, cobre e cádmio, em água pelo microrganismo *Bacillus subtilis* em água e o comportamento do microrganismo com relação ao seu crescimento podem ser observados através da Figura 9.

Figura 9. Análise de crescimento do *Bacillus subtilis* e remoção do Chumbo, Cobre e Cádmio em água.



* As análises de massa (g/L) da bactéria foram realizados em triplicata, produzindo um erro experimental de $p < 0.05$. Fonte: Elaboração própria

Podemos observar que o *Bacillus subtilis* representado pela linha laranja, apresentou o início da fase exponencial após 1 hora de contato com os metais. Entretanto, o cádmio – barras amarelas e o chumbo – barras marrom, foram reduzidos em aproximadamente 50% nos primeiros 10 minutos, indicando que houve adsorção dos metais. O chumbo ainda teve uma redução da concentração maior no período de 2 horas passado de 100 ppm para 13 ppm. Nesse ensaio,

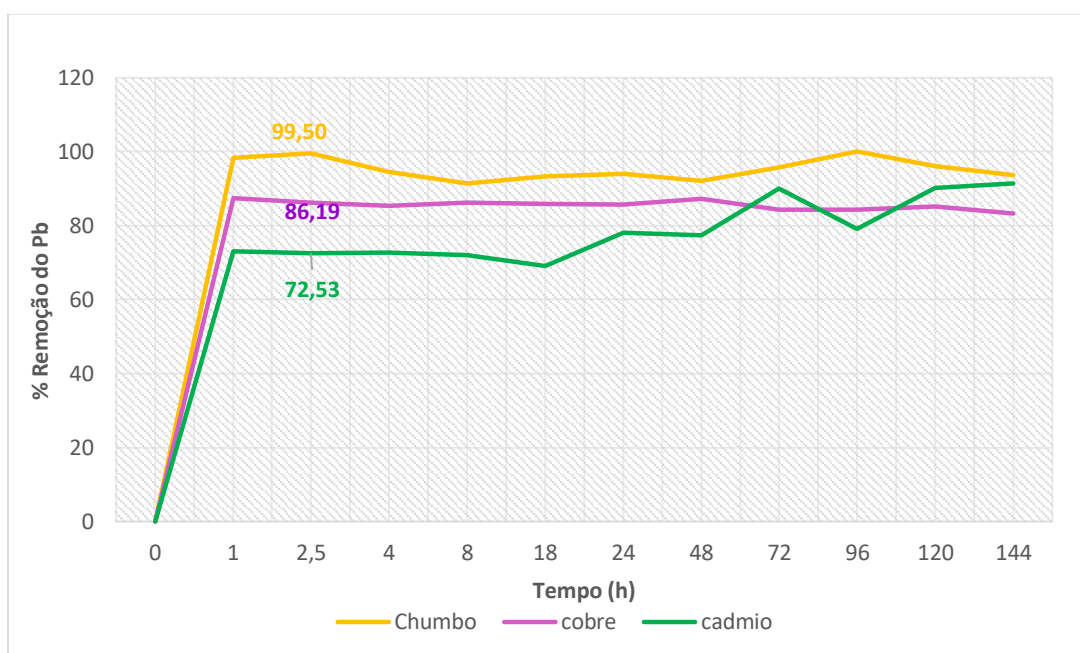
através do ICP-MS não foi possível identificar o que ocorreu com o cobre, pois houve aumento da concentração do metal, isso pode ter acontecido por sobreposição do cobre no momento das análises.

Pode observar através dos resultados que a remoção de chumbo foi semelhante tanto nas amostras individuais, quanto com outros metais no mesmo sistema, isso pode indicar que o microrganismo tem uma preferência pelo chumbo. Já o cádmio teve uma menor redução da concentração em contato com outros metais, e que segundo Zhao *et al.*, (2020), isso pode ocorrer por interferentes formados entre os metais, e que a presença de íons de ferro e cádmio afeta a eficiência de remoção/bioacumulação de chumbo, por exemplo. No caso desse estudo ocorreu o inverso, pode ser que o chumbo ou o cobre tenham interferido na bioabsorção do cádmio.

7.3 Eficiência de remoção dos metais

Podemos observar na Figura 10 que a eficiência de remoção dos metais acontece nas primeiras horas. A eficiência de remoção do chumbo foi de 99,5% no período de 2,5 horas de processo, enquanto para o cobre 89% e cádmio 72,5%, no mesmo período de tempo.

Figura 10. Eficiência de remoção dos metais.



Fonte: Elaboração própria

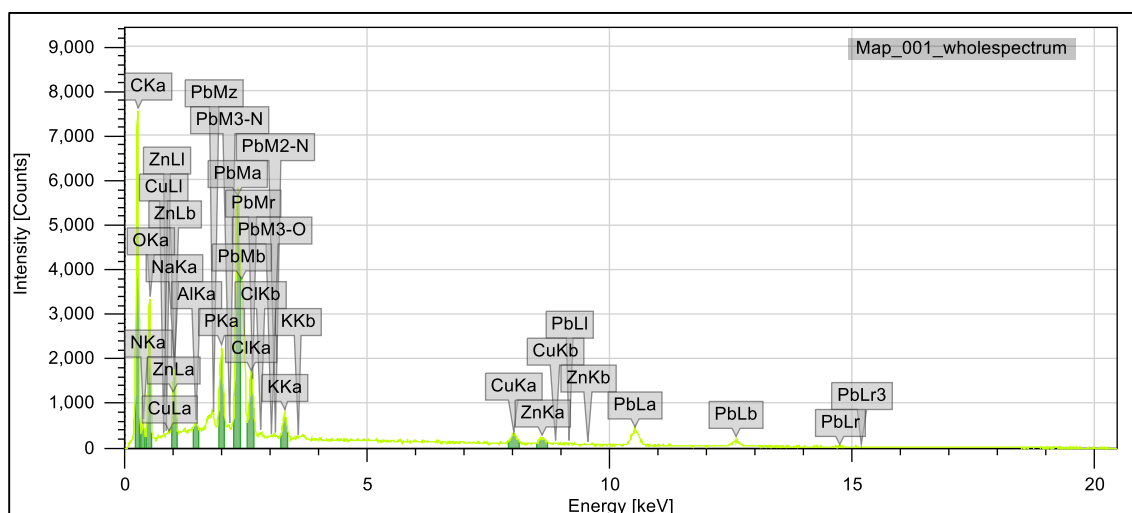
Ravindran *et al.*, (2020) mostraram que cepas de *Bacillus* produtoras de surfactantes mostram alta afinidade contra metais pesados como Pb, Cd, Hg, e Mn. Eles observaram que apenas o surfactante extraído desses microrganismos podem precipitar os metais, formando um complexo surfactante-metal.

Em nosso trabalho essa alta eficiência de remoção, pode estar ligada a bioacumulação e a formação de um complexo surfactante-metal, visto que o *Bacillus subtilis* é produtor de biosurfactante.

7.4 Microscopia eletrônica das amostras e EDS

Foram realizadas as análises de micrografia para o chumbo em água e em TSB₃₃. Podemos observar claramente que houve crescimento do microrganismo em água. Pois a amostra indica ainda a presença de chumbo e outros metabólitos. Não foi notada uma mudança na morfologia da superfície celular das células bacterianas. Além disso, a presença de adsorvidos e produtos de degradação metálicos na massa celular bacteriana foi confirmada com a ajuda da análise EDS. Os resultados das análises qualitativas podem ser observados na Figura 11.

Figura 11. Microanálise qualitativa (espectro) de elementos químicos presentes na amostra chumbo.

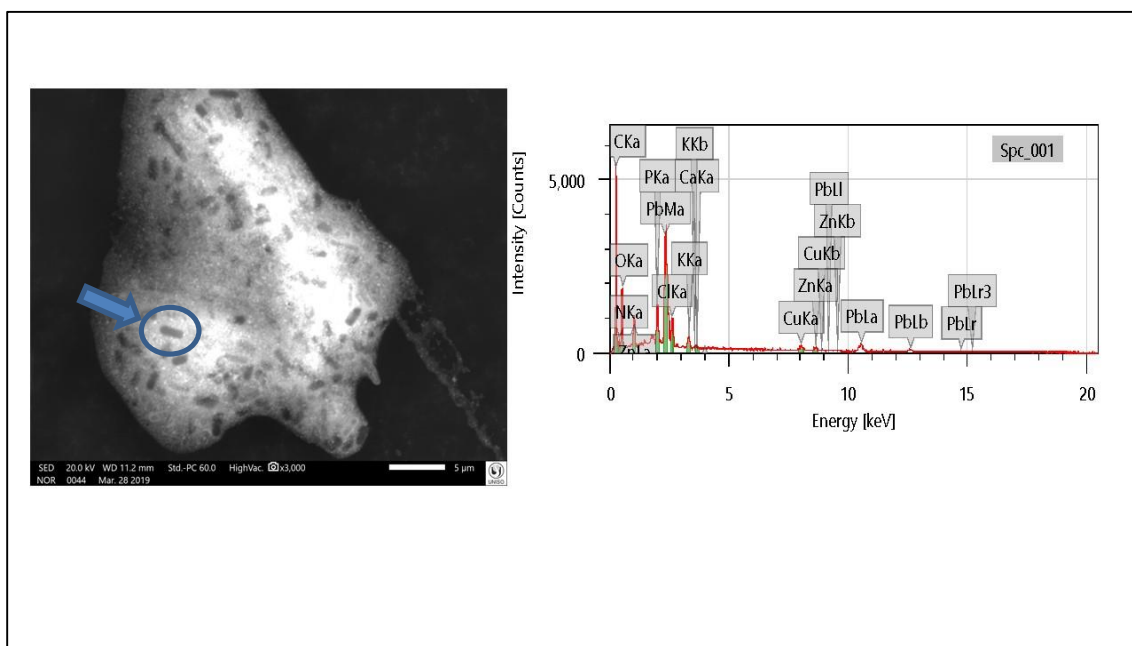


Fonte: Elaboração própria

Através do EDS foi possível verificar a presença de chumbo e metabólitos na massa celular e, que houve adsorção do metal chumbo pelo *Bacillus subtilis*.

A Figura 12 apresenta a imagem do *Bacillus subtilis* indicado pela seta e o espectro correspondente

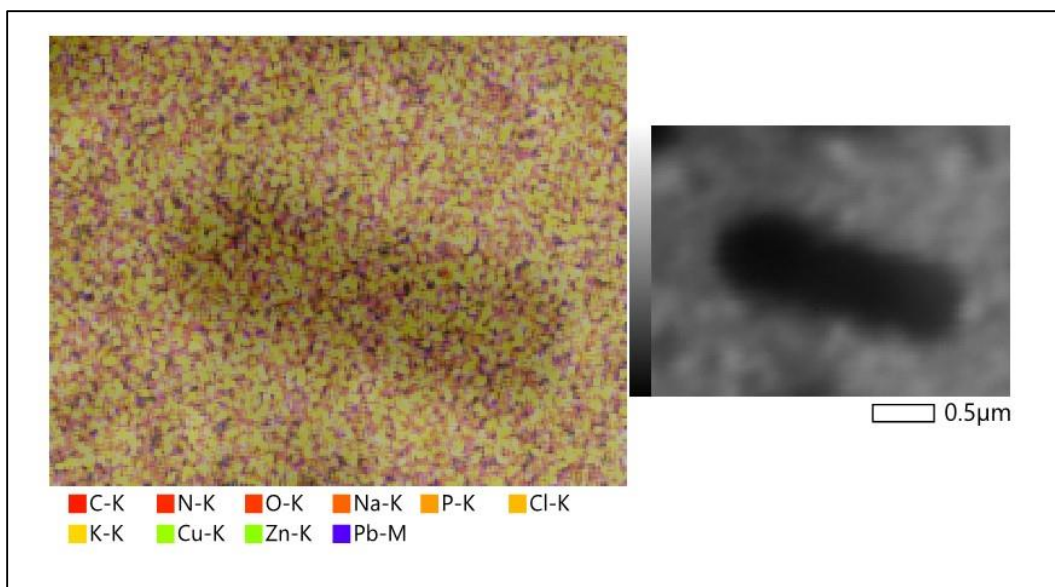
Figura 12. MEV do *Bacillus subtilis* na amostra de chumbo em água e espectro de EDS para a área analisada.



Fonte: Elaboração própria

A Figura 13 representa a identificação, a disposição dos elementos químicos presentes na amostra e a estrutura preservada do microrganismo.

Figura 13. Distribuição dos elementos e imagem do *Bacillus subtilis*.

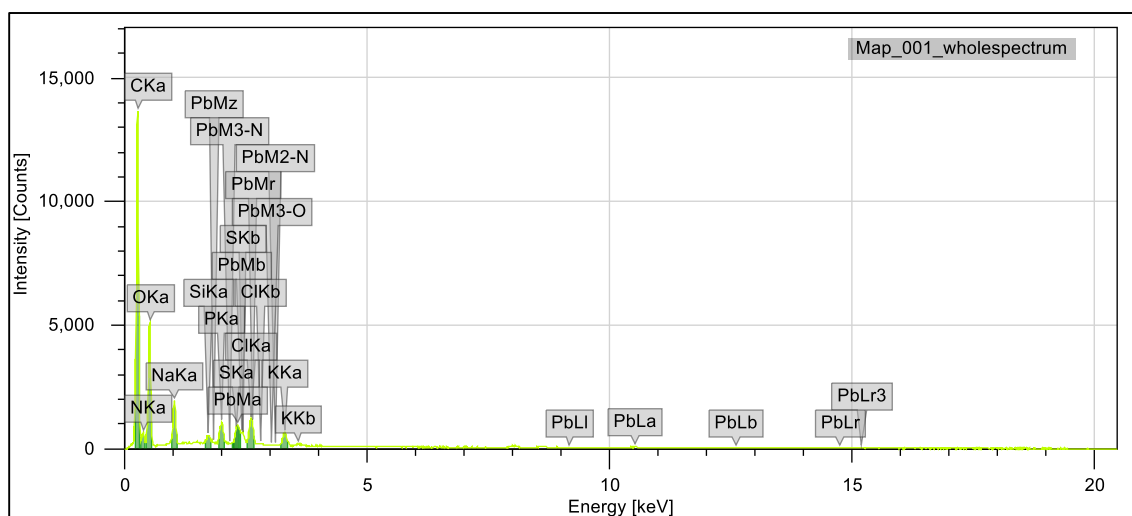


Fonte: Elaboração própria

Na Figura 13 foi possível observar a distribuição dos elementos presentes na amostra, e o chumbo aparece em azul com maior concentração sendo possível observar os pontos dentro do *Bacillus subtilis* na imagem do lado direito.

Para o TSB₃₃ não foi possível observar o microrganismo, entretanto, foi observado que havia a presença de adsorvidos na massa analisada e confirmada com a ajuda da análise EDS. Os resultados podem ser observados na Figura 14.

Figura 14. Microanálise qualitativa (espectro) de elementos químicos presentes na amostra (TSB₃₃).



Fonte: Elaboração própria

Pode-se verificar que na presença de TSB a concentração de chumbo foi maior do que em água, a intensidade foi o dobro, indicando que tem mais chumbo adsorvido e que o microrganismo não utilizou o metal como rota metabólica. Visto que o TSB contém todos os nutrientes necessários para manutenção desse crescimento.

Esses dados indicam claramente a bioacumulação do chumbo pelo microrganismo, pois o EDS revela a presença do metal no espaço intracelular. Alguns autores explicam que a bioacumulação microbiana ocorre usando complexos importadores que criam uma via de translocação através da bicamada lipídica da membrana celular. Uma vez dentro do espaço intracelular, os metais pesados podem ser sequestrados por proteínas e ligantes peptídicos, criando uma espécie de armazenamento (DIEP; MAHADEVAN; YAKUNIN, 2020; MALIK, 2004; DHANWAL, 2018).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a biomassa formada pelo *Bacillus subtilis* foi eficiente em bioacumular metais pesados de soluções aquosas. O microrganismo foi capaz de crescer na ausência de meio de cultura e na presença dos metais. O chumbo foi o metal que mais foi bioacumulado, apresentando uma eficiência de remoção de 99,5% em água e para os outros metais foi entre 77 a 87%.

A técnica utilizando o *Bacillus subtilis* pode ser empregada como um tratamento econômico para a biorremediação de efluentes industriais e áreas contaminadas com metais pesados. No entanto, ainda se faz necessário um entendimento maior da etapa de otimização da implementação em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL, M. A. H. Biosorption of nickel by *Pseudomonas cepacia* 120S and *Bacillus subtilis* 117S, **Water Sci. Technol**, v.61, p. 2994-3007, 2010.

Al-GHEETHI, A. *et al.* Removal of Heavy Metal Ions From Aqueous Solutions Using *Bacillus subtilis* Biomass Pre-Treated by Supercritical Carbon Dioxide. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 45(10), p. 1-22, 2017.

AMARAL, J. E; KREBS. A. S. Drenagem ácida da mineração de carvão e sua inter-relação com metais pesados e recarga de aquíferos na bacia carbonífera do estado de Santa Catarina. In: XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços. **Anais**. Santa Catarina, 2010, p. 1-8.

ANGELIS, C. D. *et al.* The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. **Reproductive Toxicology**, v.73, p.105-127, 2017.

ARAUJO, J. B. S; FILHO, J. L. O. P. Identificação de fontes poluidoras de metais pesados nos solos da bacia hidrográfica do rio Apodi- Mossoró/RN, na área urbana de Mossoró-RN. **Rev. verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v.5, n.2, p. 80 – 94, 2010.

ATAIDE, J. A. *et al.* Effect of Polysaccharide Sources on the Physicochemical Properties of Bromelain-Chitosan Nanoparticles. **Polymers JCR**, v. 11, p. 1681, 2019.

AVILA, D. C. R. J. *et al.* Análise do crescimento de microrganismos em drenagem ácida de mina com ajuste de pH. **Revista Cippus – UNILASALLE**, v. 2 n. 2, p. 179-190, 2013.

BELO, A; QUINAIA, S. P; PLETSCHE, A.L. Avaliação da contaminação de metais em sedimentos superficiais das praias do lago de Itaipu. **Quim. Nova**, Vol. 33, N. 3, 613-617, 2010.

BRASIL, Lei Nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: https://www.mma.gov.br/estruturas/sqapnla/_arquivos/46_10112008050406.pdf. Acesso em: 22 abril. 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria Nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acesso em 16 de Setembro de 2020.

CAPITANI, E. Metabolismo e toxicidade do chumbo na criança e no adulto. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42, n. 3, p. 278-286, 30 set. 2009.

CARVALHO, J. C. B; ORSINE, J. V. C. Contaminação do meio ambiente por fontes diversas e os agravos à saúde da população. **Rev. Enciclopédia Biosfera**, vol.7, n.13; p. 1107-1118, 2011.

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução CONAMA Nº 430 de 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 10 de Agosto de 2020.

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução CONAMA Nº 396 de 03 de Abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Disponível em: <http://portalpnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20396.pdf>. Acesso em: 11 de Agosto de 2020.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA Nº 420 de 28 de Dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acesso em: 22 Abril. 2020.

CONSALTER, B. G. *et al.* Avaliação da contaminação por cobre e chumbo do lago Aratimbó - UMUARAMA – PR. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 23, n. 1, p. 29-34, 2019.

COUTINHO, Fabiana de Lima. Avaliação de biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade para chumbo em indivíduos expostos a resíduos industriais no Condomínio Volta Grande IV, município de Volta Redonda, RJ. 2017. 168 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

DHANWAL, P. *et al.* Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solution by Bacteria Isolated from Contaminated Soil. **WATER ENVIRONMENT RESEARCH**, p. 424-430, May 2018.

DIANA, C. S. Electrorremediação de solos contaminados por metais pesados, 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Área de especialização em Controle de Qualidade e Ambiente, Universidade de Coimbra, Coimbra.

DIEP, P.; MAHADEVAN, R.; YAKUNIN, A. F. Heavy Metal Removal by Bioaccumulation Using Genetically Engineered Microorganisms. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 01-157, 2018.

FIGUEIREDO, A. *et al.* Feasibility of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of metal impurities in pharmaceutical products and dietary supplements in view of regulatory guidelines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 122, p.52–58, 2016.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

FRANCISCO, W. C., QUEIROZ, T. M. Biorremediação. **Nucleus – Revista Científica da Fundação Educacional de Ituverava**, v.15, n.1, p. 249-256, 2018.

FRANCO, L. F. L; MUNOZ, P. T. L; GARCIA, F. G. M. Risco de metais pesados na saúde humana e animal. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 14, n. 2, p. 145-153, 2016.

FREITAS, D. A. *et al.* Efeito dos metais pesados cobre e cromo no solo: germinação e desenvolvimento inicial de *Myracrodruon urundeuva*. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, Curitiba, v. 3, n. 1, p.162-171, 2020.

GONÇALVES Jr., A. C. *et al.* Heavy Metal Contamination in Brazilian Agricultural Soils due to Application of Fertilizers. In: HERNANDEZ-SORIANO, M. C. (Ed.). **Environmental Risk Assessment of Soil Contamination**. Ed. Intech Open, 2014. p. 105-135, 2014.

GOUVEIA, Nelson. Resíduos sólidos urbanos: impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, n. 6, 2012.

HUANG, W.; LIU, Z. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 113-119, 2013.

JACQUES *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

OLIVEIRA *et al.* Níveis de contaminação por metais pesados na área de disposição de resíduos sólidos no município de Januária-MG. **Rev. Gest. Sust. Ambiental. Florianópolis**, v. 8, n. 1, p.629-640, 2019.

KARRI, V. *et al.* An in vitro cytotoxic approach to assess the toxicity of heavy metals and their binary mixtures on hippocampal HT-22 cell line. **Toxicology Letters**, v.282, p. 25–36, 2018.

LEEDJÄRV, A.; IVASK, A.; VIRTÄ, M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of bacteriology*, v. 190, n. 8, p. 2680-2689, 2008.

LEONEL, L. V. *et al.* Biorremediação do solo. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 26, n. 51, p. 37-52, 2018.

LI, J. H.*et al.* Remediation of 1, 2, 3-trichlorobenzene contaminated soil using a combined thermal desorption – molten salt oxidation reactor system. **Chemosphere**, v. 97, p. 125–129, 2014.

LIN, X. *et al.* Combined toxicity of heavy metal mixtures in liver cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36(9), p.1163–1172, 2016.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environ. Int.**, v. 30, p. 261-278, 2004.

MARX. S. K., KAMBER, B. S. Trace-element systematics of sediments in the Murray–Darling Basin, Australia: Sediment provenance and palaeoclimate implications of fine scale chemical heterogeneity, **Appl Geochem**, v. 25, p. 1221 – 1237, 2014.

MELO, G.M.P.; MELO, V.P.; MELO, W.J. Metais pesados no ambiente decorrente da aplicação de lodo de esgoto em solo agrícola. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Processos**. Brasília: MMA, CONAMA, 2004. 98p. Disponível em:

< <http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/CB5F6214/LODOMETAL.pdf> >. Acesso em: 11 mar. 2018.

Ministério do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA Nº 420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. [Internet]. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167-181, 2004.

MUSTAPHA, M. U.; HALIMOON, N. Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 33-37, 2015.

NAN, V. U. *et al.* Cadmium chloride-induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.94, p. 109- 123, 2017.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOVAES, G. H. C. F. *et al.* Toxicidade dos metais níquel e cobre e sua possível atuação como interferentes endócrinos em ambientes aquáticos. **RBCIAMB**, n.48, 128-141, 2018.

NUNES, V. J; JESUS, T. B. Determinação de metais pesados (Mn, Cd, Cr, Cu, Pb) em peixes das espécies *Astyanax bimaculatus*, *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus* presente na Lagoa Salgada – Rio Subaé – Feira de Santana (Bahia). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 002-013, 2019.

OLIVEIRA, F. H. P. C. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos, 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) – Área de especialização em Biotecnologia de produtos bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

PAZ-FERREIRO, J.; LU, H.; FU1, S.; MÉNDEZ, A.; GASCÓ, G. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review. **Solid Earth**, v.5, p.65-75, 2014.

PEDRON, T. *et al.* Essential and non-essential elements in Brazilian infant food and other rice-based products frequently consumed by children and celiac population. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.49, p.78-86, 2016.

PEREIRA, A. R. B; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975 – 1006, 2012.

PEREIRA, A. R. B; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismos para a Biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

- PÉREZ, L. *et al.* Zinc and cadmium removal by bacteria: Study of factors associated to the process- Remoción bacteriana de cinc y cadmio: estudio de factores asociados al proceso. **Tecnología y ciencias del agua**, v. 11(3), p.309-341, 2020.
- PERUZZO, R. *et al.* Comparação do uso de Vermicomposto e Composto como Agente de Degradação de Biodiesel B100. **Revista CIATEC – UPF**, vol.10 (2), p. 14-26, 2018.
- POLES Jr, A. A. *et al.* Study of the elemental composition of saliva of smokers and nonsmokers by X-ray fluorescence. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 118, p. 221-227, 2016.
- RAMACHANDRA, B. Development of Impurity Profiling Methods Using Modern Analytical Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry / CRC**, p.1–13, July 2016.
- RAVINDRAN, A. *et al.* Revealing the Efficacy of Thermostable Biosurfactant in Heavy Metal Biorremediation and Surface Treatment in Vegetables. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 01-11, 2020.
- ROCHA, T. M. Determinação das concentrações dos metais cádmio, chumbo e mercúrio na área do lixão desativado de Buriticupu, MA. Tese (Mestrado em Ciências) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2016.
- SAGARKAR, S. *et al.* Soil mesocosm studies on atrazine bioremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 139, p. 208-216, 2014.
- SANTOS, I. C. A; MONTEIRO, L. P. C; MAINIER, F. B. Tratamento de efluentes aquosos temas livres contendo Cádmio, Chumbo e Cobre, a partir da técnica de eletrodeposição. **Rev. Augustus**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 40, p. 143-154, 2015.
- SANTOS, M. G. *et al.* Utilização de medicamentos homeopáticos para remediação de solos contaminados por metais tóxicos. **J. of Agronomic Sciences**, Umuarama, v.5, p.26-45, 2016. Número especial.
- SÃO PAULO, Lei nº 13.577/2009, de 8 de Julho de 2009. Dispõe sobre diretrizes e procedimentos para a proteção da qualidade do solo e gerenciamento de áreas contaminadas, e dá outras providências correlatas. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/>. Acesso em 10 de Agosto de 2020.
- SILVA, C. G. M. *et al.* Caracterização físico- química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW.) DC). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 27, n. 4, p. 733-736, 2007.
- SILVA, C. L; FUGII, G. M.; MARINI, M. J. Gestão da Cadeia de Reciclagem em Rede: um estudo do projeto eco cidadão no município de Curitiba. **Desenvolvimento Regional em Debate**. v. 5, n. 1, p. 20-37, 2015.
- SILVA, L. A. *et al.* Cobre: Produção industrial e aplicações. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1154-1161, 2020.
- SILVA, M. B; RONDON, J. N. Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 10, n. 10, p. 2175-2184, 2013.

SILVEIRA, L. R. *et al.* Biorremediação: Considerações gerais e características do processo. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 13, n. 2, p. 32-47, 2016.

SINGH, P; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 319, p. 291-297, 2004.

SOUZA, V. L. B. *et al.* Biodisponibilidade de metais-traço em sedimentos. Centro Regional de Ciências Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear. **Brazilian journal of radiation sciences**, v. 3; n.1A, p. 01-13, 2015.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, n. 56, v.4, p. 845–857, 2005.

SYED, S.; CHINTHALA, P. Heavy Metal Detoxification by Different Bacillus Species Isolated from Solar Salterns. **Scientifica**, p.01-08, 2015.

TOMASSONI, F. *et al.* Técnica de biorremediação do solo. **Acta Iguazu, Cascavel**, v.3, n.3, p. 46-56, 2014.

TORRES, Joana Ferreira da Silva Roma. Exposição profissional ao Chumbo. Análise da indução de efeitos genotóxicos, Lisboa, Portugal, 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública na especialidade de Saúde Ambiental e Ocupacional) - Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 2011.

VENEGAS, A.; RIGOL, A.; VIDAL, M. Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation of heavy metal-contaminated soils. **Chemosphere**, v.119, p.190-198, 2015.

XU, X.G. *et al.* Recovery of gold from electronic wastewater by *Phomopsis* sp. XP-8 and its potential application in the degradation of toxic dyes. **Bioresour Technol**, v. 288, p.8, 2019.

ZHAO, P. *et al.* Capability of *Bacillus subtilis* to remove Pb 2+ via producing lipopeptides. **Science of the total environment**, v. 730, p. 01-11, 2020.

ZHAO, X. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles and its contribution to the capability of *Bacillus subtilis* to deal with polluted waters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p.6319–6332, 2019.

ZORTÉA, T. *et al.* Toxicidade do cobre em função da correção do pH em dois solos naturais – Uma abordagem com plantas e organismos edáficos. **Revista Científica Agrária**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2016.