Biorremediação do Cobre por biossorção da bactéria *Pseudomonas putida* BHUJY14

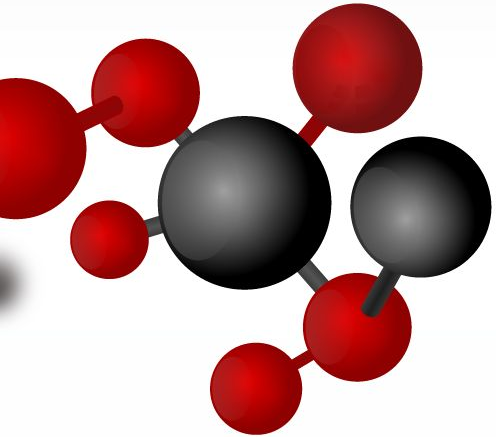
Caio Sadao W. Tamezava nºUSP: 10311750
Lígia Suniga Santos nºUSP 11797765
Gabriela Neves Gonçalves nºUSP 11797790
Rafael Neres Magalhães, n° USP 11857480

01
INTRODUÇÃO
Apresentação dos metais pesados e da biossorção

02
MÉTODOS
Cultivos em reator

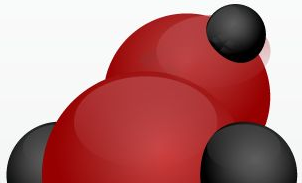
03
ORGANISMOS E REAÇÕES

04
RESULTADOS E DISCUSSÕES



01

Metais pesados e biossorção



Metais Pesados

Na,K,Cu,Ba,Ca,Fe,Zn,Ni

Elevada massa específica

Formação de compostos em meio aquoso

Bioacumulativos

Tóxicos em altas concentrações

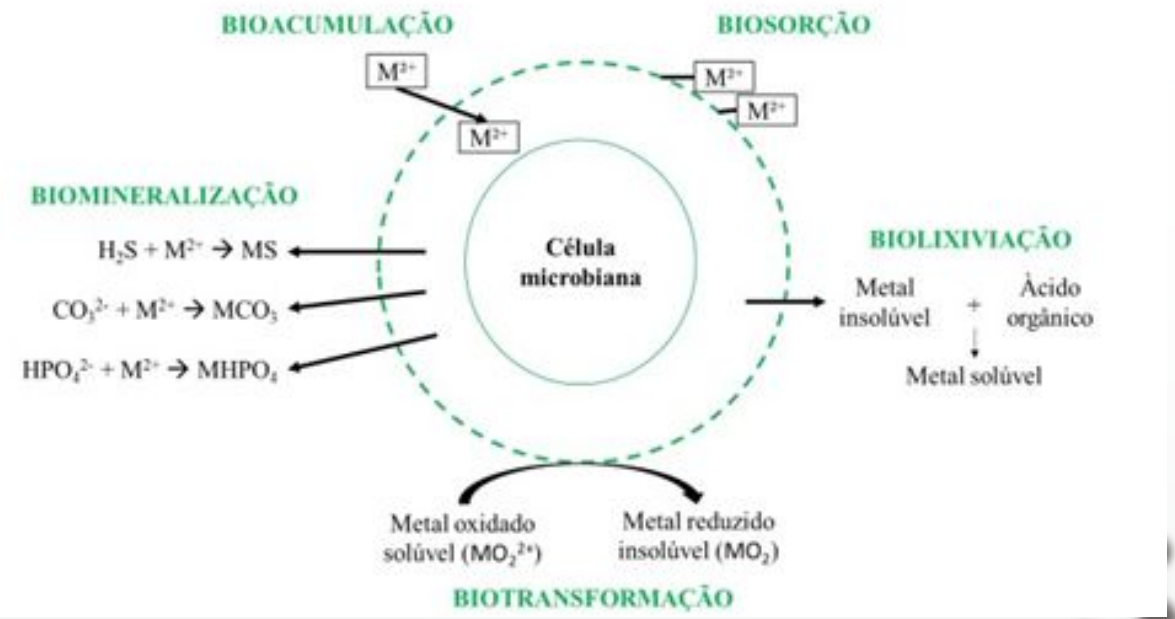
Presentes em produtos do cotidiano

Cobre

- Alta condutibilidade e resistência
- Importância biológica e econômica
- Pode causar morte quando em altas concentrações
- Atividades industriais, agrícolas e de mineração
- Concentração em efluentes: 1 mg/L (CONAMA,2008)

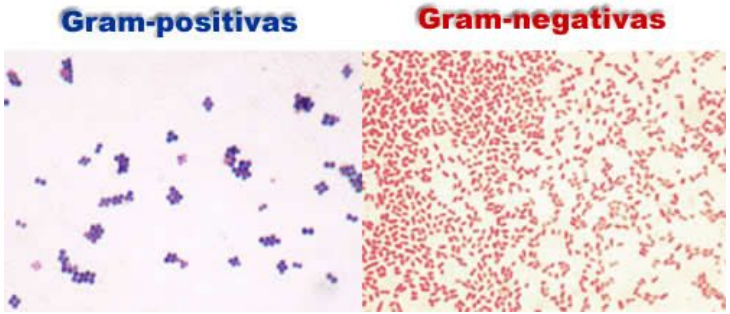
Biosorção

- Adsorção e absorção
- Ligação de metais pesados a materiais biológicos



BACTÉRIAS

A coloração de Gram é um método que permite que as bactérias sejam visualizadas no microscópio óptico, uma vez que sem a coloração é impossível observá-las ou identificar sua estrutura.

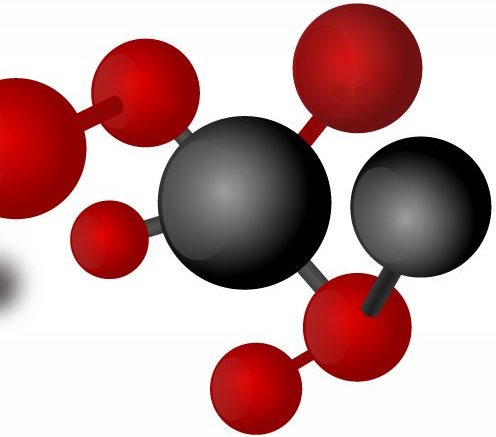


GRAM - POSITIVAS

As bactérias Gram-positivas retém o cristal violeta devido à presença de uma espessa camada de peptidoglicano em suas paredes celulares

GRAM - NEGATIVAS

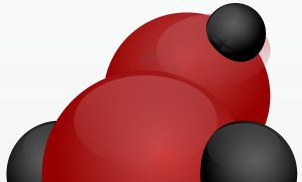
Já as bactérias Gram-negativas possuem uma **parede de peptidoglicano mais fina** que não retém o cristal violeta e recebem a cor vermelha no processo de coloração final.



02

MÉTODOS

ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DE COBRE



PROCESSOS ATÉ A APLICAÇÃO

1. BUSCA DOS ORGANISMOS BIORREMEDIADORES
2. SELEÇÃO E CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO
3. GERAÇÃO DE UM PRODUTO BIOTECNOLÓGICO
4. LIBERAÇÃO DO PRODUTO PELO ÓRGÃO AMBIENTAL
5. APLICAÇÃO - BIOESTIMULAÇÃO OU BIOAUMENTAÇÃO

ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DE COBRE POR *Pseudomonas putida* sp. EM REATOR - BRUNO OLIVA OISHI

2

SELEÇÃO E CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO

1

ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

2

MEIOS DE CULTIVO

3

CULTIVOS EM REATOR

4

SISTEMA DE FILTRAÇÃO

5

CENTRIFUGAÇÃO

ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Mina de Sossego (Canaã de Carajás, PA)

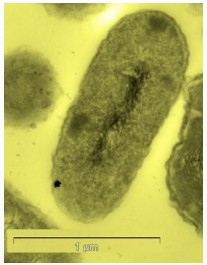
Foram isoladas duas bactérias de amostras de solo e águas da área da Mina de Sossego capazes de crescer em meio sintético adicionado.

Pseudomonas putida

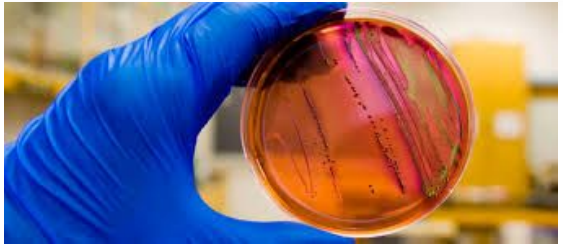
BHUJY14

Cupriavidus metallidurans

BMPEZ



MEIOS DE CULTIVO



1. **Meio sintético Ramsay 2006-1**

2. **Meio Mineral MM-HCD**

   $(NH_4)_2SO_4$; $3Na_2HPO_4$; KH_2PO_4; $MgSO_4.7H_2O$; $CaCl_2.2H_2O$; citrato de ferro amoniacal; extrato de levedura solução traços. adaptado para os cultivos de alta densidade celular em reator

3. **Meio sintético Ramsay 2006-2**

   Na_2HPO_4; KH_2PO_4; $MgSO_4.7H_2O$ de solução traços

4. **Meio sintético M9**

5. **Meio sintético M63**

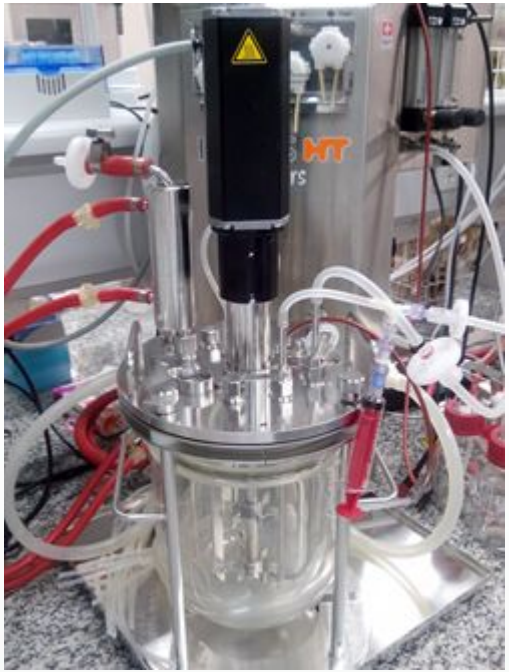
6. **Meio Mineral MM:**

   $(NH_4)_2SO_4$; Na_2HPO_4;KH_2PO_4; $MgSO_4.7H_2O$; $CaCl_2.2H_2O$; citrato de ferro amoniacal; extrato de levedura e solução traços

CULTIVOS EM REATOR

O reator

No reator da Infors existem chicanas internas, duas turbinas modelo Rushton e aspersor em formato de ”L”. **Além do controlador de pH e pO_2, o qual permite a mistura de gases de ar, oxigênio e nitrogênio.**



Reator modelo Labfors 5 utilizado nos cultivos

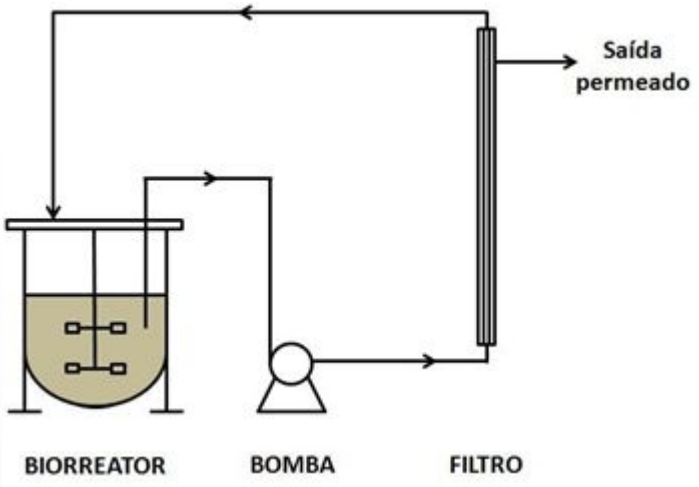
Preparo do inóculo

Para cada cultivo, **o inóculo foi realizado** com um tubo do tipo Eppendorf **contendo o estoque da bactéria.**
Foi inoculado Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL **de meio caldo nutriente** sob agitação de 180 RPM a 30 °C em estufa rotativa

O cultivo

. Após **18 horas de cultivo**, o caldo cultivado foi inoculado e centrifugado. **As células foram ressuspendidas em solução salina e inoculadas no reator.**

SISTEMA EXTERNO DE FILTRAÇÃO TANGENCIAL ACOPLADO AO REATOR



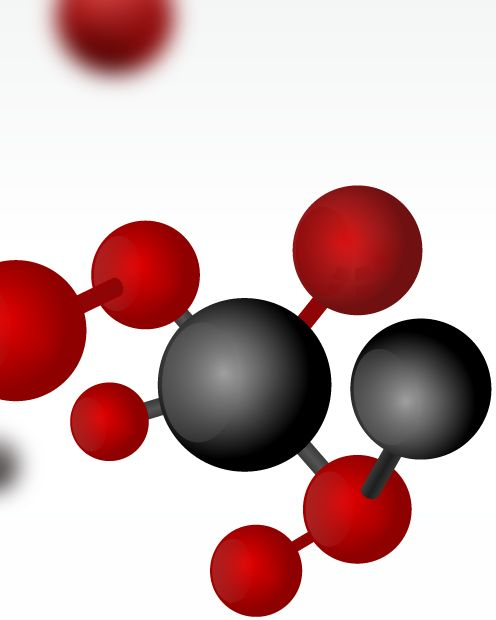
Sistema externo de filtração de fibra oca acoplado ao reator

Através do **sistema de filtração** ilustrado na figura realizaram-se cultivos microbianos seguidos de **etapa para concentração das células**, por meio de **recirculação da suspensão celular** obtida ao final do cultivo.

CENTRIFUGAÇÃO

Um volume de 10 ml das **amostras contendo células na concentração de 0,90 g/L para *Cupriavidus metallidurans* e de 0,75 g/L para *Pseudomonas putida*, e de solução de cobre,** foi transferida para tubos do tipo Falcon e **incubados sob agitação constante a 180 RPM, 30 °C.**

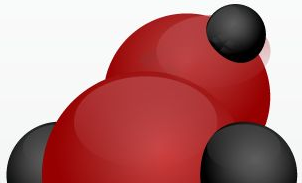
As amostras foram **centrifugadas** por 20 min.s a 10. 000 g e o sobrenadante foi congelado **para posterior determinação da concentração de cobre** através do ICP-AES (Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente)



03

Organismos e Reações

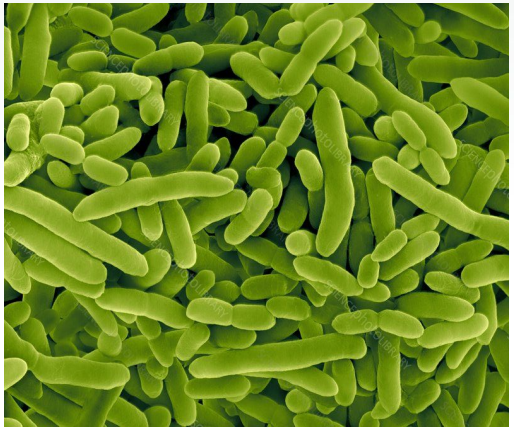
ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DE COBRE



- **Esta remoção pode ser realizada por diferentes microrganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Cândida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* entre outros (Quadro 1).**

Bactéria	Cu^{+2} Sorvido (mg/g de biomassa seca)	Referência
Bacillus subtilis	11,00	Mayers; Beveridge (1989)
Brevibacterium sp.	34,34	Vecchio (1998)
Bacillus sp. (esporos)	52,40	He; Tebo (1998)
Pseudomonas aeruginosa	14,12	Langley; Beveridge (1999)
Enterobacter aerogenes NTG-01	25,12	Huang; Chen; Xu (2005)
Pseudomonas putida CZ1	27,20	Chen et al. (2005)
Cupriavidus taiwanensis TJ208	19,00	Chen et al. (2008)
Pseudomonas putida (NRRL B-255)	49,50	Uslu; Tanylol (2006)
Bacillus sp.	16,25	Tunali; Çabuk; Akar (2006)
Cupriavidus metallidurans CH34	38,72	Fan; Okayak; Rodrigues, (2014)

Quadro 1– Sorção de Cobre por bactérias



Pseudomonas Putida

- é uma bactéria gram-negativa em forma de bastonete, que não apresenta desempenho, que utiliza o metabolismo aeróbico.
- possui aproximadamente 6,2 milhões de pares de bases de DNA.
- Os flagelos têm uma forma de onda que geralmente tem 2 a 3 comprimentos de onda.

Bioacumulação

O processo que corresponde ao transporte dos cátions de metais pesados através da membrana celular, os íons de metais pesados apresentam duas vias para entrar nas células, sendo uma inespecífica e outra de grande especificidade.

1

A primeira ocorre através de um gradiente quimiosmótico da membrana citoplasmática (transporte passivo).

2

A segunda e principal via envolve hidrólise de ATP, de maneira geral, as proteínas envolvidas no transporte passivo de íons são expressas constitutivamente pelas células, enquanto a expressão das proteínas de transporte ativo é regulada.

PROCESSOS DA BIOSSORÇÃO

Sorção com os **radicais aniônicos** dos **envoltórios celulares**, seguido ou não de precipitação dos metais.

As cargas negativas **são originadas da ionização** dos radicais carboxílicos, fosfáticos, hidroxílicos e sulfidrílicos **encontrados nos polímeros da parede microbiana.**

Sorção

O fenômeno da sorção consiste na impregnação de uma substância dissolvida em um fluido na parte sólida de um meio poroso durante a percolação

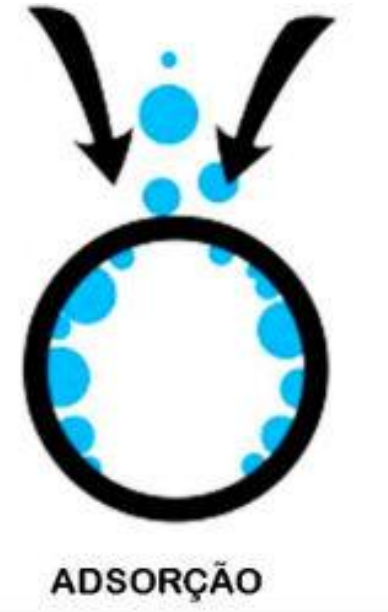
Podendo ter duas subcamas

Adsorção

Absorção

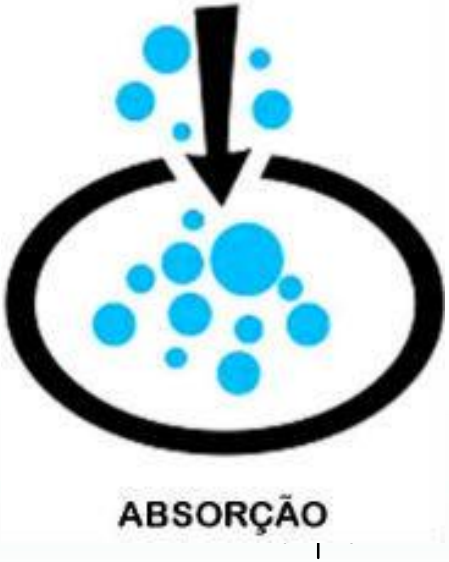
Adsorção

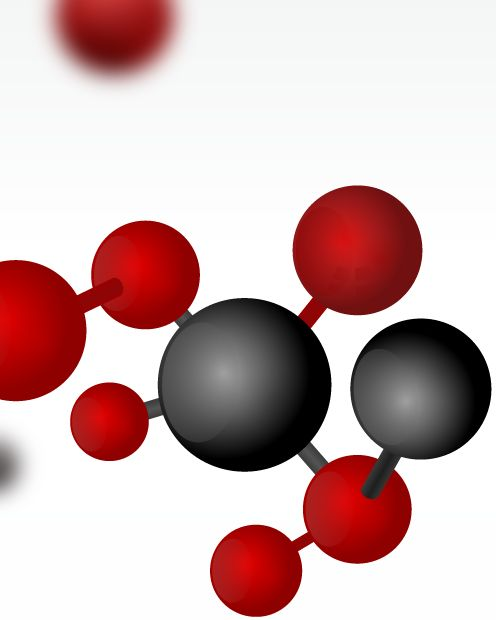
Uma substância fica retida na superfície de outra porém, sem fazer parte de seu volume.



Absorção

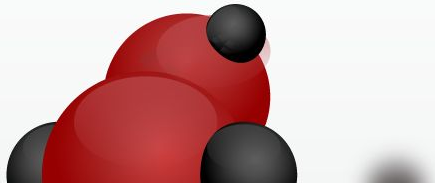
Uma substância é embebida por outra, ocasionando mudança de volume



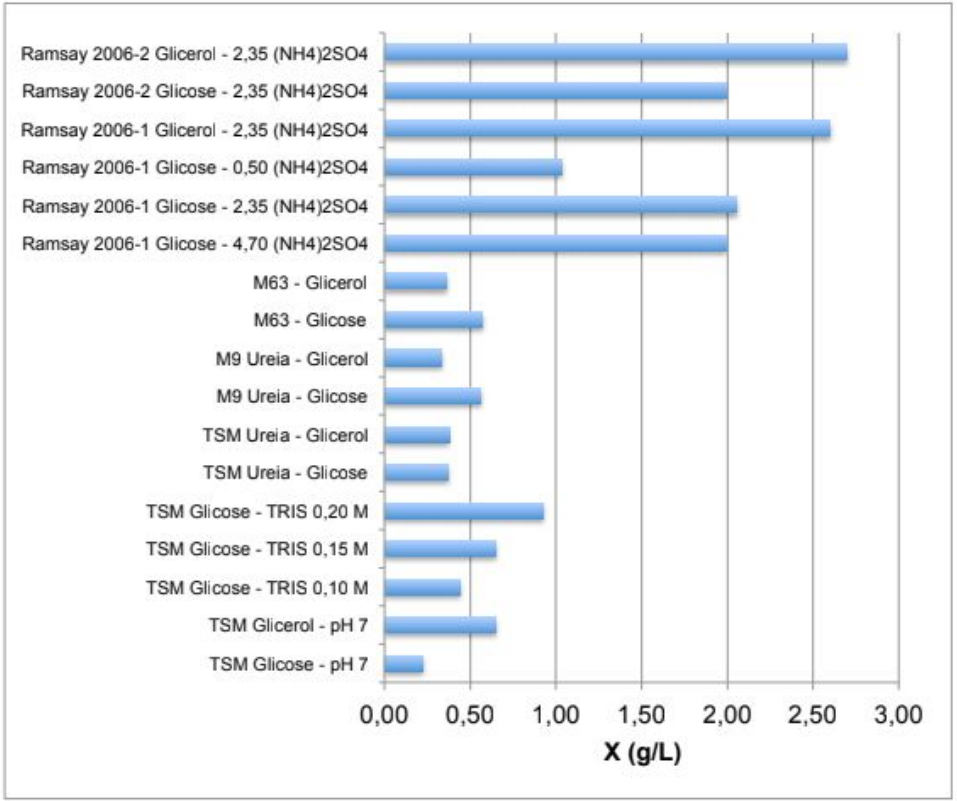


04

RESULTADOS E DISCUSSÕES

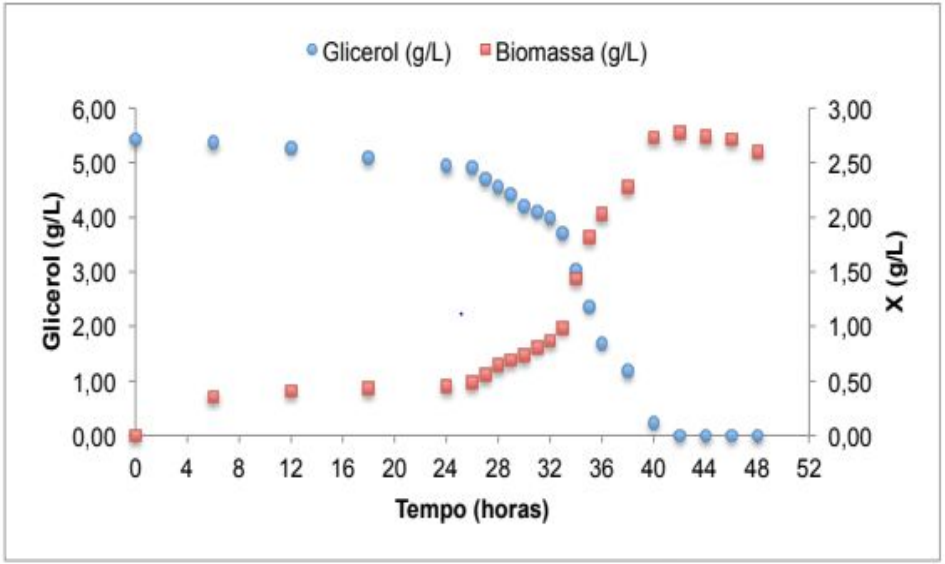


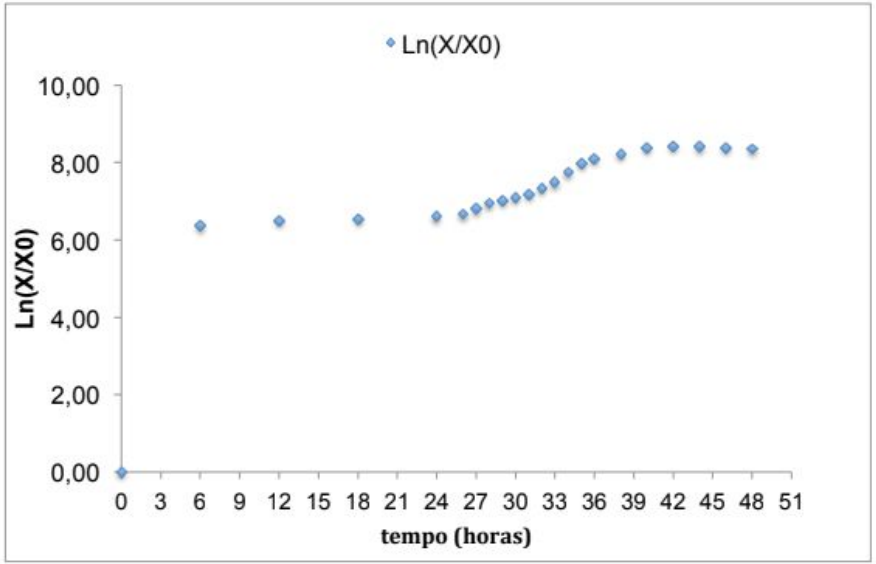
Resumo dos resultados dos cultivos nos diferentes meios



-Destaca-se o meio ramsay 2006-2 em glicerol.

Cinética de crescimento em meio Ramsey 2006-2 com glicerol

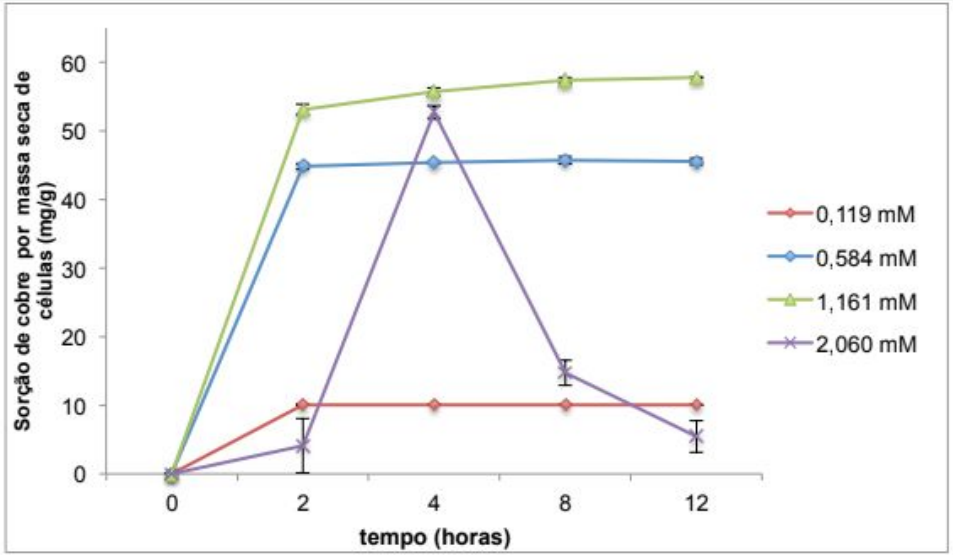




X- 2,775 ± 0,018 g/L
μmáx- de 0,10 h-1
YX/S-, 0,511 ± 0,005 g/g

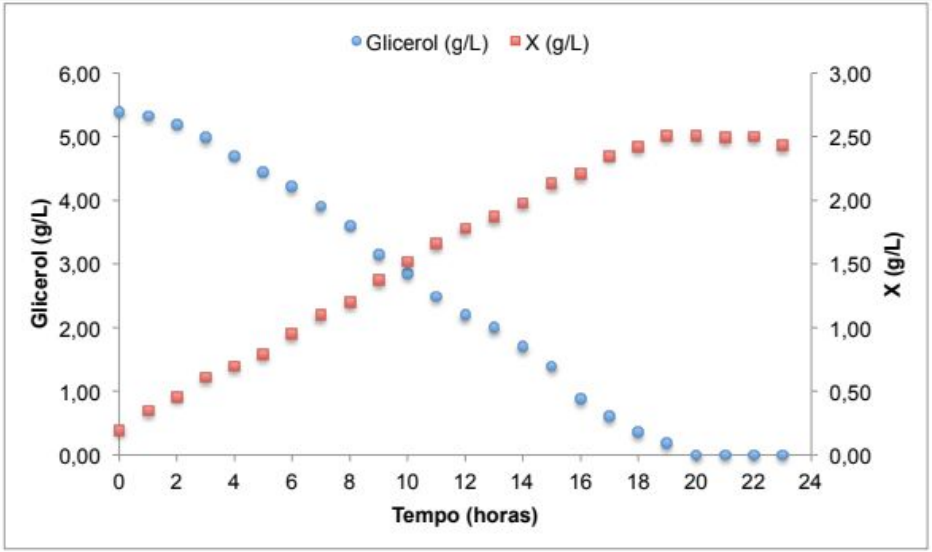
Sorção de Cobre pela *Pseudomonas putida sp.*

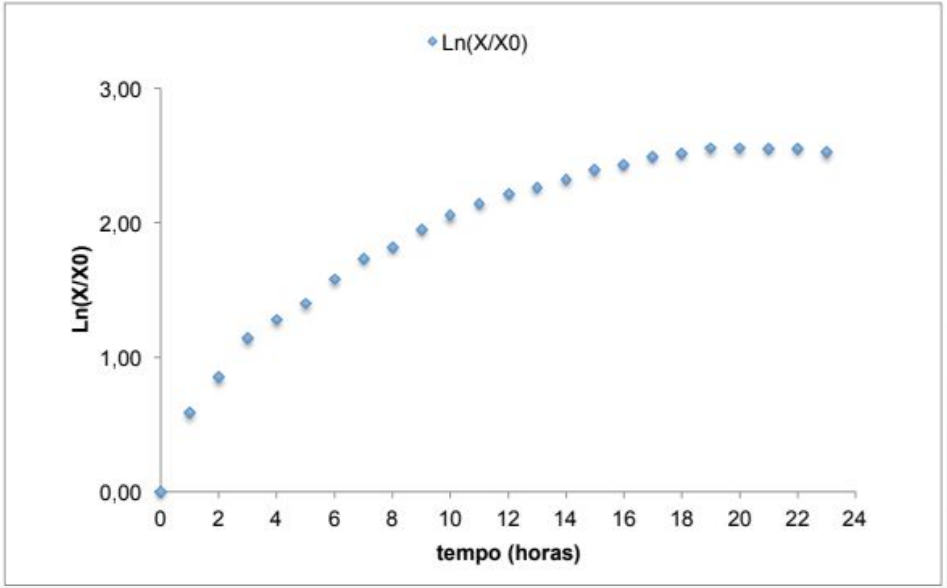
Bactéria	Cu^{+2} Sorvido (mg/g de biomassa seca)	Referência
Bacillus subtilis	11,00	Mayers; Beveridge (1989)
Brevibacterium sp.	34,34	Vecchio (1998)
Bacillus sp. (esporos)	52,40	He; Tebo (1998)
Pseudomonas aeruginosa	14,12	Langley; Beveridge (1999)
Enterobacter aerogenes NTG-01	25,12	Huang; Chen; Xu (2005)
Pseudomonas putida CZ1	27,20	Chen et al. (2005)
Cupriavidus taiwanensis TJ208	19,00	Chen et al. (2008)
Pseudomonas putida (NRRL B-255)	49,50	Uslu; Tanylol (2006)
Bacillus sp.	16,25	Tunali; Çabuk; Akar (2006)
Cupriavidus metallidurans CH34	38,72	Fan; Okayak; Rodrigues, (2014)
***Pseudomonas putida* sp.**	**57,78**	**Este trabalho**



máxima sorção de cobre pela bactéria foi de 57,78 ± 0,10 mg de cobre/g massa seca de células

Cinética de crescimento no meio MM com glicerol



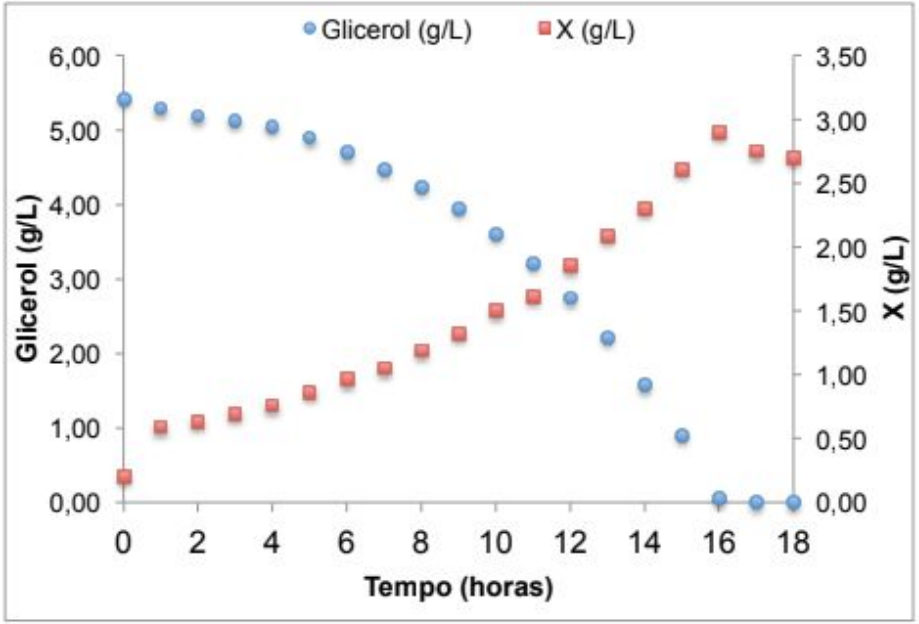


X- foi de 2,51 g/L

μmáx- de 0,11 h-1

YX/S- foi de 0,46 g/g

Cinética de crescimento em reator no meio MM-HCD com glicerol

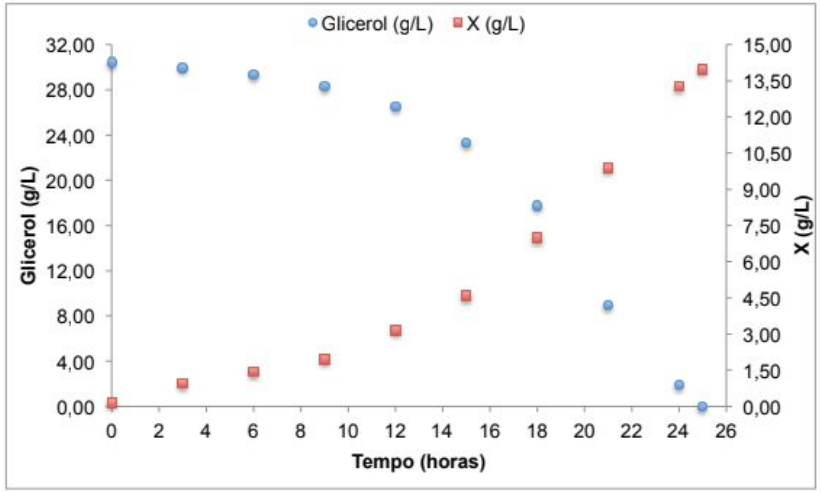


X- 2,90 g/L.

Yx/s- 0,49 g/g

μmax- 0,11 h-1

Cultivos com sistema de filtração e adição contínua de Cobre



-ineficiente
- tempo prolongado da filtração gera stress na célula
-lavagem da célula com solução tampão reduz eficiência
-Q = 1 mg/g de célula

Tempo (h)	Massa de Cu^{2+} adicionada no reator (mg)	Massa de Cu^{2+} na Saída do Reator (mg)	Percentual de Cu2+ Removido do Sistema (%)
2	330	276	16,36

Cultivo com sistema de filtração e adição de cobre por pulsos

Número de Pulsos	Tempo após a adição da solução de $Cu_2SO_4.7H_2O$ (h)	Q (Cu^{2+} mg/g de células secas)	Percentual de Cu^{2+} Removido (%)
1	2	0,14	91,1
2	4	0,29	90,5
3	6	0,43	90,2
4	8	0,58	91,6
5	10	0,72	90,3
6	12	0,87	91,9

-Q = 3,23 mg de cobre/g de célula

-stress causado pelo sistema de filtração

Cultivos com alimentação sob vazão e sorção de cobre

Tempo de Cultivo (h)	Tempo após a adição da solução de $CuSO_4.7H_2O$ (h)	Q (mg de Cu^{2+}/g de células secas)	X (g/L)
39	2	15,59	49,93
41	4	15,64	49,45
43	6	14,73	51,26
45	8	16,59	51,79
47	10	14,54	51,11
49	12	15,89	51,38

-único pulso da solução de sulfato de cobre, totalizando 1037 mg de cobre ou 10,25 mM (652 ppm)no reator já inibe o crescimento a um meio com X de 31,5 g/L

- Q = ordem de 15 mg de Cu2+/grama de células secas

- percentual total de cobre sorvido: 79%

Cultivos com alimentação sob vazão e sorção de cobre

Número de Pulsos	Tempo de Cultivo (h)	Tempo após a adição da solução de $CuSO_4.7H_2O$ (h)	Q (mg de Cu^{2+}/g de células secas)	X(g/L)
1	37,50	2,00	1,11	43,20
2	39,50	4,00	2,46	44,20
3	41,50	6,00	3,84	47,20
4	43,50	8,00	5,25	45,10
5	45,50	10,00	7,39	41,10
6	47,50	12,00	9,29	41,90
7	49,50	14,00	11,09	41,30
8	51,50	16,00	13,17	41,40
9	53,50	18,00	16,22	40,20
10	55,17	20,67	19,33	41,00
11	58,17	22,67	21,22	41,20
12	60,17	24,67	23,28	41,80
13	62,17	26,67	26,25	41,20
14	64,17	28,67	29,02	41,00

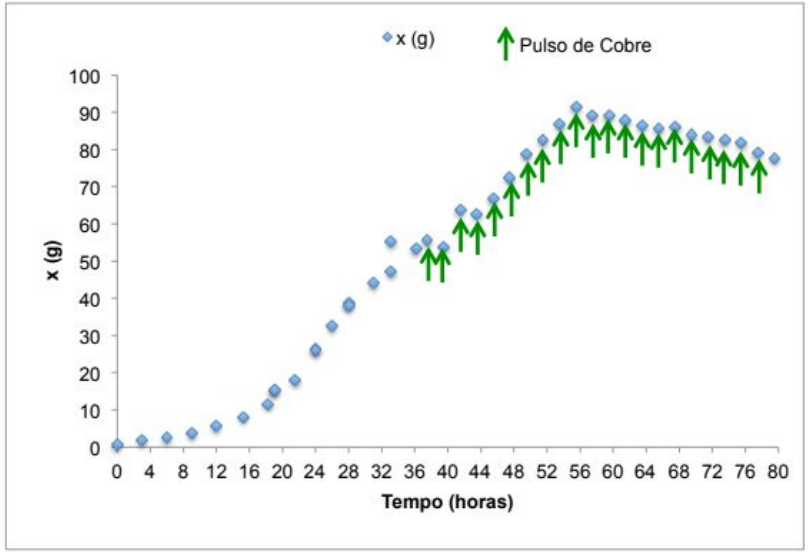
-14 pulsos de sulfato de cobre, totalizando 2002 mg de Cu2+ no reator

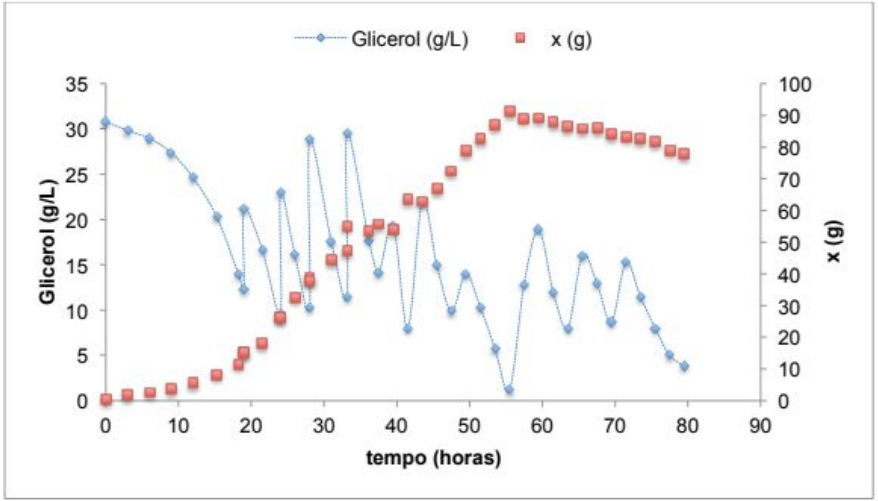
-com 439 ppm Cu2+ e valor de X de 45,10 g/L há inibição de crescimento

-Q= foi da ordem de 29 mg de Cu2+/g

- percentual total de cobre sorvido foi de 86%

Cultivos com alimentação por pulsos e sorção de cobre





-glicerol está sendo utilizado para produzir energia necessária para o processo de bioacumulação

-689 ppm de Cu2+ com valor de X de 44,10 g/L para iniciar inibição

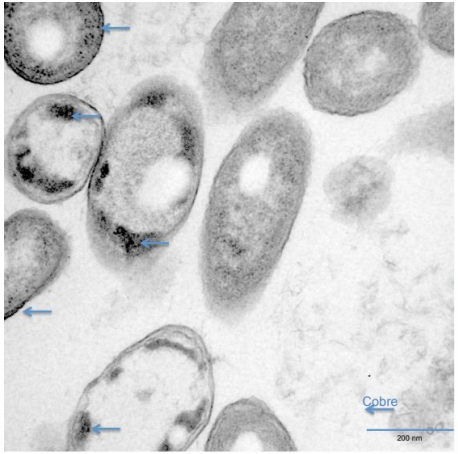
Cultivos com alimentação por pulsos e sorção de cobre

Número de Pulsos	Tempo de Cultivo (h)	Tempo após a adição da solução de $CuSO_4.7H_2O$ (h)	Q (mg de Cu^{2+}/g de células secas)	X(g/L)
1	39,50	2	1,54	31,18
2	41,50	4	2,52	35,30
3	43,50	6	3,88	34,50
4	45,50	8	5,19	36,30
5	47,50	10	6,19	37,70
6	49,50	12	5,48	42,20
7	51,50	14	7,72	39,70
8	53,50	16	8,65	42,22
9	55,50	18	10,19	44,80
10	57,50	20	12,51	44,10
11	59,50	22	12,80	44,60
12	61,50	24	14,12	44,70
13	63,50	26	16,28	44,00
14	65,50	28	17,44	44,20
15	67,50	30	18,90	44,80
16	69,50	32	21,10	44,20
17	71,50	34	22,76	44,30
18	73,50	36	24,74	44,35
19	75,50	38	26,83	44,44
20	77,50	40	29,35	43,40
21	79,50	42	32,57	43,20

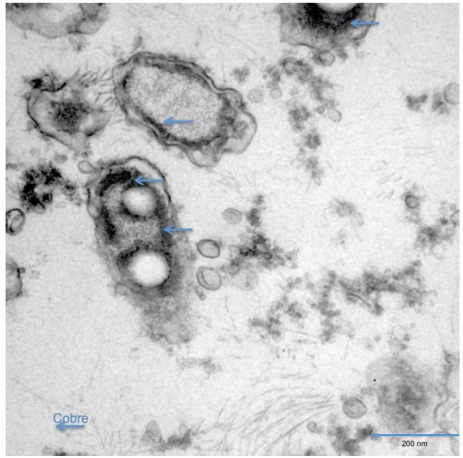
-Q= ordem de 32,6 mg/g
- Percentual total de cobre sorvido foi de 86%
- em estágios avançados ocorre lise celular por acumulação de cobre nas células.

Microscopia das amostras de células

Célula intacta



Célula com metal na membrana e internamente



Lise celular

Conclusão

-Diferentes valores de Q para cada cultivo , o máximo deles em reator foi de 32,6 mg/g, com 86% de redução de cobre no meio.

-Em estágios avançados , ocorre lise celular, a qual deve ser evitada.

-a inibição resultante da adição de cobre, variou com a forma de adição do cobre, a carga adicionada e a relação entre massa de cobre e concentração celular.

-AS diferentes condições nos cultivos como pH, força iônica, estado fisiológico das células, têm influência sobre a capacidade de sorção de cobre pelas células.

Referências

MICRORGANISMOS SÃO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS - **Luanne Caires**

ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DE COBRE POR *Pseudomonas putida* sp. EM REATOR - **BRUNO OLIVA OISHI**

ADSORÇÃO: aspectos teóricos e aplicações ambientais
Ronaldo Ferreira do Nascimento

OBRIGADA!