

# IDENTIFICAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE SIDERÓFOROS PARA BIOREMEDIAÇÃO DA ÁREA CONTAMINADA POR METAIS PESADOS NA REGIÃO DE SANTO AMARO, BAHIA

**Adriana Fidelis Couto Souza<sup>1</sup>; Dr(a). Elisa Espósito<sup>2</sup>**

1. Bolsista PIBIC / CNPQ, Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [adrifcs@yahoo.com.br](mailto:adrifcs@yahoo.com.br)
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [isaesposito@gmail.com](mailto:isaesposito@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorremediação, solos contaminados, metal pesado

## INTRODUÇÃO

Nas convenções internacionais, é predominante a preocupação relacionada com os despejos de poluentes no meio ambiente decorrente da atividade industrial. Mesmo depois de acordos entre as partes, a industrialização continua a provocar sérios problemas ao ambiente e, também, à saúde humana. Este fato pode ser notado no município de Santo Amaro – Bahia. Localizado às margens do rio Subaé e a 10 Km da Baía de Todos os Santos, teve suas águas, solo, ar e população contaminados pelas escórias resultantes da produção de lingotes de chumbo, os quais persistem no ambiente, mesmo com a fábrica fechada desde 1994 (Anjos, 2003).

No ano de 1956, a empresa COBRAC se instalou na cidade de Santo Amaro (região do Recôncavo Baiano) e iniciou o processo industrial de produção de lingotes de chumbo. Entretanto, as escórias resultantes deste processo foram depositadas de maneira inadequada, a céu aberto e sem tratamento prévio. Com o encerramento das atividades em 1994, a PLUMBUM Mineradora (antiga COBRAC), foi obrigada a reunir e soterrar seus dejetos em um vale, o que fez sem as devidas medidas de proteção (Anjos, 2003; Carvalho *et al.*, 2003). A desativação deste empreendimento industrial resultou em graves danos ambientais, como contaminação e degradação ambiental, com forte impacto na saúde pública, na economia local e no meio ambiente (Portella *et al.*, 2009).

Anjos (2003) menciona que a destinação inadequada dos dejetos durante os 38 anos de atividade dessa empresa resultou em contaminação do meio ambiente e da população local, principalmente por cádmio e chumbo. Em abril de 2010, a Assessoria de Comunicação Social da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, noticiou que “619 ex-trabalhadores da fábrica foram a óbito e vários apresentam seqüelas, assim como seus familiares e pessoas que moravam no entorno da empresa”.

A contaminação por metais pesados em Santo Amaro encontra-se em nível endêmico, consistindo em um problema grave e de difícil solução. Tais poluentes não são facilmente retirados da natureza, persistindo nesta indefinidamente (Rajkumar & Freitas, 2008), causando, nos moradores, danos fisiológicos, neurológicos e respiratórios (Carvalho *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2003). Instituições relevantes como a Organização Panamericana da Saúde e a *Alliance to End Childhood Lead Poisoning / Environmental Defense Fund* classificaram Santo Amaro como uma das regiões mais poluídas do planeta (Carvalho *et al.*, 2006).

Métodos, como escavação, incineração são utilizados para remediar ambientes poluídos, mas apresentam alto custo, baixa eficiência, ampla destruição da estrutura do solo, dentre outras conseqüências (Kuiper *et al.*, 2004). Uma opção promissora para substituir tais métodos é a rizoremediação, processo em que microrganismos associados a raízes atuam na descontaminação ambiental, extraindo metais pesados ou transformando estes através de reações enzimáticas, provocando ligações com metabólitos ou com constituintes do solo (Hernandez *et al.*, 1998). Rizobactérias produzem substâncias que auxiliam na permanência e desenvolvimento das plantas

em ambientes estressados, como as auxinas (Kumar *et al.*, 2009), e que alteram a biodisponibilidade dos metais pesados no solo por formar complexos com estes, como sideróforos (Rajkumar *et al.*, 2010).

Este trabalho, iniciado na Iniciação Científica em andamento no mestrado, foi a primeira contribuição em nível de coleta e verificação de atividade enzimática pela microbiota na região de Santo Amaro – Bahia. Além do conhecimento da biodiversidade microbiana, também pretende-se estudar o potencial biotecnológico destes microrganismos na descontaminação de solos impactados por metais pesados.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **1. Coleta de plantas**

Foram coletadas as seguintes plantas: *Cecropia pachystachya* Trécul (embaúba), *Ricinus communis* L.(mamona), Poaceae (gramínea), Fabaceae (mimosa, eritrina, tefrosia), Convovulaceae (ipomoea), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Tapirira guianensis* Aubl., *Borreria capitata* (Ruiz & Pav.). Os espécimes vegetais foram coletados seguindo a metodologia Walter & Cavalcanti (2005). Os materiais testemunhos (*vouchers*) foram depositados no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia. A identificação das espécies foi feita utilizando o método de comparação com espécimes previamente identificados por especialistas nos herbários. Sempre que necessário uma duplicata foi enviada aos botânicos especialistas para confirmar a identificação prévia.

### **2. Isolamento e preservação de microrganismos**

As amostras de solo rizosférico foram peneiradas na fração menor que 2 mm, homogêneas e deixadas por 30 minutos na temperatura de 30°C. Em seguida, foram retiradas sub-amostras de 10g de cada ponto amostral e adicionadas em Erlenmeyer de 500mL contendo 90mL de solução salina. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm a 30°C durante 15 minutos. Após este procedimento, foram realizadas diluições seriadas com água estéril de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , retiradas alíquotas de 100µL para inocular e semear, em triplicata, em placas de petri contendo LB ágar (Luria-Bertani Agar) e incubá-las a 30°C. Após um período de 24 a 48h de incubação foi feito o isolamento dos microrganismos. As linhagens isoladas foram preservadas em solução contendo 800µL de TSB (*Tryptone Soya Broth*) com 200µL de glicerol 100% a -80°C.

### **3. Detecção de auxina**

A presença deste hormônio foi verificada segundo protocolo Bric *et al.*, 1991, modificado. Microrganismos foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI Broth) por 24h a 30°C. Em seguida, foram transferidos para meio de cultura contendo triptofano, incubados em um *shaker* a 120 rpm a 30°C por 24h. Centrifugou-se 1mL da cultura e ao sobrenadante foi acrescido 1mL do reagente de Salkowski, o qual detecta a produção da auxina por mudança de cor do amarelo para o lilás.

### **4. Detecção de sideróforo**

A produção de sideróforo foi avaliada segundo protocolo Shin et al, 2001, modificado. Microrganismos foram cultivados em tubos de ensaio contendo corante CAS (Chrome Azurol S), o qual detecta mudança de cor do azul para o laranja após a ligação do ferro com o sideróforo produzido pelo microrganismo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As áreas de coleta, localizadas no entorno das antigas instalações da Plumbum Mineradora, são mostradas na figura 1. Contamos com a participação de um especialista em Botânica para a coleta e identificação das plantas de maior ocorrência na área. Foram registradas

como espécies mais comuns, *Cecropia pachystachya* Trécul (embaúba), *Ricinus comunis* L.(mamona), Poaceae (gramínea), Fabaceae (mimosa, eritrina, tefrosia), Convolvulaceae (ipomoea), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Tapirira guianensis* Aubl., *Borreria capitata* (Ruiz & Pav.)DC. As plantas citadas foram herborizadas e seus *vouchers* depositados no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana – Bahia.

Em algumas áreas a vegetação era mais densa, formando um dossel semelhante a vegetação característica do bioma Mata Atlântica. Em outros trechos visitados a vegetação era arbustiva e herbácea, possuindo espécies características do bioma Caatinga. A vegetação da área possui forte impacto antrópico, com diversas espécies exóticas (Figura 1B). Entretanto, não é possível avaliar a interferência da contaminação na cobertura vegetal.

Para isolamento de microrganismos da rizosfera, utilizaram-se as seguintes plantas: *Ocimum* sp., *Hipomeia* sp., *Eritrina* sp., *Mimosa* sp., *Justicia* sp., *Cecropia* sp., *Tefrosia* sp., totalizando 21 isolados. Realizou-se coloração de Gram dos rizomicrorganismos, dentre os quais encontramos: cocos Gram positivos em *Hipomeia* sp., *Cecropia* sp., *Eritrina* sp., *Tefrosia* sp., *Mimosa* sp., *Ocimum* sp., havendo nesta última planta ocorrência também de bacilos Gram positivos.

As rizobactérias isoladas de *Hipomeia* sp., *Eritrina* sp., *Mimosa* sp., *Cecropia* sp. e *Tefrosia* sp. apresentaram produção de sideróforo, enquanto que as isoladas de *Ocimum* sp. não apresentaram tal atividade. As bactérias produtoras de sideróforos fornecem o metal para as plantas, o qual é um dos elementos essenciais para o seu crescimento. Além disso, o sideróforo descontamina o solo de metais pesados, pois se liga a estes, tornando-os biodisponíveis para as plantas (Rajkumar *et al.*, 2010).

Todas as rizobactérias isoladas apresentaram produção de auxina, a qual, quando secretado por bactérias (Cunha, 2005) , promovem o crescimento da raiz, favorecendo a permanência desta no solo em estudo, contaminado por metais pesados, principalmente cádmio e chumbo



Figura 1: A. Antigas instalações da Plumbum Mineradora; B.Vegetação com forte impacto antrópico .  
Foto: Adriana Fidelis

## CONCLUSÃO

Este trabalho proporcionou coleta de plantas, com deposição dos *vouchers* no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana. Além disso, o isolamento dos microrganismos foi realizado e criopreservado na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia – CCMB, localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana.

A identificação dos microrganismos será realizado por técnicas moleculares durante o mestrado. Durante este, serão efetuados também a detecção de substâncias produzidas pelas rizobactérias como ACC – deaminase, auxina e biosurfactantes.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Anjos, J.A.S.A. dos. **Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da pouição por metais pesados: o caso da PLumbum em Santo Amaro da Purificação/Ba.** 2003. 328f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bric, J.M.; Bostock, R.M.; Silverstone, S.E. 1991. **Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane.** Applied and Environmental Microbiology, v.57, p.535-538;

Burd, G.I.; Dixon, D.G.; Glick, B.R. 1998. **A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedling.** Applied and environmental microbiology, v.64, p.3663-3668;

Carvalho, F.M.; Neto, A.M.S.; Peres, M.F.T.; Gonçalves, H.R.; Guimarães, G.C.; Amorim, C.J.B.; Silva-Jr, J.A.S.; Tavares, T.M. 1996. **Intoxicação pelo chumbo: zinco protoporfirina no sangue de crianças de Santo Amaro da Purificação e de Salvador, BA.** J. pediatr. (Rio J.), v.5, p. 295-298;

Carvalho, F.M.; Neto, A.M.S.; Tavares, T.M.; Costa, A.C.A.; Chaves, C.R.C.; Nascimento, L.D.; Reis, M.A. 2003. **Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil.** Rev Panam Salud Publica / Pan Am J Public Health, v.13, p.19-24;

Carvalho, F.M.; Neto, A.M.S.; Tavares, T.M.; Costa, A.C.A.; Chaves, C.R.C.; Nascimento, L.D.; Reis, M.A. 2006. **A persistência de níveis elevados de chumbo no sangue de crianças de Santo Amaro da Purificação.** Seminário sobre contaminação por metais pesados em Santo Amaro da Purificação. Santo Amaro da Purificação-BA;

Cunha, J.deF., 2005. **Rizobacterização no crescimento de mudas de Sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth).** Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais;

Hernandez, A.; Mellado, R.P.; Martinez, J.L. 1998. **Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*.** Applied and Environmental Microbiology, v.64, p.4317-4320;

Kuiper, I.; Lagendijk, E.L.; Bloembergen, G.V.; Lugtenberg, J.J. 2004. **Rhizoremediation - A beneficial plant-microbe interaction.** The American Phytopathological Society, v.17, p.6-15;

Kumar, K.V.; Srivastava, S.; Singh, N.; Behl, H.M. 2009. **Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*.** Journal of Hazardous Materials, v.170, p.51-57;

Portella, R. B.; Guedes, J.F.C.; Carvalho, I.G.A.; Machado, S.L.; Guimarães, R.B. 2009. **Desativação de uma metalúrgica em Santo Amaro da Purificação-Ba: passivo ambiental e déficit institucional.** Disponível em: <<http://www.meau.ufba.br/site/node/552>>. Acesso em: 31 mar. 2010;

Rajkumar, M.; Freitas, H. 2008. **Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard.** Bioresource Technology, v.99, p.3491-3498;

Rajkumar, M.; Ae, N.; Prasad, M.N.V.; Freitas, H. 2010. **Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction.** Trends in Biotechnology, v.28, p.142-149;