**AUTARQUIA ASSOCIADA À
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DE BIOSSORVENTES NO
TRATAMENTO DE REJEITOS RADIOATIVOS LÍQUIDOS
CONTENDO AMERÍCIO-241**

TANIA REGINA DE BORBA

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações**

**Orientador:
Dr. Júlio Takehiro Marumo**

Somos responsáveis pelas imagens que
criamos na mente dos outros, não apenas
através do que falamos, mas igualmente através
de tudo aquilo que escrevemos. “Chico Xavier”

Fonte: Sinal Verde, 1972.

Ao Marcos, meu marido, meu maior
incentivador e grande apoio para a
realização deste trabalho. Aos meus
filhos André e Gabriel que também
me apoiaram e incentivaram com
muito carinho.

Agradecimentos

Ao Dr. Júlio Takehiro Marumo pela orientação, apoio, confiança e incentivo constantes.

À Dra. Solange Kazumi Sakata pelas sugestões, discussões, auxílio, dedicação e paciência.

À Dra. Maria Helena Bellini Marumo pelas discussões, auxílio, apoio e incentivo.

Ao Marcos, meu marido, que esteve presente em todos os momentos, incentivando, apoiando, ajudando e, principalmente acreditando no meu potencial.

Ao Dr. Roberto Vicente pelo apoio, sugestões e discussões.

A amiga Maria Helena Tirollo Taddei, da CNEN de Poços de Caldas, pela colaboração e apoio técnico.

Ao MSc. Rafael Vicente de Pádua Ferreira pelo auxílio, apoio, incentivo e dedicação constantes.

Ao Dr. Durvanei Augusto Maria, do Instituto Butantan, pelo auxílio e dedicação.

Ao Dr. Ronaldo Biondo e Dra. Elisabete José Vicente do Laboratório do Genética de Micro-organismos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo/SP, pela colaboração.

A todos os amigos do Laboratório de Rejeitos Radioativos, pelas gentilezas, apoio, companheirismo e bons momentos.

RESUMO

O uso da energia nuclear para as mais diversas finalidades tem se intensificado e destacado pelos benefícios que proporciona. A medicina diagnóstica e terapêutica, a agricultura, a indústria, a geração de energia elétrica, são alguns exemplos. Entretanto, o uso da energia nuclear gera rejeitos radioativos e estes requerem tratamento adequado para garantir a segurança ambiental e dos seres vivos. A bioissorção e bioacumulação representam uma alternativa emergente, para o tratamento de rejeitos radioativos líquidos, proporcionando redução de volume e mudança de estado físico. Este trabalho teve como objetivos estudar bioissorventes para promover o tratamento de rejeitos líquidos contendo Amerício-241, proporcionando redução de volume e mudando seu estado físico para sólido. Os bioissorventes avaliados foram: *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas, alginato de cálcio, *Bacillus subtilis*, *Cupriavidus metallidurans* e *Ochrobactrum anthropi*. Os resultados foram bastante satisfatórios, chegando a 100 % em alguns casos. Esta técnica parece viável para a implantação no Laboratório de Rejeitos Radioativos do IPEN - CNEN/SP a curto prazo, por ser simples e de baixo custo.

Palavras Chave: Amerício-241, bioissorção, bioacumulação, bactérias.

ABSTRACT

The use of nuclear energy for many different purposes has been intensified and highlighted by the benefits that it provides. Medical diagnosis and therapy, agriculture, industry and electricity generation are examples of its application. However, nuclear energy generates radioactive wastes that require suitable treatment ensuring life and environmental safety. Biosorption and bioaccumulation represent an emergent alternative for the treatment of radioactive liquid wastes, providing volume reduction and physical state change. This work aimed to study biosorbents for the treatment of radioactive liquid wastes contaminated with americium-241 in order to reduce the volume and change the physical state from liquid to solid. The biosorbents evaluated were *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in calcium alginate beads, inactivated and free cells of *Saccharomyces cerevisiae*, calcium alginate beads, *Bacillus subtilis*, *Cupriavidus metallidurans* and *Ochrobactrum anthropi*. The results were quite satisfactory, achieving 100% in some cases. The technique presented in this work may be useful and viable for implementing at the Waste Management Laboratory of IPEN – CNEN/SP in short term, since it is an easy and low cost method.

KEYWORDS: Americium-241, biosorption, bioaccumulation, bacteria.

SUMÁRIO

PÁGINA

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Amerício.....	6
3.2 Origem do rejeito radioativo	7
3.3 Gerenciamento de rejeitos radioativos.....	9
3.4 Mecanismos de remoção de metais pesados	10
3.4.1 Biossorção	10
3.4.2 Bioacumulação.....	15
3.5 Biossorção vs Bioacumulação	17
3.6 Biossorventes	19
3.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.6.2 Alginato de sódio.....	22
3.6.3 Bactérias	26
3.6.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	27
3.6.3.2 <i>Cupriavidus metallidurans</i>	29
3.6.3.3 <i>Ochrobactrum anthropi</i>	30
3.7 Biorremoção de Amerício-241	31
4. METODOLOGIA	33
4.1 Biossorção	34
4.1.1 Biossorção por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> livres	34
4.1.2 Biossorção por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizadas em micro esferas de alginato de cálcio	35
4.1.3 Biossorção por micro esferas de alginato de cálcio	36
4.2 Biorremoção por bactérias	37
4.2.1 Cultura de bactérias	37
4.2.2 C.I.M. – Concentração Inibitória Mínima	38
4.3 Curvas de crescimento das bactérias	40
4.4 Viabilidade celular	40
4.5 Experimentos de biorremoção	41
4.6 Medidas de segurança.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1 Resultados da viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inativadas por radiação.	43
5.2 Resultados de Biossorção	43
5.2.1 Biossorção de ²⁴¹ Am por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> livres inativadas ..	43
5.2.2 Biossorção de ²⁴¹ Am por alginato de cálcio e por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizadas.	46
5.3 Testes preliminares realizados com bactérias	50
5.3.1 Curvas de crescimento	50
5.3.2 Concentração Inibitória Mínima.....	51
5.3.3 Testes de viabilidade celular	52
5.4 Resultados de biorremoção	54
5.4.1 Biorremoção por <i>Ochrobactrum anthropi</i>	54
5.4.2 Biorremoção por <i>Cupriavidus metallidurans</i>	55
5.4.3 Biorremoção por <i>Bacillus subtilis</i>	56

6. CONCLUSÕES.....	59
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

O avanço da ciência e da tecnologia desde a revolução industrial tem aumentado a capacidade do ser humano em explorar os recursos naturais. A introdução repentina e frequente de compostos químicos em diferentes ecossistemas alterando a capacidade de auto-limpeza dos mesmos, resultando no acúmulo de contaminantes a níveis problemáticos e até prejudiciais.

A contaminação do ambiente com metais tóxicos e radioisótopos surge como resultado da atividade humana (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000). Esses poluentes, mesmo em baixas concentrações não se degradam, e tendem a circular e permanecer por longo tempo no ambiente, além de se acumularem através da cadeia alimentar, o que cria sérios problemas de saúde pública (MACHADO, 2008).

Os radioisótopos têm sido amplamente utilizados na indústria, agricultura, medicina e, principalmente na área da pesquisa. O custo da utilização desta tecnologia para a sociedade é a geração de rejeitos radioativos.

Os rejeitos radioativos necessitam ser tratados apropriadamente para garantir a segurança do homem e do meio ambiente, cabendo à gerência de rejeitos radioativos esse papel. Compreende-se por gerência de rejeitos radioativos, o controle dos rejeitos radioativos que envolvem uma série de atividades operacionais e administrativas, tais como: coleta, segregação, pré-tratamento, tratamento, acondicionamento, armazenagem temporária, transporte e deposição final (MARUMO, 1997).

As técnicas convencionais de remoção de íons metálicos de soluções, tais como a precipitação, troca iônica e processos eletroquímicos nem sempre são adequadas para o tratamento de rejeitos radioativos devido aos grandes volumes de rejeitos, baixas concentrações de íons metálicos em soluções aquosas e por razões econômicas. Em muitos países esses rejeitos são tratados por incineração, que destrói os compostos orgânicos perigosos e os radionuclídeos

presentes são capturados pelas cinzas volantes ou liberados com os gases (STRINGFELLOW *et al.*, 2000).

No Brasil, não há incineradores disponíveis para a queima de rejeitos radioativos. Apesar do volume de geração anual desses rejeitos ser baixo, da ordem de 0,2 m³ numa instituição como o IPEN, é necessário desenvolver métodos de tratamento que possam ser aplicados eficientemente a um baixo custo. Dos fluxos de rejeitos, os líquidos merecem atenção especial, pois os processos de tratamento disponíveis são, muitas vezes, caros e operacionalmente difíceis. Buscar novas alternativas de tratamento desses rejeitos que aliem baixo custo e eficiência é uma tarefa importante e difícil, já que, nesse caso, cuidados adicionais devem ser considerados por se tratar de rejeitos radioativos, que estão em estado físico de fácil dispersão.

A pesquisa de novas técnicas envolvendo a remoção de radionuclídeos de rejeitos tem dirigido atenções para a biossorção (AKHTAR *et al.*, 2008; TSEZOS, 2001 e AHALYA *et al.*, 2003), que é um processo no qual biomassa é usada na remoção de metais tóxicos de uma solução (GADD, 1993).

Esta técnica é considerada uma alternativa biotecnológica de baixo custo para o tratamento de grandes volumes e baixas concentrações de metais, de 1 a 100 mg/L presentes em rejeitos líquidos contendo variados radionuclídeos.

Os mecanismos da biossorção de metais tóxicos são complexos e podem ser resumidos em quelação, adsorção na superfície da célula por forças físicas e acumulação extracelular e intracelular (VOLESKY e HOLAN, 1995; AHALYA *et al.*, 2007).

Como exemplo de biossorbentes pode-se citar as algas (FENG *et al.*, 2004), bactérias (MURALEEDHARAN *et al.*, 1991), fungos (KAPOOR *et al.*, 1999) e leveduras (BAYAN *et al.*, 2001). A habilidade com que, em soluções diluídas, os micro-organismos concentram os íons metálicos em sua estrutura celular fez com que estes fossem os mais estudados na remoção de vários metais, como o Cu, Cd, Pb, U, Am, Ce, Cs e Ni, entre outros (VOLESKY, 1994).

Entre os biossorbentes mais promissores para remoção de metais pesados, que foram estudados nas últimas décadas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem recebido uma atenção cada vez maior devido à sua natureza singular (WANG e CHEN 2006). A *Saccharomyces cerevisiae*, destaca-se como biossorbente por ser um subproduto das indústrias de alimento e destilarias,

possuírem baixo custo, facilidade de manuseio, além de sequenciamento genético conhecido. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular e eucariótico com capacidade de bio sorção conferida pelos componentes celulares e, segundo Brady e Dukan, (1984), pela parede celular, o que conferiria um sítio adicional em relação a outros organismos desprovidos de parede celular. Devido a esta capacidade de retirar metais da água, ela pode ser usada como bioacumulador desses metais, sendo uma ótima alternativa para a descontaminação ambiental (BASÍLIO *et al.*, 2005).

Há diversos estudos desta levedura nas mais diferentes formas que auxiliaram na compreensão do mecanismo de retirada de diversos metais tóxicos como o Pb, Cu, Cd, Hg, Am, U, Ni, Zn, entre outros (WANG e CHEN, 2006, LIU *et al.*, 2002-b). É digno de nota que estudos de bio sorção/bioacumulação, demonstraram que a *Saccharomyces cerevisiae* pode diferenciar metais baseados na sua toxicidade e que apresenta mais afinidade com U, Pb, Hg do que Cu, Ni e outros metais. Foi demonstrado que a capacidade de acumular U e Zn em células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* é 40% maior quando comparada à biomassa viva (VOLESKY e PHILLIPS, 1995).

Muitos dos bio sorventes são utilizados na forma imobilizada quando se trata de grande volume de efluentes contaminados por metais pesados. Um material inerte age como suporte na biomassa formando uma estrutura sólida que é quimicamente estável e facilita o processo de separação entre o bio sorvente e o resíduo líquido. As técnicas mais comuns de imobilização baseiam-se na adsorção, na formação de ligações iônicas e covalentes e no enclausuramento em matrizes poliméricas (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; LEE, 1981).

Segundo Gomes *et al.* (2007) que estudaram a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes suportes para remoção de cádmio, o melhor suporte para a imobilização desta levedura é o alginato de cálcio, por sua estabilidade e capacidade de retenção de 90% do metal.

O alginato é um copolímero linear de a-L-guluronate e a-D-mannuronate, que constitui de 10 a 40% do peso seco de todas as algas marrons e apresenta a capacidade de formar géis estáveis biodegradáveis na presença de cátions (PAPAGEORGIOU, 2006). É frequentemente utilizado para imobilização de células e, além disso, na forma de esferas, o alginato de cálcio pode ser facilmente removido de uma solução de modo semelhante ao das resinas de troca

iônica. Sua capacidade isolada de bioabsorção também tem sido estudada (IBÁÑEZ, 2002; OZDEMIR, 2005).

A bioacumulação caracteriza-se pelo uso da habilidade que células ou micro-organismos vivos têm de absorver metais de uma solução (KADUKOVÁ, 2005).

O uso de biomassa microbiana com a finalidade de detoxificação de efluentes industriais para proteção ambiental e recuperação de metais valiosos por meio da bioabsorção disponibiliza uma tecnologia alternativa potencial (GADD, 2000 e LLOYD, 2003).

Os processos microbianos para remoção de metais tóxicos de fluxos de resíduos empregam células de biomassa vivas, não vivas, ou biopolímeros como bioabsorventes (KOTRBA, *et al.*, 1999).

Desta forma, a bioabsorção e/ou a bioacumulação podem ser considerados métodos viáveis de baixo custo, fácil aplicação e eficientes para tratamento de rejeitos radioativos líquidos armazenados na Gerência de Rejeitos Radioativos do IPEN-CNEN/SP. Esses rejeitos contêm ^{137}Cs , ^{241}Am , ^{235}U , ^{238}U e produtos de fissão e são provenientes, principalmente, de centros de pesquisa, incluem óleos lubrificantes e solventes utilizados em experimentos em geral e operações de descontaminação. A implantação destes processos para tratamento de rejeitos radioativos requer um estudo detalhado dos parâmetros que envolvem este processo.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos avaliar o potencial dos seguintes biossorventes: alginato de cálcio, *Saccharomyces cerevisiae* inativadas livres e imobilizadas em alginato de cálcio, além das bactérias *Ochrobactrum anthropi*, *Cupriavidus metallidurans* e *Bacillus subtilis* livres, na remoção de ^{241}Am presente em rejeito líquido, além de promover o tratamento de rejeito líquido contendo ^{241}Am , reduzindo volume e transformando o rejeito líquido em sólido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Amerício

Como um elemento transurânico, o Amerício tem cerca de 20 radioisótopos ou isômeros. Entre eles, o ^{241}Am ($T_{1/2} = 433$ anos, $E_{\alpha} = 5.468$ MeV, 86,6%; 5.443 MeV, 12,3%; $E_{\gamma} = 0,0596$ MeV, 35%), é o mais importante, porém não é usado exclusivamente na indústria nuclear, mas seu uso é amplo em outros campos. Por exemplo, muitos dos alarmes de incêndios de hotéis, hospitais e outros centros de serviços contêm uma fonte de ^{241}Am (LIU *et al.*, 2002-b).

O amerício é um elemento da série dos actínídeos, possui número atômico 95, imediatamente posterior ao plutônio. Foi isolado pela primeira vez em 1944 por Seaborg e seus colaboradores (KELLER, 1971 *apud* CLAIN, 1999).

O ^{241}Am é resultante de sucessivas capturas de nêutrons pelo Pu^{239} , conforme as reações:

Posteriormente, a produção deste radioisótopo foi confirmada pelo bombardeamento do ^{238}U com partículas alfa, segundo as reações:

As partículas α resultantes do processo de decaimento do ^{241}Am oferecem reduzido risco por radiação externa, devido ao fato de apresentarem um alcance máximo de 4 cm e, no tecido humano, somente alguns milésimos de milímetro. Em relação à radiação gama, 2 a 3 cm de tecido do corpo humano são suficientes para reduzir em 50% o número de fótons (MIRANDA e VICENTE, 1999 *apud* MARUMO, 2006).

Infelizmente o ^{241}Am é um dos contaminantes mais perigosos devido à sua alta toxicidade e meia-vida longa. Se o ^{241}Am for absorvido pelo corpo humano, fixa-se principalmente nos ossos e fígado. A dose máxima permitida ou concentração de ^{241}Am no corpo humano ou na água é de 11,1 kBq (aproximadamente $8.76 \times 10^{-8}\text{g}$) e 1,48 Bq/mL ($\sim 1.17 \cdot 10^{-6}\text{g/L}$), respectivamente (BENEDICT, 1981 *apud* LIU, 2002-b).

3.2 Origem do rejeito radioativo

A radioatividade é um fenômeno natural e fontes naturais de radiação são características do ambiente. Radiação e substâncias radioativas têm muitas aplicações benéficas, que vão desde a geração de energia para usos na indústria, medicina e agricultura. Os riscos da radiação para os trabalhadores, o público e ao meio ambiente que podem surgir a partir destas aplicações têm de ser avaliados e, quando necessário, controlados (IAEA, 2009).

A liberação de radionuclídeos de locais contaminados e sua subsequente mobilidade no meio ambiente é objeto de grande interesse público (MERROUN, 2008).

Significativas quantidades de radionuclídeos naturais ou artificiais/sintéticos foram liberados como consequência de testes nucleares nas décadas de 50 e 60, e também após o acidente nuclear de Chernobyl em 1986 (LLOYD e RENSHAW, 2005).

Existe a expectativa de que, no futuro, o uso da energia nuclear para a geração de eletricidade e outros propósitos aumente e substitua as fontes convencionais de energia (figura 1). De acordo com as estimativas da Agência Internacional de Energia Nuclear, até 2030, haverá um crescimento significativo do uso da eletricidade e a energia nuclear terá de expandir-se (IAEA, 2009).

Figura 1- Gráfico: Histórico e estimativas otimista e pessimista de produção de energia elétrica a partir de usinas nucleares. Fonte: IAEA, 2009.

A produção de energia nuclear, no entanto, está inevitavelmente associada a produção de rejeitos radioativos dos vários estágios do ciclo nuclear (IAEA, 2009). Entre os rejeitos líquidos, os de altos níveis são gerados durante o processo de uso do combustível e, contém produtos de fissão e radionuclídeos emissores α de longa vida (ATBACK *et al.*, 1992 *apud* VENKOBACHAR *et al.*, 1995).

As soluções provenientes do 1º ciclo do reprocessamento do combustível de usinas nucleares baseado no processo Purex, contém mais de 99,7% de produtos de fissão não voláteis e o restante em actinídeos tais como o neptúnio, amerício e Cúrio e, também, o urânio e o plutônio residuais. Além disso, estão presentes o ferro, crômio, níquel, alumínio, zircônio e magnésio, materiais provenientes da corrosão dos equipamentos de processo e de revestimento do elemento combustível durante a dissolução do mesmo. Esse efluente líquido caracterizado pelo alto nível de radioatividade gama, alta liberação de calor e presença de nuclídeos emissores alfa de meia-vida longa é classificado como rejeito líquido de alta atividade (HLLW- High Level Liquid Waste) e contém mais de 95% da radioatividade total do combustível irradiado (YAMAURA, 1999).

Hospitais, clínicas, indústrias, institutos ou centros de pesquisa também geram rejeitos radioativos, embora, em termos de volume e peso de material, todo

setor nuclear produza muito menos rejeito do que outras atividades industriais ou não industriais (MOURA, 2008).

A Agência Internacional de Energia Atômica define rejeito radioativo como “material que contém ou que está contaminado com radionuclídeos em concentrações ou níveis de atividade maiores que os limites de isenção estabelecidos pela autoridade competente” (IAEA, 1988). No Brasil, a Comissão Nacional de Energia Nuclear define rejeito radioativo como: “qualquer material resultante de atividades humanas, que contenha radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de isenção especificados na Norma CNEN-NE-6.02 – Licenciamento de Instalações Radioativas, e para o qual a reutilização é imprópria ou não prevista” (CNEN, 1985). Esta norma ainda estabelece os critérios de classificação dos rejeitos que são baseados no estado físico, na natureza da radiação, na concentração e na taxa de exposição (CNEN, 1985). Considerando estes critérios, os rejeitos são subdivididos de acordo com os níveis de radiação, sendo, desta maneira, classificados como rejeitos de nível baixo, médio ou alto.

O acúmulo de rejeitos radioativos é uma grande preocupação, no que diz respeito à sua disposição. A maioria dos resíduos radioativos é gerada no funcionamento dos reatores nucleares, instalações de produção/enriquecimento de combustível e instalações de reprocessamento de combustível. Além disso, os laboratórios de radioquímica envolvidos em trabalhos de pesquisa e controle de qualidade geram resíduos radiotóxicos. Os resíduos aquosos gerados contêm diversas impurezas iônicas com componentes metálicos radiotóxicos (DAS *et al.*, 2002).

3.3 Gerenciamento de rejeitos radioativos

A gerência de rejeitos radioativos compreende o conjunto de atividades relativas ao rejeito, seja administrativo ou operacional, que corresponde às etapas de coleta, segregação, pré-tratamento, acondicionamento, armazenagem temporária, transporte e deposição final. Cabe à gerência zelar por estes rejeitos enquanto considerados fonte potencial de perigo. A redução do volume e o acondicionamento são duas etapas importantes da gerência porque estão

relacionadas ao custo de armazenamento e segurança física e radiológica (MARUMO, 2006).

A estratégia de gerenciamento de rejeitos, prevê a separação de radionuclídeos de longa vida e sua transmutação para os de curta vida de modo a reduzir o risco potencial e o custo da construção de repositórios. Um grande volume de resíduos e de concentração muito baixa de metais (de 2 a 50 mg.dm⁻³) restrito a viabilidade dos processos de separação convencionais que são caros e elaborados, requer equipamentos caros e de operação de alto custo, além de energia (DAS, *et al.*, 2002).

3.4 Mecanismos de remoção de metais pesados

3.4.1 Biossorção

O termo biossorção é usado para descrever a remoção de metais pesados e/ou radionuclídeos independente da atividade metabólica celular e, portanto, passiva. A descoberta e o desenvolvimento da biossorção fornecem base para uma tecnologia que visa a retirada de metais pesados de soluções com concentrações metálicas diluídas no intervalo de 1 a 100 mg/L (VOLESKY e CHONG, 1995). É um processo no qual se utiliza sólidos de origem vegetal ou micro-organismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido (COSSICH *et al.*, 2000).

O estudo de Adams e Holmes em 1935 (*apud* VOLESKY e HOLAN, 1995) representa não somente o limiar da troca iônica na química, como também uma tentativa inicial de biossorção. Estes autores descreveram a remoção de íons de cálcio e magnésio pela resina de tanino da casca de acácia-negra (*Acácia mollissima*).

Os primeiros estudos sobre biossorção foram realizados no início da década de 80 por Volesky e Tsezos quando pesquisaram sobre a biossorção do urânio e tório (VOLESKY, 2007).

Recentemente, a tecnologia da biossorção tem sido reconhecida como atrativa para a remoção de metais pesados e degradação de compostos químicos orgânicos presentes em rejeitos líquidos. De fato, no início dos anos 50 houve

algumas tentativas de acumular metais preciosos, tais como ouro, prata e cobre por diversos micro-organismos. Mas, somente a partir década 80 que houve um crescente interesse na remoção de materiais nocivos e tóxicos presentes em águas residuais para proteção ambiental (TSEZOS, 1988 *apud* LIU *et al.*, 2003).

As primeiras referências ao mecanismo de bio sorção foram citadas por Rothstein *et al.* em 1948, eles apresentaram evidências de que o urânio age sobre a superfície celular de leveduras “por complexação de grupos desconhecidos associados ao metabolismo de glucose” (VOLESKY, 1990).

O conceito de bio sorção foi usado em 1949 por Ruchhoft que obteve a remoção de ^{239}Pu em água por lodo ativado, com cerca de 60% remoção, usando uma única fase de tratamento (VOLESKY, 1990).

No início do ano de 1986, em uma reunião organizada pela Solvent Engineering Extration and Íon Exchange Group of the Society of Chemical Industry no Reino Unido, a bio sorção foi reconhecida como uma tecnologia emergente.

Foi somente na década de 90 que a bio sorção surge como uma nova área científica que poderia auxiliar a recuperar metais pesados e considerada como um candidato ideal para tratamento de grandes volumes de baixas concentrações de rejeitos líquidos complexos (VEGLIO *et al.*, 1997; VOLESKY, 1990).

A pesquisa sobre bio sorção tem como foco os três principais campos: os bio sorventes, os mecanismos de bio sorção e a sua aplicação em larga escala.

Os primeiros relatos descreveram os bio sorventes como abundantes materiais biológicos que poderiam ser utilizados para remover até pequenas quantidades de metais pesados de efluentes industriais, a muito baixo custo (VIEIRA e VOLESKY, 2000), dentre eles, estão os diversos materiais naturais ou de origem biológica, incluindo bactérias, fungos, leveduras, algas, e outros.

O uso de micro-organismos inativos torna-se uma vantagem em relação ao uso de micro-organismos vivos, uma vez que não sofrem limitações devido à toxicidade do meio e não requerem renovação do meio de cultura (KIRAN *et al.*, 2005). Esses bio sorventes possuem a propriedade de sequestrar metais e reduzir a concentração de íons de metal presentes em soluções de baixas concentrações, porém, é necessário continuar pesquisando os tipos mais promissores de biomassa de uma variedade extremamente grande que possa ser

prontamente avaliado e biomateriais de baixo custo (KRATOCHVIL e VOLESKY, 1998).

O mecanismo de bioissorção não é completamente compreendido. É necessário identificar o mecanismo de remoção dos metais pelos bioissorventes e entender a interação metal-bioissorvente.

Embora a bioissorção seja uma técnica potencialmente comprovada para a remoção de metais de soluções aquosas em escala laboratorial, sua performance sob condições industriais reais, ainda é um desafio (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de melhorar o processo de bioissorção, incluindo imobilização de biomateriais, melhoramento, reuso e otimização do processo de bioissorção (WANG e CHEN, 2006).

Em relação aos bioissorventes, alguns biomateriais com alta capacidade de se ligarem a metais, têm sido identificados. Entre eles, algas marinhas (ex. *Sargassum natans*), bactérias (ex. *Bacillus subtilis*), fungos (ex. *Rhizopus arrhizus*), leveduras (ex. *Saccharomyces cerevisiae*) e biomassa microbiana originada de rejeitos de indústrias alimentícias. Por razões econômicas, os pesquisadores têm dedicado muita atenção a vários subprodutos da indústria de fermentação porque sua produção ocorre em larga escala. A aplicação de micro-organismos presentes nestes rejeitos como bioissorventes para bioissorção de metais pesados e radionuclídeos apresentaria vantagem dupla, pois utiliza resíduos para tratar resíduos (WANG e CHEN, 2006).

A bioissorção de metais é baseada em mais de um mecanismo. Ela consiste de vários mecanismos que diferem quantitativa e qualitativamente de acordo com as espécies usadas, a origem da biomassa e até mesmo o seu processamento. Segundo Kapoor e Viraraghavan (1995), o sequestro de íons metálicos pelas paredes celulares ocorre por meio de dois mecanismos, um pela ligação direta nos grupos funcionais e o outro, pela interação físico-química, troca iônica e sorção química, pelo fenômeno conhecido por adsorção. Enquanto que a quelação e a adsorção dependem de processos físico-químicos entre os íons metálicos e os grupos funcionais da superfície da célula, a acumulação intracelular é associada a uma etapa não metabólica de bioissorção dos íons metálicos pelos sítios ligantes da estrutura celular e, outra, na qual estes íons passam pela membrana celular através de ciclos metabólicos celulares e,

portanto é um processo mais lento e que necessita de células viáveis (MALIK, 2004).

Existem diversos grupos funcionais que poderiam atrair e reter metais na biomassa: grupos de acetamido da quitina, polissacarídeos estruturais de fungos, grupos amino e fosfato em ácidos nucléicos, amido, sulfidril e carboxil em proteínas, grupos hidroxil em polissacarídeos, e principalmente carboxil e sulfatos em polissacarídeos de algas marinhas. Entretanto, a presença de alguns grupos funcionais não garante sua acessibilidade aos metais pesados ou radionuclídeos (VOLESKY e HOLAN, 1995).

As paredes das bactérias, algas e fungos são eficientes bioissorventes metálicos. Em muitos casos, a ligação inicial pode ser seguida pela deposição inorgânica de quantidades crescentes de metais. A bioissorção pode envolver ligações iônicas e covalentes, com constituintes como proteínas e polissacarídeos. As variações na composição das paredes celulares das células dos micro-organismos podem sofrer influências das condições de cultura, resultando em variações consideráveis na capacidade bioisortiva e permitir algum grau de acumulação seletiva (GADD, 1990).

Os mecanismos pelos quais micro-organismos removem metais de solução são: acumulação extracelular/precipitação; sorção na superfície celular ou complexação e acumulação intracelular.

Existem basicamente duas categorias de rejeitos industriais líquidos que requerem tratamento prévio para descarte: aqueles que contêm grandes volumes de baixas concentrações ($< 100 \text{ mg.l}^{-1}$) e os que possuem pequenos volumes de altas concentrações de totais de sólidos dissolvidos. Para o primeiro caso, uma alta afinidade do bioissorvente com o contaminante torna-se obrigatória, enquanto que no último caso, o bioissorvente requer alta capacidade de captação (ATKINSON e KASAN, 1998).

Poucos são os exemplos de bioissorventes comercialmente utilizados. Um deles, é o processo desenvolvido pela AMT-BioclainTM, o qual utiliza bactérias *Bacillus subtilis* tratadas com solução cáustica forte, lavadas e imobilizadas em esferas porosas de polietilenoimina e glutaraldeído. Este bioissorvente comercial é capaz de acumular ouro, cádmio e zinco de soluções e também poderia ser adequado para muitas operações que utilizam metais (BRIERLEY, 1990 *apud* VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

O AlgaSORBTM, é outro bioissorvente comercial feito com algas (*C. vulgaris*) inativas e imobilizadas em matriz de sílica em gel, que reduz os níveis de cádmio e mercúrio a níveis abaixo dos especificados para padrões de água potável (ATKINSON e KASAN, 1998).

Dois outros bioissorventes comerciais são: MetaGene^R e RAHCO Bio-Beads, têm mostrado efetiva remoção de íons de metais pesados quando aplicados em galvanoplastia e resíduos de fluxos de mineração, embora haja pouca informação sobre a aplicação industrial de ambos (ATKINSON e KASAN, 1998).

O bioissorvente BIO-FIX é composto por uma variedade de biomassas, incluindo bactérias, fungos, musgos e algas, imobilizados em polissulfona de alta densidade. Este bioissorvente exibe seletividade de metais pesados tóxicos sobre metais alcalinos terrosos (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

Atkinson e Kasan (1998) e Arief *et al.* (2008), relacionaram questões que deveriam ser consideradas para a viabilidade do potencial de um bioissorvente para a remoção de metais de efluentes industriais. Eles incluem as características dos efluentes, tais como volume, tipo de contaminante e competitividade de íons, solução química, ajuste de pH e temperatura; características da biomassa, tais como disponibilidade, estabilidade mecânica, habilidade de regeneração, especificidade do contaminante e cinética da reação; e características do processo, tais como capital e custos de operação, batelada/fluxo contínuo e espaço necessário.

O sucesso da tecnologia de bioissorção não depende apenas do potencial de bioissorção, mas também do suprimento contínuo da biomassa para o processo (TSEZOS, 2001).

Para que a bioissorção seja aplicada em escala industrial, é necessário que a biomassa tenha um custo atrativo.

Bioissorventes econômicos, em larga escala, podem ser definidos como materiais que são abundantes na natureza ou que podem ser encontrados como subprodutos ou resíduos industriais e que normalmente não requerem pré-tratamento (ARIEF, *et al.*, 2008).

A bioissorção é uma alternativa para a remoção de íons de metais pesados, aos métodos existentes, de baixo custo e a biomassa disponível naturalmente, pode ser utilizada (SHEKHAR *et al.*, 2003).

3.4.2 Bioacumulação

Os micro-organismos se adaptaram a viver em praticamente todos os ambientes aquáticos e terrestres encontrados na Terra, incluindo os ambientes contaminados com radioatividade, e por este motivo, têm o potencial de interagir com uma ampla gama de materiais radioativos (tanto em solução quanto em fases insolúveis) através da produção de uma variedade de metabólitos e biomoléculas. Tais interações podem alterar significativamente a composição química de radionuclídeos e assim seu impacto no meio ambiente (RENSHAW *et al.*, 2007).

A bioacumulação caracteriza-se pela acumulação ativa de metais por células vivas. Este processo é dependente da atividade metabólica da célula, a qual pode ser significativamente afetada pela presença de íons metálicos. A tolerância aos metais deve refletir a habilidade de um organismo sobreviver em ambientes com altas concentrações de metais ou de acumular metais sem resultar em sua morte (VOLESKY, 1990).

A bioacumulação de pesticidas e outras substâncias químicas em organismos aquáticos obteve atenção na década de 60. Resíduos de DDT (diclorodifeniltricloroetano), DDD (diclorodifenildicloroetano), DDE (diclorodifenildicloroetileno) e metilmercúrio foram encontrados em peixes e aves aquáticas (BEEK, 2000).

A acumulação seletiva de metais pesados por micro-organismos é determinada pela competição inter iônica, e a quantidade total de íons adsorvidos por diferentes células microbianas difere muito de espécie para espécie (NAKAJIMA & SAKAGUCHI, 1986).

A bioacumulação tem sido tradicionalmente melhor estudada por microbiologistas devido à sua importância toxicológica, e tem sido menos utilizada em processos de eventual recuperação de metais porque a bioacumulação requer a utilização de células metabolicamente ativas (VOLESKY, 1990).

O uso de biomassa microbiana com a finalidade de detoxificação de efluentes industriais para proteção ambiental e recuperação de metais valiosos

por meio da bio sorção disponibiliza uma tecnologia alternativa potencial (GADD, 2000 e LLOYD, 2003).

Nos rejeitos radioativos, a microbiologia começou com a constatação de que os micróbios podem existir em formações relevantes para os repositórios de rejeitos e que os efeitos da atividade microbiana poderiam ter influências profundas na contenção dos rejeitos (WEST *et al.*, 2002 *apud* MERROUN e SALENSKA-POBELL, 2008).

Os micro-organismos podem potencialmente afetar a migração de radionuclídeos por vários processos, sendo capazes de precipitar metais e radionuclídeos com carbonatos e hidróxidos por alcalinização localizada na superfície celular (MERROUN e SALENSKA-POBELL, 2008).

No mecanismo de bioacumulação muitos micro-organismos efetivamente ligam-se a íons metálicos perigosos e potencialmente tóxicos. Dois principais mecanismos de remoção de íons metálicos são reconhecidos. O primeiro mecanismo envolve a ligação que ocorre na superfície da membrana celular sem gasto de energia. No segundo, os íons metálicos podem entrar na célula através da membrana e participar das vias bioquímicas. A superfície de ligação de íons metálicos é muito importante e geralmente representa a principal fonte de ligação de íons metálicos (GADD *et al.*, 1985 *apud* AL-SARAJ *et al.*, 1999). Isto é possível devido à abundância de sítios de ligação como membranas compostas principalmente de proteínas, lipídios e polissacarídeos, que são ricas em sítios de ligação de íons metálicos como carboxilatos, aminas, amidas, hidroxilas, fosfatos, tióis bem como outros (AL-SARAJ *et al.*, 1999; SAR *et al.*, 2004; KADUKOVÁ, 2005; VELÁSQUEZ e DUSSAN, 2009; CHOJNACKA, 2010).

A parede celular é considerada um complexo trocador de íons, assim como uma resina. A capacidade de troca iônica varia de acordo com a da presença de grupos funcionais e da estrutura espacial da própria parede celular. Dentre os principais grupos funcionais responsáveis por mecanismos de captação de metais, pode-se citar a carboxila, o grupo amino, sulfato e fosfato, que são responsáveis pela captação de cátions metálicos, tanto pela atração eletrostática quanto pela formação de ligações dipolo-dipolo. Portanto, essa interação pode ser particularmente pronunciada no caso de íons metálicos devido às características aniônicas da parede celular (APARÍCIO, 2000; VEGLIÓ *et al.*, 1997).

Os mecanismos de transporte envolvidos na acumulação de metais pesados são pouco conhecidos. Uma das suposições seria a de que os metais pesados podem ser captados pelos sistemas de transporte de metais essenciais para o desenvolvimento microbiano (GADD, 1988). Uma vez dentro da célula, os íons metálicos podem se localizar em organelas, ou podem estar ligados a proteínas, deslocando os íons de suas posições adequadas, prejudicando as funções metabólicas (GADD, 1992).

3.5 Biossorção vs Bioacumulação

Dos diferentes métodos biológicos, a bioacumulação e a biossorção têm demonstrado possuir bom potencial para substituir métodos convencionais para absorção de metais/tintas (VOLESKY e HOLAN, 1995).

É possível encontrar contradições na literatura quanto ao uso dos termos biossorção e bioacumulação. Entretanto, a bioacumulação pode ser entendida como um processo em que se utiliza biomassa viva, enquanto na biossorção, utiliza-se biomassa inativa. A bioacumulação pode ser definida como absorção de substâncias tóxicas por células vivas. As substâncias tóxicas podem ser transportadas dentro das células, através da membrana celular ou do ciclo metabólico das células (MALIK, 2004). Ao contrário, a biossorção pode ser definida como absorção passiva de substâncias tóxicas por materiais biológicos inativos, ou ainda, por materiais derivados de fontes biológicas. A biossorção se deve a numerosos processos independentes do metabolismo que essencialmente ocorrem na parede celular, onde os mecanismos responsáveis pela captação dos poluentes serão diferentes, de acordo com o tipo de biomassa (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008). A tabela 1 apresenta as principais diferenças entre a biossorção e bioacumulação.

Tabela 1. Comparação entre bioissorção e bioacumulação.

Fatores	Bioissorção	Bioacumulação
Custo	Normalmente baixo. Muitos bioissorventes são biomassas resultantes de resíduos industriais ou de agricultura. Custo envolve o transporte ou alterações de processos.	Geralmente alto. O processo envolve células vivas e o custo da manutenção das células vivas.
pH	O pH influencia fortemente a capacidade de absorção da biomassa.	As células vivas em si são fortemente afetadas sob condições extremas de pH.
Temperatura	Possível melhora da absorção com o aumento da temperatura.	A temperatura afeta severamente o processo.
Manutenção/armazenamento	Fácil de armazenar e usar.	Energia metabólica externa é necessária para a manutenção da cultura.
Seletividade	Pobres, a seletividade pode ser melhorada pela ativação da biomassa.	Melhor que na bioissorção.
Versatilidade	Razoavelmente bom. Os sítios de ligação podem acomodar uma variedade de íons.	Não muito flexível. Propenso a ser afetado pelas altas concentrações de metais/sais.
Grau de absorção.	Muito alto. Algumas biomassas absorvem uma quantidade de substância tóxica quase tão elevado como o seu peso seco.	São sensíveis a altas concentrações de substâncias tóxicas e a remoção é geralmente baixa.
		continua

Fatores	Biossorção	Bioacumulação
Taxa de absorção	Geralmente rápida.	Geralmente mais lenta que a biossorção, pois a acumulação intracelular é morosa.
Regeneração e reuso.	Alta possibilidade de regeneração do biossorvente, com possível reuso ao longo de vários ciclos.	Como os metais tóxicos são acumuladas intracelularmente, as chances são muito limitadas.
Recuperação da substância tóxica.	Em muitos casos soluções ácidas ou alcalinas tornam-se meios eficientes para a recuperação das substâncias tóxicas.	A biomassa não poderá ser utilizada para o próximo ciclo.
Imobilização	É possível utilizar a biomassa em estruturas sólidas.	Não é possível imobilizar a biomassa viva.
Reversibilidade	Possível.	Parcialmente reversível.
Velocidade	Rápida.	Lenta.
Número de estágios.	Estágio único (só biossorção)	Estágio duplo (biossorção + bioacumulação)
Ligação do metal	Os metais se ligam na superfície celular.	Os metais se ligam na superfície celular e em seu interior.

Adaptação de (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008 ; CHOJNACKA, 2010)

3.6 Biossorventes

Em geral todos os tipos de biomateriais, tais como bactérias, fungos, algas, resíduos industriais e da agricultura e outros polissacarídeos têm mostrado boa capacidade de biossorção para todos os tipos de íons metálicos (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

O estudo das interações entre os micro-organismos e os metais pesados tem despertado grande interesse da comunidade científica. Dentre os fungos, as leveduras são as mais exploradas cientificamente, pelo fato de serem organismos eucariontes de fácil manipulação, sendo consideradas um excelente modelo para o estudo de diversos problemas de relevância dentro da biologia (BROCK *et al.*, 1994). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido bastante utilizada para bioissorção de metais presentes de soluções aquosas (LIU *et al.*, 2002-b, BRADY e DUNCAN; 1984; BAYAN *et al.*, 2001; ADAMIS *et al.*, 2003; EIDE, 1998; GOMES *et al.*, 2006; KEDARI *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2008; VOLESKY, 1994; VOLESKY e MAY-PHILLIPS, 1995).

A técnica de imobilização é um dos elementos chave para a aplicação prática da bioissorção, especialmente por biomassa inativada. Vários tipos de materiais de imobilização para *Saccharomyces cerevisiae* têm sido estudados (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997), como por exemplo, géis de alginato de cálcio (MEENA e RAJA, 2006; BUSTARD e MCHALE, 1997; WANG e CHEN, 2006; LIU *et al.*, 2003).

O alginato, biopolímero disponível comercialmente, há muito usado na indústria para diversas finalidades e, mais recentemente na imobilização de células (MARTINSEN *et al.*, 1991), tem sido também estudado como bioissorvente na remoção de íons de metais e radionuclídeos (GOMES *et al.*, 2006; BANERJEE e NAYAK, 2007; IBÁÑEZ e UMETSU, 2002; MIMURA *et al.*, 2001; MIMURA *et al.*, 2002; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2006; GOK e AYTAS, 2009).

O emprego de biomassa bacteriana para remoção de metais no tratamento de efluentes é uma perspectiva sugerida por muitos pesquisadores que estudam a interação das bactérias com os metais. A relevância dessas interações nos ciclos geoquímicos é amplamente reconhecida, pois as bactérias podem afetar muito a mobilidade dos metais por diversos mecanismos como solubilizações e precipitações (EHRlich, 1990 *apud* VECCHIO, 1998).

3.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae são fungos unicelulares eucarióticos com capacidade de bioissorção conferida pelos componentes celulares (BREIEROVÁ

et al. 2002) e, segundo Brady e Duncan (1984), pela parede celular, o que conferiria um sítio adicional em relação a outros organismos desprovidos de parede celular.

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é uma estrutura elástica que proporciona proteção osmótica e física e determina a forma da célula. A camada interna da parede é, em grande parte, responsável pela resistência mecânica da parede e também fornece os locais de ligação para as proteínas que formam a camada exterior da parede. A camada externa de proteína também limita a permeabilidade da parede celular, protegendo a membrana plasmática de um ataque por enzimas de membrana externa e compostos perturbadores. As principais características da organização molecular da parede celular de levedura são conhecidas. É importante salientar que a composição e organização molecular da parede celular podem variar consideravelmente. Por exemplo, a incorporação de muitas proteínas da parede celular é temporal e especialmente controlada e depende fortemente das condições ambientais. Do mesmo modo, a formação de proteínas específicas na parede celular de polissacarídeos complexos é fortemente afetada por condições externas (KLIS *et al.*, 2002).

A *Saccharomyces cerevisiae* é facilmente cultivada em larga escala, esta levedura cresce sem técnicas sofisticadas e o meio de cultura não é de alto custo (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995).

A biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser obtida em indústrias de bebidas e alimentos. É um subproduto da indústria de fermentação e, portanto, pode ser obtida facilmente se comparada com outras biomassas microbianas. Micro-organismos utilizados na indústria enzimática e na indústria farmacêutica, estão geralmente envolvidos em seus segredos de produção industrial, o que faz com que as indústrias relutem em disponibilizar os resíduos de biomassa microbiana da produção. (WANG e CHEN, 2006)

Saccharomyces cerevisiae, é considerado o modelo preferido para estudos de estresse em células eucarióticas. É um organismo útil para a identificação de mecanismos moleculares que controlam a sensibilidade a metais. A utilização de organismos inferiores, como as células de levedura, como sistemas modelo é particularmente atraente, devido à facilidade de manipulação genética, disponibilidade da sequência do genoma completo da *Saccharomyces cerevisiae*

e a aparente conservação dos mecanismos moleculares entre leveduras e células humanas (ADAMIS *et al.*, 2003).

Entre os diferentes tipos de biomassa disponível, as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* constituem boa alternativa de tratamento rejeitos líquidos, principalmente porque é geralmente reconhecida como um micro-organismo seguro e pode ser usado sem preocupação, tem capacidade para acumular uma vasta gama de metais pesados em uma variedade de condições externas (VOLESKY e MAY-PHILLIPS, 1995; WANG e CHEN, 2006). Adamis *et al.* (2003) estudaram a remoção de Cd em solução aquosa com concentração inicial de 10 µg/mL e obtiveram 97% de remoção em 24 horas de contato.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo ideal para decifrar o mecanismo e regulação do transporte de íons metálicos. Estudos recentes de levedura mostraram que a acumulação de qualquer íon metálico único é mediada por dois ou mais substratos de sistemas de transporte específicos (EIDE, 1998).

3.6.2 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um copolímero linear obtido a partir da extração do ácido algínico encontrado em algas marrons e algumas bactérias, utilizando-se álcali diluído (LIMA, 2006).

Os alginatos, sais de copolímeros não ramificados de ligações 1→4 de ácido β-D- manurônico e ácido α-L-gulurônico, (figura 2) são polissacarídeos de origem principalmente algal (constituindo até cerca de 40% do peso seco de algas marrons)(ÖNAL *et al.*, 2007, LIMA, 2006; MIMURA *et al.*, 2001). Entre suas características principais está a de formar géis termicamente irreversíveis com a maioria dos cátions bivalentes, com exceção do magnésio (TEIXEIRA e ARAÚJO, 1996; NAYAK e LAHIRI, 2005).

Figura 2. Estrutura e disposição alternadas dos blocos de M e G ao longo da cadeia de alginato. Fonte: LIMA, 2006.

Quando uma solução de alginato de sódio é gotejada numa solução contendo íons metálicos bivalentes, são formadas esferas de alginato de cátions insolúveis em água. O cálcio é o cátion mais utilizado na preparação de esferas para uma ampla aplicação: principalmente para imobilizar células que são utilizadas em biocatalisadores ou para imobilizar biomoléculas como pesticidas, drogas, e outras (VELINGS e MESTDAGH, 1995; IBÁÑEZ e UMETSU, 2004). Após a formação das esferas de alginato com íons de cálcio, a estrutura particular deste biopolímero deixa livre grupos carboxílicos que reagem com os íons metálicos (IBÁÑEZ e UMETSU, 2002).

Os íons metálicos interagem com as regiões dos blocos G, assim, os íons de cálcio ficam ligados à cadeia de polissacarídeo, como se fosse uma caixa de ovos, o chamado modelo “egg-box”. (Figura 3)

Figura 3. Modelo “egg-box” proposto para o alginato de sódio. Fonte: LIMA, 2006.

O fator que controla a formação de um gel é a quantidade de blocos G presentes no alginato de sódio e também a concentração de íons de cálcio adicionados à solução. Assim, existe uma classificação dos alginatos ricos em blocos G ou M, dependendo da espécie de alga da qual foi obtido (LIMA, 2006).

O alginato apresenta vantagens sobre outros materiais, como biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, presença de grupos carboxílicos e origem natural (KAÇAR *et al.*, 2002; NAYAK e LAHINI, 2005; GOK e AYTAS, 2009).

A presença de grupos carboxílicos na sua estrutura favorece a ligação com íons metálicos e por este motivo, os alginatos em forma de esferas têm sido estudados para a remoção de metais presentes em soluções aquosas em baixas concentrações (MIMURA *et al.*, 2001; MIMURA *et al.*, 2002; IBÁÑEZ e UMETSU, 2004; NAYAK e LAHIRI, 2005; GOK e AYTAS, 2009).

O alginato pode ser utilizado como adsorvente para a remoção de metais e também de radionuclídeos presentes em rejeitos líquidos (MIMURA *et al.*, 2001 e MIMURA e AKIBA, 2002; VEGLIÓ *et al.*, 2002; ÖNAL *et al.*, 2007; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2008).

Banerjee *et al.* (2007), estudaram a capacidade da biossorção de Cu, Zn, Ga, Ge e As por micro esferas de alginato de cálcio e constataram que a remoção é melhor em pH 4 para todos os metais estudados, exceto para o Ge, que é removido até 100% em pH 7 em 6 horas de contato. Göksungur *et al.* (2003) estudaram a biossorção do Cu^{2+} em solução aquosa de concentração inicial de 10-50 mg/mL com pH 4 e obtiveram 100% de remoção para as maiores concentrações entre 30 e 60 minutos.

O alginato de cálcio tem sido utilizado como matriz de imobilização de células microbianas através da técnica de aprisionamento (KAÇAR *et al.*, 2002). A imobilização serve para melhorar as características físicas da biomassa para uso em reatores, permite a reutilização das substâncias (VOLESKY, 1990) e facilita o processo de separação das células do rejeito líquido (DAS *et al.*, 2002).

Existem quatro formas de imobilização (figura 4), imobilização na superfície de um carreador sólido por ligação covalente, aprisionamento em matriz porosa, agregação celular obtida por floculação natural e retenção celular entre membranas micro porosas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

a) Imobilização na superfície de um carreador sólido por ligação covalente.

b) Aprisionamento em matriz porosa.

c) Agregação celular obtida por floculação natural

d) Retenção celular entre membranas microporosas.

Figura 4. Métodos básicos de imobilização celular. Adaptado de Kourkoutas *et al.*, 2004.

O alginato de cálcio na forma de esferas (figura 5) é utilizado para encapsular células a serem utilizadas como biocatalisadores (OLIVEIRA, 2006).

Figura 5 – Micro esferas de alginato de cálcio com células de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas.

3.6.3 Bactérias

As bactérias são seres unicelulares procariontes, com grande variedade de tipos morfológicos e fisiológicos. Algumas bactérias podem ser diferenciadas pelo uso do método de coloração Gram (figura 6). A linhagem Gram-positiva contém espécies que apresentam filogenia e estrutura de parede celular em comum (MADIGAN *et al*, 2008).

Figura 6: Composição da superfície celular de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Fonte: (WANG, 2009).

A parede celular das bactérias fornece a integridade estrutural da célula, mas distingue-se de todos os outros organismos, devido à presença de peptidoglicano (poli-N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico), que está localizado imediatamente fora da membrana citoplasmática. O peptidoglicano é responsável pela rigidez da parede celular bacteriana e determina a forma da célula. Também é relativamente poroso e considerado como uma barreira impermeável a substratos de pequeno porte. As paredes celulares de todas as bactérias não são idênticas. Na verdade, a composição da parede celular é um dos fatores mais importantes na análise e diferenciação de espécies bacterianas. Assim, dois tipos gerais de bactérias existem: as Gram-positivas que são

compostas por uma camada espessa de peptidoglicano (cerca de 90%) e, as Gram-negativas, que possuem uma camada de peptidoglicano mais fina (entre 10 e 20%), figura 6, além disso, a parede celular contém uma membrana externa adicional formada de fosfolípídeos e lipopolissacarídeos (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

3.6.3.1 *Bacillus subtilis*

A *Bacillus subtilis* (figura 7) é uma bactéria Gram-positiva, habitante natural do solo, produtora de antibióticos, enzimas e fito-hormônios que proporcionam benefícios para as plantas. Essa espécie microbiana é também descrita como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (RPCP) (ARAÚJO, 2008).

Figura 7. *Bacillus subtilis* Fonte: MADIGAN, 2008.

Nas últimas décadas, foram encontradas diversas aplicações de *Bacillus subtilis*, incluindo produção industrial de proteases, preparação de alimentos por fermentação alcalina e como produto probiótico para prevenção de infecções entéricas tanto em humanos quanto em animais. O conhecimento da fisiologia e da genética do *Bacillus subtilis*, associado ao desenvolvimento de ferramentas genéticas tem trazido maior interesse para se fazer modificações genéticas com objetivos diversos. Seus esporos podem permanecer dormentes e viáveis por longos períodos de tempo, talvez por milhões de anos (PACCEZ *et al.*, 2007).

A parede da bactéria *Bacillus subtilis*, como as de outras bactérias Gram-positivas é composta principalmente uma espessa camada de peptidoglicano que apresenta grupos carboxílicos de ácido teicóico associados (figura 8) (COSTA e DUTA, 2001).

Figura 8. Diagrama da parede celular da bactéria *Bacillus subtilis*. Fonte: MADIGAN, 2008.

A elucidação dos sítios ativos de ligação da parede da *Bacillus subtilis* revelou a contribuição dos grupos carboxila, amina, hidroxila e fosforila. O grupo amina é positivamente carregado e deve estar envolvido à ligação com ânions, tais como silicatos, os demais grupos são negativamente carregados e, portanto, devem estar relacionados a ligação com cátions (HUANG, 2002).

Existem diversos estudos da aplicação de *Bacillus subtilis* na remoção de metais como cobre, prata zinco e cádmio (COSTA e DUTA, 2001), magnésio, cobre, ferro, sódio, potássio, manganês, zinco, cálcio, ouro, níquel, mercúrio, estrôncio, chumbo, prata, cobalto, lítio, bário e alumínio (BEVERIDGE e MURRAY, 1976).

3.6.3.2 *Cupriavidus metallidurans*

Cupriavidus metallidurans (figura 9) é uma β -proteobactéria, Gram-negativa, não patogênica, capaz de crescer em elevadas concentrações de, pelo menos, treze diferentes íons de metais pesados (MONCHY *et al.*, 2006; MERGEAY *et al.*, 2003). *Cupriavidus* (ex. *Ralstonia*) *metallidurans* CH34 é uma bactéria hidrogenotrófica facultativa resistente a metais, bactéria isolada do lodo de um tanque de decantação de zinco na Bélgica, que foi contaminado com altas concentrações de vários metais pesados (MONCHY *et al.*, 2007).

Esta bactéria tem ganhado interesse crescente como um organismo modelo para detoxificação de metais pesados e para fins biotecnológicos. A resistência da bactéria aos cátions de metais de transição é predominantemente baseada na resistência devida aos genes para RND (resistência, a nodulação e a família de proteínas de células de divisão) proteínas (ROZYCKI e NIES, 2009).

Estão relatadas na literatura resistências da bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34 a arsenito (AsO_4^{3-}), bismuto (Bi^{+3}), gadolínio (Gd^{+3}), ouro (Au^+), prata (Ag^+), selenito (SeO_3^{2-}), tálio (Tl^+) e urânio (U^{+2}), entretanto, a maioria dos mecanismos ainda não está totalmente esclarecida (BIONDO, 2008).

Na bactéria *Cupriavidus metallidurans* foram identificados os genes envolvidos na resistência aos metais pesados Co (II), Cr (VI), Hg (II) e Ni (II) que estão concentradas em uma região de 34 kb no plasmídeo pMOL28, e os genes envolvidos na resistência a Ag (I), Cd (II), Co (II), Cu (II), Hg (II), Pb (II) e Zn (II) ocorrem em uma região de 132 kb do plasmídeo pMOL30. Foram identificadas três supostas ilhas genômicas operons contendo resistência a metais, ladeados por elementos genéticos móveis, um em pMOL28 e dois no pMOL30 (MONCH, 2007).

Figura 9 – *Cupriavidus metallidurans*. Fonte: BIONDO, 2008.

3.6.3.3 *Ochrobactrum anthropi*

A bactéria *Ochrobactrum anthropi* (figura 10) é um bacilo Gram-negativo, classificado como *Achromobacter* e atualmente reconhecido como pertencente ao gênero *Ochrobactrum*. Este organismo tem distribuição ambiental ampla, sendo encontrado na água, no solo, em plantas, entre outros ambientes. Embora seja considerado um agente patogênico oportunista em pacientes imunocomprometidos, é crescente o reconhecimento de que seja um agente causal de hospedeiros saudáveis (OZDEMIR *et al.*, 2006).

Cepas *Ochrobactrum* apresentam interesse particular para biorremediação. São capazes de degradar pesticidas organofosforados, solventes tóxicos, resíduos de petróleo (SELEEM *et al.*, 2006) e, também são capazes de remover cromo, cádmio, cobre e outros metais tóxicos do ambiente (OZDEMIR, *et al.*, 2003, CHENG *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2008) estudaram a remoção de Cr(IV) por *Ochrobactrum anthropi* viáveis e obtiveram remoção de 95% do Cr(IV) em solução com concentração inicial de 400 mg/L⁻¹.

Ochrobactrum anthropi é uma das bactérias isoladas por Ferreira *et al.* (2009), de amostras de chorume obtido de lisímetros contendo fonte de ^{241}Am e, portanto, resistente ao ^{241}Am . Por este motivo foi uma das bactérias escolhidas para o presente estudo.

Figura 10. *Ochrobactrum anthropi*. Fonte: LI, 2008.

3.7 Biorremediação de Amerício-241

A literatura apresenta diversos estudos de remoção de ^{241}Am em solução aquosa, utilizando-se materiais biológicos, tanino (MATSUMURA, 1998), alginato de cálcio (MIMURA, 2001; MIMURA *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (DAS, 2002; KEDARI, 2001 e LIU *et al.*, 2002-b), *Rhizopus arrhizus* (LIAO *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2002-a; DHAMI *et al.*, 2004) e *Candida sp* (LOU, 2003).

Matsumura *et al.* (1998) estudaram a aplicabilidade do tanino insolúvel para o tratamento de rejeitos contendo amerício e concluíram que é aplicável a utilização do tanino para este fim, embora a cinética de adsorção encontrada tenha sido lenta. A capacidade de adsorção de ^{241}Am por tanino foi de 7×10^{-3} mmol /g.

A utilização da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada é descrita na literatura como método prático de remoção de radionuclídeos em soluções. Das *et al.* (2002), realizaram o estudo de bioadsorção de ^{241}Am com a levedura imobilizada em agentes floclulantes, e verificaram, entre outros parâmetros, os

efeitos do pH, da temperatura e do tempo de contato. Observou-se que a bio sorção do ^{239}Pu , ^{241}Am , ^{144}Ce , ^{137}Cs , $^{103,106}\text{Ru}$ e ^{90}Sr , em pH de 1-2 chegou em 95% independente do ânion, após 60 minutos e, no caso do ^{233}U , em 100 minutos de contato.

Nos estudos de bio sorção de ^{241}Am em solução aquosa por fungos Liu *et al.* (2002-a) constataram a remoção por *Rhizopus arrhizus* livres de mais de 99% do amerício presente em soluções de concentrações entre 5,6 e 111 MBq/l em 1 hora de contato em pH entre 1 e 3 com temperatura de 10 a 45°C.

Dhami *et al.* (2004), também estudaram a utilização de *Rhizopus arrhizus* livres na bio sorção de ^{241}Am em solução aquosa e concluíram que esta biomassa é um excelente e econômico biomaterial para a bio sorção de ^{241}Am em meio ácido (pH 2) com 3 horas de contato e concentração de 5676 Bq ^{241}Am /mL em HNO_3 .

Liao *et al.* (2004) utilizaram *Rhizopus arrhizus* imobilizado em alginato de cálcio para remover ^{241}Am de solução aquosa e estudaram os seguintes parâmetros: tempo de contato, pH e temperatura. Em 2 horas de contato, mais de 97% do ^{241}Am foi removido da solução com atividade inicial de 1,08 MBq/l com pH entre 1 e 7 e, a temperatura não teve influência no processo.

Candida sp foi utilizada como bio sorvente em estudos de bio sorção de ^{241}Am em soluções de concentrações que variavam de 5,6 a 111 MBq/l. Além da concentração inicial, outros parâmetros foram estudados, como pH, tempo de contato e temperatura. Estes estudos demonstraram que *Candida sp* removeu 98% do amerício presente nas soluções com pH 2 em 4 horas de contato, sendo que a temperatura não influenciou o processo (LOU, 2003).

Takenaka *et al.* (2007) utilizaram *Pseudomonas fluorescens* como bio sorvente e obtiveram remoção de 100% de Am-241 em solução de concentração inicial igual a 10^{-10}M em pH 2 e 3. Luk'yanova *et al.* (2007) estudaram a sorção de radionuclídeos por micro-organismos isolados de um repositório de rejeitos líquidos de baixo nível e constataram que bactérias do gênero *Pseudomonas* exibiram capacidade de remoção de 77% de Pu, 92% de Np, 76% de U, 72% de Am e, 33% de Sr. Foram usadas soluções com concentrações iniciais de $1 \times 10^{-10}\text{M}$ de ^{90}Sr , 10^{-9}M de ^{137}Cs , 6×10^{-10} de $^{238}\text{Pu(IV)}$, 10^{-9}M de ^{241}Am , 10^{-7}M de $^{233}\text{U(VI)}$ e $1,02 \times 10^{-6}$ de $^{237}\text{Np(V)}$, com pH entre 5 e 6.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas fundamentais: biossorção e bioarremocão por bactérias.

Na primeira etapa, foram utilizadas micro esferas de alginato de cálcio, células livres de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas por radiação e imobilizadas em alginato de cálcio. Na segunda etapa, foram utilizadas as bactérias *Ochrobactrum anthropi*, *Cupriavidus metallidurans* e *Bacillus subtilis*.

A avaliação do potencial de remoção de ^{241}Am por biossorção e biorremoção, foi realizada pelo método de batelada, colocando-se uma solução de ^{241}Am de concentração conhecida em contato com os biossorventes e, estudados os seguintes parâmetros: pH, tempo de contato e concentração.

Antes de serem realizados os experimentos de biorremoção com as bactérias, foram feitos os estudos de: curva de crescimento e C.I.M. (Concentração Inibitória Mínima) e viabilidade celular para dose letal 50% (DL-50).

A quantificação do ^{241}Am residual da primeira etapa, foi realizada por espectrômetro de radiação gama, marca Canberra, modelo GX2518 e, para os experimentos de biorremoção, as análises do amerício residual foram feitas em aparelho Tri-carb 2100 TR – Liquid Scintillation Analyzer da Packard-Canberra.

A determinação da viabilidade celular foi realizada em Citômetro de fluxo FACScalibur, Bencton-Dickinson.

Foram utilizados materiais básicos para o trabalho com micro-organismos como peneira Tyler 200, frascos de polietileno 220 mL, frascos de 22 mL, Erlenmeyers, Béqueres, filtro de papel, bureta, pipetas e ponteiros descartáveis, agitador magnético, espectrômetro, espectrofotômetro Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer – Pharmacia Biotech, pHmetro, balança semi-analítica, mesa agitadora marca Itasul, autoclave marca Phoenix modelo AV18, cronômetro, microscópio, pipetadores automáticos, bomba peristáltica, estufa agitadora, centrífuga, bico de Bunsen, luvas descartáveis, tubos Falcon 15 mL e 50 mL.

4.1 Biossorção

4.1.1 Biossorção por *Saccharomyces cerevisiae* livres

A *Saccharomyces cerevisiae* utilizada é da marca comercial Lassaffre, SAF Argentina. A solução de amerício é da marca Amersham. A inativação celular foi feita com radiação gama (5kGy) e, a verificação da morte celular, feita pelos testes de coloração com azul de metileno (LEE, 1981), figuras 11 e 12, e inoculação em meio sólido de YEPD (1% de Extrato de Levedura, 1% de Peptona, 2% de Dextrose e 2% de Ágar).

A concentração de biomassa aplicada na biossorção foi baseada na literatura (ITOH *et al.*, 1975; VOLESKY *et al.*, 1993; KEDARI *et al.*, 2001), ou seja, 2% de massa/volume de solução. As células livres de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas foram colocadas em frascos de polietileno contendo 60 mL de solução de amerício, ajustados os pHs para 2 e 4, utilizando-se HCl 0,1M ou NaOH 0,1 M. Os frascos foram mantidos sob agitação constante à temperatura ambiente por 30, 60, 120 e 240 minutos. As concentrações das soluções foram de 75, 150 e 300 Bq/mL. Após os tempos de contato, as soluções foram centrifugadas durante 15 minutos a 2500 giros/min., coletados 50 mL do sobrenadante e colocados em frascos de polietileno de 220 mL para contagem da radiação residual em espectrômetro de radiação gama. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A figura 11 apresenta o fluxograma dos experimentos de biossorção.

Figura 11 – Fluxograma dos experimentos de bioabsorção.

4.1.2 Bioabsorção por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em micro esferas de alginato de cálcio

Saccharomyces cerevisiae foram imobilizadas em micro esferas de alginato de cálcio, seguindo a metodologia proposta por GÖKSUNGUR *et al.* 2003.

As micro esferas foram preparadas com 100 mL de água deionizada em um Béquer e acrescentados 2 g de alginato de sódio. Após a homogeneização, foram acrescentados 2 g de células de *Saccharomyces cerevisiae* e, novamente a solução foi homogeneizada. Em outro Béquer foi preparada uma solução com 400 mL de água deionizada adicionando-se 16 g de cloreto de cálcio.

A solução de alginato de sódio com *Saccharomyces cerevisiae* foi adicionada lentamente na solução de cloreto de cálcio com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Ao final, as micro esferas foram separadas da solução de cloreto de cálcio utilizando-se uma peneira Tyler 200 e lavadas por 4 vezes com água deionizada para a remoção total dos íons de cálcio livres.

Os experimentos de bioissorção com *Saccharomyces cerevisiae* inativadas e imobilizadas em alginato de cálcio foram realizados como descrito no item 4.1, acrescentando-se em substituição à *Saccharomyces cerevisiae*, 1,2 g de micro esferas de alginato de cálcio contendo a levedura inativa.

4.1.3 Bioissorção por micro esferas de alginato de cálcio

As micro esferas de alginato de cálcio foram preparadas como descrito no item anterior, apenas sem o acréscimo de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 12).

A concentração de biomassa aplicada na bioissorção e todos os demais procedimentos foram mantidos.

Figura 12 - Fluxograma imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em micro esferas de alginato de cálcio .

4.2 Biorremocão por bactérias

4.2.1 Cultura de bactérias

Ochrobactrum anthropi

Ochrobactrum anthropi foi isolada do chorume coletado dos lisímetros montados para a realização dos experimentos de “Avaliação da contaminação provocada por pára-raios radioativos de Amerício-241” (MARUMO, 2006), por (FERREIRA *et al.*, 2009), realizados no Laboratório de Rejeitos Radioativos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/SP.

A bactéria *Ochrobactrum anthropi* foi cultivada em meio rico cérebro-coração (Difco) durante 24 horas em estufa a 37°C sob agitação constante.

Bacillus subtilis

Uma cepa de *Bacillus subtilis* foi fornecida pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e cultivada no Laboratório de Rejeitos Radioativos do IPEN/CNEN-SP, em meio rico cérebro-coração (Difco) durante 24 horas em estufa a 37°C sob agitação constante.

Cupriavidus metallidurans

Esta bactéria foi fornecida e cultivada pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A cepa de *Cupriavidus metallidurans* foi cultivada sob condições aeróbias em caldo nutriente (CN) a 28 °C, conforme especificado pela coleção de culturas, segundo Mergeay *et al.* (1985).

4.2.2 C.I.M. – Concentração Inibitória Mínima

O estudo do **C.I.M.** (Concentração Inibitória Mínima), ou **M.I.C.** ("Minimum Inhibitory Concentration") em inglês, foi realizado para as três bactérias estudadas com o objetivo de determinar a quantidade mínima de ^{241}Am capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos, seguindo a metodologia descrita em NCCLS, 2003.

Foi utilizado o método de diluições sucessivas, e todos os experimentos foram plaqueados em triplicata.

4.2.2.1 Cultura de bactérias para o C.I.M.

Para cada uma das bactérias, foi preparado um pré-inóculo em Béqueres de 250 mL de capacidade, com 100 mL de meio de cultura cérebro-coração (BHI-Brain Heart Infusion) e autoclavados. Com uma alça de platina esterilizada por flambagem de chama direta, foi inoculada uma pequena porção do micro-organismo a ser cultivado.

Os pré-inóculos foram mantidos em estufa a 37°C sob agitação constante por 24 horas e, 1 mL de cada pré-inóculo foi transferido, em condições estéreis, para Béqueres de 1000 mL de capacidade, contendo 500 mL de meio de cultura cérebro-coração previamente autoclavados. Os meios foram mantidos em estufa a 37°C sob agitação constante por 24 horas.

4.2.2.2 Preparo da solução de ^{241}Am em meio TSM

O meio mínimo TSM-Tris Médium, foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Mergeay *et al*, 1985.

Para 1L de meio líquido.

Tris.....	6,06g
MgCl ₂	0,20g
CaCl ₂	0,03g
NaCl.....	4,68g

KCl.....	1,49g
NH ₄ Cl.....	1,07g
(NH ₄) ₂ Fe citrato.....	0,005g
Na ₂ SO ₄	0,43g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	0,23 g
Gluconato.....	2,00 g
S. E. T.(1X).....	1 mL

O pH foi ajustado e a solução foi autoclavada. Em seguida foi adicionada a solução de elementos traços.

SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS (S.E.T.) 10X

HCl 25%.....	1,3 mL
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	144 mg/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O.....	100 mg/L
H ₃ BO ₃	62 mg/L
CoCl ₂ . 6H ₂ O.....	190 mg/L
CuCl ₂ . 2H ₂ O.....	17 mg/L
NiCl ₂ . 6H ₂ O.....	24 mg/L
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O.....	36 mg/L

4.2.2.3 Preparo das soluções de ²⁴¹Am para o C.I.M.

Foram preparadas soluções de ²⁴¹Am em meio mínimo TSM, com atividades de 20, 40, 80, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 800, 1000, 1200, 1400 e 1800 e 2000 Bq/mL, a partir da solução padrão de 2450,50 Bq/mL. As faixas de tolerância estudadas foram de 7×10^{-4} (20) a 6×10^{-2} (2000) μ M (Bq/mL) AmCl₃.

4.2.2.4 Experimentos de C.I.M.

Foram retirados 50 mL de cada cultura e centrifugados, o sobrenadante foi desprezado e os pellets foram ressuspensos com meio TSM. Este procedimento

foi realizado por mais duas vezes a fim de eliminar o meio de cultura. A densidade óptica (D.O.) das bactérias em meio TSM foi ajustada para 1.

Em frascos de quartzo de 22 mL de capacidade, previamente autoclavados, foram colocados 9 mL de Meio TSM (pH 7 para *Ochrobactrum anthropi* e *Bacillus subtilis* e pH 5 para *Cupriavidus metallidurans*) e, acrescentados 1 mL de TSM contendo bactérias. As diluições foram feitas até 10^{-8} de acordo com National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS, 2003).

Essas amostras foram mantidas em estufa por 24 horas sob agitação constante. Após este período, foi feito o plaqueamento e observado após 24 horas de incubação em estufa a 37°C. Os resultados dos experimentos do C.I.M. estão representados na tabela 4.

4.3 Curvas de crescimento das bactérias

Foram preparadas as culturas das três cepas bacterianas, para o estudo da curva de crescimento, do mesmo modo descrito nos experimentos de C.I.M. Para cada cepa foram feitas culturas em triplicatas.

Após a inoculação do pré-inóculo nos meios de cultura, as concentrações celulares foram estimadas densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm. A absorbância foi verificada a cada 1 hora, até 10 horas. (MADIGAN, 2008).

4.4 Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado por meio da técnica de citometria de fluxo¹. Utilizou-se rodamina 123 para detectar a viabilidade celular por meio da atividade respiratória (JEPRAS, 1995). Este teste foi realizado para confirmação

¹ A citometria de fluxo é uma técnica analítica quantitativa que fornece resultados rápidos sobre algumas características estruturais e funcionais de células e organelas em suspensão. A técnica emprega um aparelho que avalia a emissão de fluorescência das células por meio do uso da radiação laser, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes e recursos de informática (FALDYNA, 2001; WILKERSON, 2004). O funcionamento dos citômetros baseia-se na aspiração de uma suspensão de células e formação de um fluxo contínuo que passa por feixes perpendiculares de lasers. Uma vez interceptada pelo laser, fenômenos físicos ocorrem e uma parte da luz sofre dispersão, que é detectada diretamente por fotodiodos. A avaliação da dispersão da luz permite obter dados importantes como dimensões celulares, granulosidade/complexidade, morfologia e atividade respiratória. A citometria de fluxo permite análise simultânea de diversas características celulares por um grande número de eventos e, além disso, avalia concomitantemente os aspectos morfológicos, fenotípicos e funcionais, conferindo significado estatístico mesmo em fenômenos raros não detectáveis por outras metodologias (GRINDEM, 1996). Bactérias viáveis acumulam rodamina 123 e, as não viáveis não têm essa capacidade. Sob condições apropriadas elas absorvem rodamina 123 e, refletem quantitativamente a extensão da sua viabilidade (JEPRAS et al., 1995).

do C.I.M. e avaliação do processo de remoção do amerício, uma vez que a bioacumulação só ocorre com células viáveis.

4.5 Experimentos de biorremoção

Para cada experimento, em condições assépticas e, utilizando-se materiais esterilizados, uma alíquota de cada cultura de bactérias foi coletada em tubo Falcon, centrifugada por 15 minutos a 2500 giros/min. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, os pellets foram ressuspensos em meio TSM em pH 7 para *Ochrobactrum anthropi* e *Bacillus subtilis* e TSM em pH 5 para *Cupriavidus metallidurans* e centrifugados durante 15 minutos a 2500 giros/min., por duas vezes, a fim de remover o meio de cultura. Foi feito o ajuste da D.O. para 2,5.

As soluções de ^{241}Am foram preparadas com meio TSM em pH 7 e pH 5, nas concentrações 600 Bq/mL, 300 Bq/mL e 150 Bq/mL, a partir da solução padrão com atividade de 23.229,4 Bq /mL, certificado pelo IRD – Instituto de Radioproteção e Dosimetria CNEN-RJ.

Os experimentos de biorremoção foram realizados com 1,5 mL de solução de TSM contendo ^{241}Am nas concentrações desejadas e 1,5 mL de solução de TSM contendo bactérias.

As soluções foram colocadas em frascos de quartzo de 22 mL de capacidade, previamente autoclavados, em condições estéreis. Os frascos foram acondicionados em sacos plásticos, colocados dentro de frascos de polietileno e mantidos sob agitação constante, a temperatura ambiente por 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas para *Cupriavidus metallidurans*, por 2, 5, 30, 60, 120, 240, 360, 720 e 1440 min. para *Ochrobactrum anthropi* e, para os experimentos com *Bacillus subtilis*, o tempo de contato foi de 6, 12 e 24 horas.

Após os tempos de contato, as soluções foram centrifugadas a 2500 giros/min. por 15 minutos e, 1 mL do sobrenadante foi separado para análise por cintilação.

A metodologia desta etapa foi realizada com adaptações de Li *et al.*, 2008.

4.5.1 Preparo das amostras para análise

O ^{241}Am residual foi analisado pela técnica de cintilação. Em frascos de quartzo de 22 ml foram adicionados 1 mL da solução a ser analisada e 19 mL de líquido cintilador (PERRIER, 2004). A amostra foi agitada em vórtex por 1 minuto e colocada no cintilador durante 30 minutos.

4.6 Medidas de segurança

Todos os cuidados de proteção radiológica foram observados, utilizando-se os Equipamentos de Proteção Individual e o laboratório apropriado para o trabalho com materiais radioativos. As bancadas foram forradas e todo rejeito sólido gerado foi devidamente descartado após monitoração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultados da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas por radiação.

A figura 13 mostra *Saccharomyces cerevisiae* vivas e a figura 14 demonstra a coloração azulada de *Saccharomyces cerevisiae*, indicando que as paredes celulares foram danificadas, favorecendo a entrada do corante azul de metileno, o que comprova a morte celular.

Fig. 13 *Saccharomyces cerevisiae* viva

Fig. 14 *Saccharomyces cerevisiae* inativada por radiação

5.2 Resultados de Biossorção

5.2.1 Biossorção de ^{241}Am por *Saccharomyces cerevisiae* livres inativadas

As figuras 15, 16 e 17 apresentam os resultados dos experimentos de biossorção de ^{241}Am realizados com *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas com as atividades de 75, 150 e 300 Bq/mL em pH 2 e 4.

Os experimentos com *Saccharomyces cerevisiae* livres em pH 2 demonstraram remoção de 96,7% em 30 minutos de contato para solução de ^{241}Am com concentração inicial de 75 Bq/mL (figura 15).

O processo de biossorção de amerício por *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas com atividade de 150 Bq/mL (figura 16) apresentou resultados muito semelhantes aos dos experimentos com atividade de 300 Bq/mL (figura 17).

A tabela 2 apresenta o resumo dos resultados obtidos dos experimentos realizados com *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas.

Figura 15 – Bioadsorção de ^{241}Am com concentração inicial de 75 Bq/mL, pH 2 e 4, por *Saccharomyces cerevisiae* livres inativadas.

Figura 16 - Bioadsorção de ^{241}Am com concentração inicial de 150 Bq/mL, pH 2 e 4, por *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas.

Os resultados dos experimentos de bioissorção realizados com *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas em solução de ^{241}Am com concentração inicial de 300 Bq/mL em pH 2 demonstraram que em 30 minutos de contato ocorreu remoção de 80,3%, evoluindo até 97% após 240 minutos de contato (figura 17). A tabela 2 apresenta todos os resultados obtidos dos experimentos de bioissorção de ^{241}Am por *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas nas três concentrações estudadas.

Figura 17 - Bioissorção de ^{241}Am com concentração inicial de 300 Bq/mL, pH 2 e 4, por *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas.

Tabela 2 – Bioissorção de ^{241}Am por *Saccharomyces cerevisiae* livres e inativadas.

Tempo (h)	75 Bq/mL pH2	75 Bq/mL pH4	150 Bq/mL pH2	150 Bq/mL pH4	300 Bq/mL pH2	300 Bq/mL pH4
0,5	96,7 ± 0,56	92,3 ± 1,68	89,3 ± 0,04	40,5 ± 0,98	80,3 ± 0,79	33,9 ± 0,99
1	94,9 ± 1,22	92,7 ± 1,14	94,4 ± 0,06	52,9 ± 1,10	82,3 ± 0,53	46,6 ± 0,97
2	97,2 ± 0,38	94,1 ± 2,14	96,5 ± 1,60	75,4 ± 0,28	86,5 ± 0,16	56,8 ± 7,37
4	96,0 ± 6,07	96,2 ± 0,78	95,9 ± 0,61	92,4 ± 7,92	97,0 ± 0,28	80,6 ± 2,58

Os resultados obtidos corroboram os descritos na literatura por Liu *et al.* (2002-b) que utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* livres para biossorção de ^{241}Am em solução aquosa com concentrações iniciais de 2,22 MBq/l a 555,0 MBq/l e, verificaram os efeitos do pH, tempo de contato e temperatura. Os resultados demonstraram remoção de cerca de 99% do amerício após 60 minutos de contato em solução com pH entre 1 e 3 e temperatura entre 10 e 45°C.

Ferreira *et al.* (2007) estudaram o uso de *Saccharomyces cerevisiae* para o tratamento de rejeitos radioativos contendo ^{241}Am e, constataram que em solução aquosa com concentração inicial de 15 Bq/mL, ocorre remoção de 99,9% de ^{241}Am após 15 minutos de contato em pH 2.

5.2.2 Biossorção de ^{241}Am por alginato de cálcio e por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas.

Os resultados obtidos nos experimentos de biossorção realizados com *Saccharomyces cerevisiae* inativadas imobilizadas em micro esferas de alginato de cálcio e somente com alginato de cálcio são apresentados nas figuras 18, 19 e 20. Os resultados demonstram alta capacidade de biossorção em pH 4, em ambas as condições.

Em todos os tempos estudados e atividades estudadas, a biossorção demonstra ser mais eficiente em pH 4. Em 60 minutos, a remoção média do ^{241}Am por alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* foi de 97,5%. A partir de 120 minutos, os resultados revelaram média de remoção de 97% tanto para alginato de cálcio com quanto sem *Saccharomyces cerevisiae* (figura 18).

Figura 18 – Biossorção de ^{241}Am com concentração inicial de 75 Bq/mL em pH 2 e 4 por A + S (alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae*) e A (alginato de cálcio).

Observa-se que em concentração de 150 Bq/mL com pH 4 (figura 19), a biossorção apresenta resultados muito semelhantes quando realizada por alginato de cálcio com e sem *Saccharomyces cerevisiae*. Em 4 horas de contato, ocorre biossorção de 98,8 % de Am-241 para solução em pH 4.

Nos experimentos com solução de amerício em pH 2, a biossorção máxima observada foi de 60,2 % em 4 horas de contato.

Figura 19 – Bioissorção de ^{241}Am com concentração inicial de 150 Bq/mL, pH 2 e 4, por A + S (alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae*) e A (alginato de cálcio).

Observa-se que em 60 minutos de contato em pH 4, somente o alginato de cálcio, *Saccharomyces cerevisiae*, 97,4% do ^{241}Am com concentração inicial de 300 Bq/mL e, o alginato com a levedura apresentam menor capacidade de bioissorção (81,7%) no mesmo tempo e pH (Figura 20).

A tabela 3 apresenta o resumo dos resultados obtidos de bioissorção de ^{241}Am por A(alginato de cálcio) e por A+S (*Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio).

Figura 20 – Biossorção de ^{241}Am com concentração inicial de 300 Bq/mL, pH 2 e 4, por A + S (alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae*) e A (alginato de cálcio).

Tabela 3. Biossorção de ^{241}Am por A(alginato de cálcio) e A+S (*Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio)

75 Bq/mL				
Tempo (h)	A pH 2	A pH 4	A+S pH2	A+S pH4
0,5	47,3 ± 0,09	76,3 ± 1,15	41,0 ± 2,6	66,5 ± 0,65
1	63,8 ± 0,81	93,2 ± 0,64	66,9 ± 0,92	84,4 ± 0,98
2	75,8 ± 0,18	95,8 ± 0,35	76,0 ± 0,47	97,2 ± 0,28
4	81,4 ± 0,18	99,0 ± 0,07	80,8 ± 0,16	99,4 ± 0,13
150 Bq/mL				
0,5	21,4 ± 1,35	62,7 ± 2,96	35,1 ± 0,59	59,0 ± 0,22
1	34,8 ± 0,87	86,5 ± 0,23	50,9 ± 0,64	87,1 ± 0,62
2	52,8 ± 0,19	97,8 ± 0,20	54,4 ± 0,83	96,0 ± 1,07
4	58,1 ± 0,25	98,8 ± 0,11	60,6 ± 0,51	99,0 ± 0,00
300 Bq/mL				
0,5	48,7 ± 1,70	64,5 ± 1,23	40,5 ± 0,01	64,0 ± 0,38
1	65,8 ± 1,68	97,4 ± 0,49	61,9 ± 0,78	81,7 ± 0,49
2	78,5 ± 1,33	98,9 ± 0,79	76,7 ± 1,86	86,8 ± 0,38
4	87,4 ± 0,99	99,6 ± 0,05	81,3 ± 1,79	99,5 ± 0,33

Os resultados obtidos dos experimentos com esferas de alginato de cálcio demonstraram que este biopolímero apresenta alta capacidade de remoção de ^{241}Am , o que corrobora os resultados obtidos por Mimura *et al.* (2001), que

obtiveram 90% de remoção de ^{241}Am de concentração inicial de $2,1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ em 24 horas de contato.

Em 2002 Mimura *et al.* verificaram que somente o alginato de cálcio remove simultaneamente cerca de 90% de vários radionuclídeos (Cs, Y, Co, Eu e Am) presentes em uma solução com concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ após 19 horas de agitação, atingindo equilíbrio em 1 dia.

5.3 Testes preliminares realizados com bactérias

5.3.1 Curvas de crescimento

A figura 21 apresenta os resultados obtidos das curvas de crescimento e a tabela 4 demonstra os resultados obtidos da Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) das três bactérias utilizadas nos experimentos de bioacumulação.

Figura 21 – Curvas de crescimento das bactérias *Ochrobactrum anthropi*, *Cupriavidus metallidurans* e *Bacillus subtilis*.

Foi possível observar que a *Bacillus subtilis* foi a que teve o crescimento mais rápido e a *Cupriavidus metallidurans* a de crescimento mais lento das três bactérias estudadas.

5.3.2 Concentração Inibitória Mínima

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) (+ = crescimento de bactérias/ - = ausência de crescimento de bactérias)

Atividade(Bq/mL)	Resultado		
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
40	+	+	+
80	+	+	+
120	+	+	+
150	+	+	+
200	+	+	+
250	+	+	+
300	+	+	+
350	+	+	+
400	+	+	+
500	-	+	+
700	-	+	+
800	-	+	-
900	-	+	-
1000	-	+	-
1200	-	+	-
1400	-	-	-

Os resultados dos experimentos para a determinação do C.I.M. das três bactérias em contato com ^{241}Am revelaram que a *Ochrobactrum anthropi* apresenta maior resistência ao amerício, ocorrendo crescimento de colônias quando as bactérias tiveram contato com a solução de amerício com 1200 Bq de atividade. Este comportamento pode ser explicado pelo fato desta bactéria ter tido contato prévio com o amerício no lisímetro de onde foi retirada (MARUMO, 2006).

A bactéria que apresentou maior sensibilidade ao ^{241}Am foi a *Cupriavidus metallidurans* com crescimento de colônias de bactérias em até 400 Bq de ^{241}Am e, a *Bacillus subtilis* apresentou crescimento de colônias de bactérias em até 700 Bq., provavelmente devido a formação de esporos.

5.3.3 Testes de viabilidade celular

As figuras 22, 23 e 24 apresentam os resultados dos testes de viabilidade celular feitos a partir das bactérias que tiveram 5 horas de contato com DL-50 (dose letal para 50% da população) de amerício, analisados por da técnica de citometria de fluxo.

O resultado da avaliação de viabilidade celular por citometria de fluxo utilizando-se rodamina-123, que determina o potencial respiratório das bactérias, demonstrou que após 5 horas de contato da *Cupriavidus metallidurans* com a DL-50 de ^{241}Am (200 Bq), 49,66% das bactérias são viáveis (figura 20).

Figura 22 – Viabilidade da *Cupriavidus* após 5 h em contato com ^{241}Am / DL-50.

Através do resultado do teste de viabilidade celular da *Ochrobactrum anthropi*, constatou-se que 40,11% das bactérias permaneceram viáveis, após 5 horas de contato com solução DL-50 de ^{241}Am (600Bq) (figura 23).

Figura 23 – Viabilidade da *Ochrobactrum anthropi* em contato com DL-50/ ^{241}Am por 5 h.

O resultado do teste de viabilidade celular *Bacillus subtilis* demonstrou que 48,39% das bactérias expostas à DL-50 de ^{241}Am (350 Bq) permaneceram viáveis (figura 24).

Figura 24 – Viabilidade da bactéria *Bacillus subtilis* de contato com DL-50/²⁴¹Am por 5 h.

5.4 Resultados de biorremediação

5.4.1 Biorremediação por *Ochrobactrum anthropi*

As figuras 25, 26 e 27 apresentam os resultados dos experimentos de biorremediação realizados com *Ochrobactrum anthropi*, *Cupriavidus metallidurans* e *Bacillus subtilis*, respectivamente.

Os experimentos com *Ochrobactrum anthropi*, figura 25, revelaram um processo de biorremediação muito eficiente e rápido, pois foi observada remoção média de 95% já a partir de 2 minutos de contato e em todas as concentrações estudadas. Este comportamento se manteve praticamente constante até 24 horas. A tabela 5 apresenta os resultados obtidos dos experimentos de biorremediação com *Ochrobactrum anthropi*.

Figura 25. Biorremediação de ^{241}Am com concentrações iniciais de 75, 150 e 300 Bq/mL por *Ochrobactrum anthropi*.

Tabela 5- Biorremediação de ^{241}Am por *Ochrobactrum anthropi*.

Tempo (min.)	75 Bq/mL	150 Bq/mL	300 Bq/mL
2	92,5 ± 1,0	94,5 ± 2,7	97,8 ± 2,0
5	91,9 ± 2,8	94,3 ± 3,5	98,2 ± 1,5
30	93,6 ± 1,9	93,2 ± 3,6	94,5 ± 5,9
60	94,8 ± 1,7	97,5 ± 0,5	97,7 ± 2,5
120	97,5 ± 0,2	94,1 ± 4,1	97,5 ± 2,5
240	92,1 ± 6,8	96,2 ± 2,5	96,6 ± 3,9
360	96,7 ± 0,1	100 ± 1,5	100 ± 3,3
720	92,9 ± 2,7	98,6 ± 5,4	100 ± 6,3
1440	95,1 ± 2,6	90,1 ± 8,9	95,1 ± 7,4

5.4.2 Biorremediação por *Cupriavidus metallidurans*

Nos experimentos de biorremediação de ^{241}Am com concentrações de 75, 150 e 300 Bq/mL, por *Cupriavidus metallidurans* CH34 (figura 26), foram removidos, em média, 90% do ^{241}Am na primeira hora de contato e, em 6 horas de contato a remoção a média chega a 99,6% para todas as concentrações de ^{241}Am estudadas. A tabela 6 apresenta os resultados obtidos dos experimentos de biorremediação de ^{241}Am por *Cupriavidus metallidurans*.

Figura 26. Biorremoção de ^{241}Am com concentrações iniciais de 75, 150 e 300 Bq/mL por *Cupriavidus metallidurans*.

Tabela 6 – Biorremoção de ^{241}Am por *Cupriavidus metallidurans*.

Tempo (min)	75 Bq/mL	150 Bq/mL	300 Bq/mL
60	87,5 ± 1,9	93,5 ± 1,8	89,9 ± 5,8
120	88,4 ± 0,8	94,2 ± 1,7	95,7 ± 0,6
240	91,1 ± 1,1	95,4 ± 0,6	95,8 ± 0,3
360	100 ± 1,8	100 ± 0,8	98,9 ± 4,2
720	99,8 ± 2,6	93,7 ± 5,3	99,5 ± 2,0
1440	100 ± 0,6	99,2 ± 2,4	100 ± 0,5

5.4.3 Biorremoção por *Bacillus subtilis*

Os resultados obtidos com os experimentos de biorremoção de ^{241}Am por *Bacillus subtilis* mostraram que em 6 horas de contato, a biorremoção foi de 25,4%, em média e, em 12 horas de contato a remoção subiu, atingindo o máximo 52,3% de remoção para solução com 150 Bq/mL. Após este período, houve um decréscimo de remoção, sugerindo um processo de dessorção (figura 27). A

tabela 7 apresenta os resultados obtidos dos experimentos de biorremoção de ^{241}Am por *Bacillus subtilis*.

Figura 27. Biorremoção de ^{241}Am com concentrações iniciais de 75, 150 e 300 Bq/mL por *Bacillus subtilis*.

Tabela 7 – Resultados da biorremoção de ^{241}Am por *Bacillus subtilis*.

Tempo (min)	75 Bq/mL	150 Bq/mL	300 Bq/mL
360	29,2 ± 1,1	21,9 ± 0,2	25,2 ± 0,1
720	39,7 ± 0,2	52,3 ± 6,6	34,7 ± 1,2
1440	39,13 ± 3,7	35,9 ± 1,7	28,8 ± 3,0

Os resultados dos experimentos de bioacumulação de ^{241}Am por *Bacillus subtilis* (bactéria Gram-positiva) foram bem inferiores aos resultados observados com as duas bactérias Gram-negativas (*Ochrobactrum anthropi* e *Cupriavidus metallidurans*).

Estes resultados são corroborados por Hu (1992), que justifica o fato de as bactérias gram-negativas apresentarem maior capacidade de adsorção do que as bactérias gram-positivas, devido ao maior teor de lipídios da parede celular.

A figura 28 mostra, a título de curiosidade, a redução de volume e mudança de estado físico proporcionada pelo uso das micro esferas de alginato de cálcio em solução de ^{241}Am . O volume inicial de 22 mL de solução foi reduzido a 17,6 mg, ou seja, ocorreu uma redução de 99,92% do volume inicial.

Figura 28 – Redução de volume e mudança de estado físico do rejeito líquido contendo ^{241}Am , utilizando-se micro esferas de alginato de cálcio.

6. CONCLUSÕES

Saccharomyces cerevisiae livres inativadas por radiação realizam o processo de bioissorção com mais eficiência na solução de ^{241}Am em pH 2 do que em pH 4 e, quanto maior a atividade de amerício presente na solução estudada, menor a porcentagem de bioissorção.

Quando imobilizadas em alginato de cálcio, as células de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de remover valores muito próximos de 100% do ^{241}Am em solução de pH 4, a partir de 1 hora de contato, independente da concentração das soluções estudadas.

As micro esferas de alginato de cálcio sem levedura têm desempenho muito semelhante ao apresentado por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio.

As cepas das bactérias estudadas *Ochrobactrum anthropi* foi a cepa que se mostrou mais eficiente, sendo capaz de remover, média, 95% do radionuclídeo em apenas 2 minutos de contato e, em média, 97% em 60 minutos de contato, independente da concentração estudada.

Cupriavidus metallidurans remove em média, 90% em 1 hora de contato e 100% em 6 horas de contato independente da atividade estudada.

Bacillus subtilis apresentou menor capacidade de remoção de ^{241}Am , removendo, no máximo, 52,3% para solução com atividade de 150 Bq/mL. Sendo assim, as duas bactérias Gram negativas apresentaram melhores resultados de remoção de ^{241}Am .

Pela técnica de citometria de fluxo foi possível demonstrar que além da bioacumulação, também ocorreu bioissorção por células inviáveis

De todos os bioissorventes estudados, o biopolímero alginato de cálcio apresenta melhor trabalhabilidade, visto que pode ser removido facilmente do rejeito líquido além de apresentar alta capacidade de remoção de ^{241}Am e proporcionar uma grande redução de volume 99,9%.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar os mecanismos de bioabsorção e bioacumulação do ^{241}Am pelas bactérias *Ochrobactrum anthropi* e *Cupriavidus metallidurans*.

Definir as isotermas de sorção de todas as biomassas estudadas neste trabalho.

Testar a imobilização das biomassas contendo ^{241}Am em cimento para deposição final destes rejeitos já reduzidos.

Estudar a possibilidade de recuperação do ^{241}Am .

Testar as biomassas utilizadas neste trabalho para a biorremediação em rejeitos reais contendo variados radionuclídeos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIS, P. D. B.; PANEK, A.D.; LEITE, S. G. F.; ELEUTHERIO, E.C.A. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 55-60, 2003.

ADAMS, B. A.; HOLMS, E. L. Adsorptive properties of synthetic resins. **I. J. Soc. Chem. Znd.**, n.54, p.1-6T, 1935.

AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T.V. and KANAMADI, R.D. Biosorption of heavy metals. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 7, p. 71-78, 2003.

AKHTAR, K., M. WAHEED AKHTARB, AHAMD M. KHALIDC, Removal and recovery of zirconium from its aqueous solution by *Candida tropicalis*. **Journal of Hazardous Materials**, v.156, p. 108-117, 2008.

AL-SARAJ, M.; ABDEL-LATIF, M.S.; EL-NAHAL, I.; BARAKA, R. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 248, p.137-140, 1999.

APARICIO, S. *Chromium biosorption by the algal biomass Sargassum sp.* 45p. Master of Science ProGramme – Department of Kemioch metallurgi, Division of Kemisk teknologi, Luleå University of Techonology, 2000.

ARAÚJO, F. F. Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean and cotton. **Ciência Agrotec**, v. 32 n.2, 2008.

ARIEF, V.O.; TRILESTARI, K.; SUNARSO, J.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Review: Recent Progress on Biosorption of Heavy Metals from Liquids Using Low Cost Biosorbents: Characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. **Clean Journal**, v. 32, p. 937-962, 2008.

ATBACK, R., BOUNIOL, P., VITORGE, P. Cement use for radioactive waste embedding and disposal purposes. **Cement and Concrete Research**, v. 22, 419-429, 1992.

ATKINSON, B.W.; KASAN, H.C. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents, **Water SA** v. 24, n. 2, ISSN 0378-4738 , 1998.

BANERJEE, A. and NAYAK, D. Biosorption of no-carrier-added radionuclides by calcium alginate beads using 'tracer pocket' technique. **Bioresource Technology** v. 98 p. 2771-1774, 2007.

BASÍLIO, M. S.; FRIESI, K.; DE LENA, J. C.; NALINI Jr., H. A.; ROESER, H. M. P. Adsorção de As, Cu, Pb E Cr na avaliação da capacidade de fixação de metais por resíduo de mineradoras de ferro. **Química Nova**, v. 28, p. 822, 2005.

BAYAN, Y.K.; KESKINLER, B.; ÇAKICE, A. LEVENT M.; AKAY, G. Removal of divalent heavy metal mixtures from water by *Saccharomyces cerevisiae* using crossflow microfiltration. **Water Resource** v. 35, p. 2191, 2001.

BEEK, B. Bio-accumulation: new aspects and developments. The book of Environmental Chemistry. **Springer-Verlag Berlin-Heidelberg**, 2000.

BENEDICT, M.; PIGFORD, H.P.; LEVI, H. W. **Nuclear Chemical Engineering**, 2nd ed., McGraw-Hill Book Comp., p.465, 1981.

BEVERIDGE, J. T.; MURRAY, R. G. E. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.127, n. 3 p.1502-1518, 1976.

BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. Tese apresentada ao ProGrama de Pósgraduação Interunidades em Biotecnologia EP/ FMVZ /IPT /IB /ICB / Butantan da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia., 2008.

BRADY, D. and DUNCAN, J.R. Bioaccumulation of metal-cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41 p. 149-154, 1984.

BREIEROVÁ, E.; VAJČZIKOVÁ, I.; SASINKOVÁ, E.; FISERA, M.; GREGOR, T.; SAJBIDOR, J. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. **Zeitschrift Naturforsch**, v.57, p.634-639, 2002.

BRIERLEY, C.L. Bioremediation of metal-contaminated surface and ground waters. **Geomicrobiology Journal**, v. 8, p. 201-23, 1990.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINCO, J. M.; PARKER, J. Biology of Microorganisms, 7^a Ed. New Jersey, Prentice Hall, p. 909, 1994.

BUSTARD, M.; MCHALE, A. P. Biosorption of uranium by cross-linked and alginate immobilized residual biomass from deistillery spent wash. **Bioprocess Engineering** v.17, p.127-130, 1997.

CANIZARES-VILLANUEVA, R. O., Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomassa microbiana. **Revista Latinoamericana de Microbiología** v. 42, p. 131-143, 2000.

CHENG, Y., YAN, F.; HUANG, F.; CHU, W.; PAN, D.; CHEN, Z.; ZHENG, J.; YU, M.; LIN, Z.; WU, Z. Bioremediation of Cr(IV) and Immobilization as Cr (III) by *Ochrobactrum anthropi*. **Environ. Sci. Technology**, n. 44, p. 6357-6363, 2010.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. **Environmental International**, v. 36, p. 299-307, 2010.

CLAIN, A. F.; AQUINO, J. O. Recuperação de ^{241}Am de para raios e detectores de fumaça. **Química Nova**, v. 22, p. 677-678, 1999.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, “**Licenciamento de Instalações Radiativas**” - *CNEN-NE-6.02*, Rio de Janeiro 1985.

COSSICH, E.S.; TAVARES, C.R.G.; SILVA, E.A., RAVAGNANI, T.M.K. **Biossorção de Cromo (III) pela biomassa de alga marinha *Sargassum sp.*** Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor da Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, 2000.

COSTA, A. C. A.; DUTA, F. P. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 1-5, 2001.

DAS, S. K., KEDARI, C. Z., SHINDE, S. S., GHOSH, S., JAMBUNATHAN, U. Performance of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in the removal of long lived radionuclides from aqueous nitrate solutions. **J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 253, n.2, p. 235-240, 2002.

DHAMI, P. S.; KANNAN, R. ; NAIK, P. W.; DAS, S. K.; GOPALAKRISHNAN, V.; RAMANUJAM, A.; SALVI, N. A.; CHATTOPADHYAY, S. Biosorption of Americium using Various Biomasses of *Rhizopus* Species, **Biotechnology Letters**, p. 885-889, 2004.

EIDE, D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Nutrition**, v.18, p. 441-469, 1998.

EHRlich, H. L. Geomicrobiology, 2nd ed rev. Marcel /dekker Inc. New York, 1990.

FALDYNA, M.; LEVA, L.; KNOTGOVA, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.82, p. 23-37, 2001.

FENG, D.; ALDRICH, C.; Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxima*. **Hydrometallurgy**, v. 73, p. 1, 2004.

FERREIRA, R. V. P.; MARUMO, J. T., BELLINI, M. H., POTIENS, A. J., TAKARA, A. S., GOES, M. M., BORBA, T. R., NASCIMENTO, C. M., SAKATA, S. K. Use of *Saccharomyces cerevisiae* in radioactive waste treatment. **International Nuclear Atlantic Conference – INAC**, 2007.

FERREIRA, R. V. P.; SAKATA, S. K.; ISIKI, V. L. K.; MIYAMOTO, H.; BELLINI, M. H.; LIMA, L. F. C. P.; MARUMO, J. T. Influence of americium-241 on the microbial population and biodegradation of organic waste. **Environmental Chemistry Letters**, 2009.

GADD, G.M.; MOWLL, J.L.; WHITE, C. **Fifth International Conference on Heavy Metals in the Environment Athens**, v. 2, p.37, 1985.

GADD, G. M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **The Science of The Total Environment**, v. 258, p. 119-127, 2000.

GOK, C.; AYTAS, S. Biosorption of uranium (IV) from aqueous solution using calcium alginate beads. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p. 369-375, 2009.

GÖKSUNGUR, Y.; UREN, S.; GUVENÇ, U. Biosorption of copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 23-29, 2003.

GOMES, L.H.; DEL RIO, D.T.; DUARTE, K.M.R., ANDRINO, F.G.; TAVARES, F.C.A. Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, **ICTR**, 2006.

GOMES, L. H. ; ALEXANDRINO, N. ; DUARTE, K.M. R.; ANDRINO, F. G. ; TAVARES, F.C. A .Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes suportes visando o tratamento de efluentes contaminados com cádmio. In: **Anais do 15º SIICUSP**, 2007.

GRINDEM, C. B. Blood cell markers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 1043-1065, 1996.

HU, T. L. Sorption of reactive dyes by *Aeromonas* biomass. **Water Science Technology**, v. 26, p. 357-366, 1992.

HUANG, P. M.; BOLLAG, J. M.; SENESI, N. Interactions between soil particles and microorganisms: **impact on the terrestrial ecosystem**, John Wiley and Sons. Press, 2002.

IBÁÑEZ, J.P.; UMETSU, Y.; Potential of protonated alginate beads for heavy metals uptake. **Hidrometallurgy**, v. 64, p. 89-99, 2002.

IBÁÑEZ, J.P.; UMETSU; Uptake of trivalent chromium from aqueous solution using protonated dry alginate beads. **Hydrometallurgy**, v. 72, p. 227-234, 2004.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY . **Radioactive waste management glossary**. 2nd ed. Vienna, (IAEA – TECDOC – 447) 1988.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY **Classification of radioactive waste – General safety guide**. Vienna, 2009.

ITOH, M.; YUASA, M.; KOBAYASHI, T. Adsorption of metal ions on yeast cells at varied cell concentration. **Plant Cell Physiology**, v.16, p.1167-1169, 1975.

JEPRAS, R. I.; CARTE, J.; PEARSON, S. C.; PAUL, F. E.; WILKINKSON, M. J. Development of a robust flow cytometry assay for determining numbers of viable bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2696-2701, 1995.

KAÇAR, Y.; ARPA, Ç.; TAN, S.; DENIZLI, A.; GENÇ, Ö.; ARICA, Y. M. Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 601-610, 2002.

KADUKOVÁ, J, VIRCÍKOVÁ, E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environmental International** v. 31, p. 277-232, 2005.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresour Technology**, v. 70, p. 95, 1999.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungi biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresour Technol**; v. 53, p.195–206, 1995.

KEDARI, C. S.; DAS, S. K.; GOSH, S. Biosorption of long lived radionuclides using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 789, 2001.

KELLER, C. The Chemistry of the Actinide Elements; **Verlag /Chemie Gmbh**, Weinhein, 1971.

KIRAN, I., AKAR, T., TUNALI, S. Biosorption of PB(II) and Cu (II) from aqueous solutions by preteated biomass of *Neurospora crassa*. **Process Biochemistry**, v. 40, p.3550-3558, 2005.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.239-256 2002.

KOTRBA, P.; DOLECKOVÁ, L.; LORENZO, V.; RUMML, T. Enhanced Bioaccumulation of Heavy Metal Ions by Bacterial Cells Due to Surface Display of Short Metal Binding Peptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1092-1098, 1999.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol baverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 1, p. 377-397, 2004.

KRATOCHVIL D., VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals.**Trends Biotechnology**, v.16, n. 7, p. 291-300, 1998.

LEE, S. S., ROBINSON, F.M., WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability **Biotechnology and Bioengineering. Symposium.**, v. 11 p. 641-649, 1981.

LI, B.; PAN, D.; ZHENG, J.; CHENG, Y.; MA, X.; HUANG, F.; LIN, Z. Microscopic Investigations of the Cr(IV) Uptake Mechanism of Living *Ochrobactrum anthropi*. **Langmuir**, n. 24, p. 9630-9635, 2008.

LIAO, J.; YANG, Y.; LOU, S.; LIU, N.; JIN, J.; ZHANG, T.; ZHAO, P., Biosorption of americium-241 by immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 60, p. 1-5, 2004.

LIMA, A. M. F. **Estudo das propriedades físico-químicas do alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. Tese apresentada para obtenção do título de doutora em química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

LIU, N.; YANG, Y.; LOU, S.; ZHANG, T.; JIN, J.; LIAO, J.; HUA, X. Biosorption of ²⁴¹Am by *Rhizopus arrhizus*: preliminary investigation and evaluation. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 57, p. 139–143, 2002(a).

LIU, N.; LOU, S.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; JIN, J.; LIAO, J. Biosorption of americium-241 by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Radionalytical and Nuclear Chemistry**, v. 252, n.1, p. 187-191, 2002(b).

LIU, N. ; LIAO, J.; LUO, S.; YANG Y.; JIN, J.; ZHANG, T.; ZHAO, P. Biosorption of ²⁴¹Am by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* **Journal Radional. Nucl. Chem.**, v. 258, p. 59, 2003.

LLOYD, J. R. Microbial reduction of metals and radionuclides, **FEMS Microbiology**, v. 27, p. 411-425, 2003.

LLOYD, J. R., RENSHAW, J.C. Microbial transformations of radionuclides: fundamental mechanisms and biogeochemical implication. **Met. Ions Biol. Syst.**, v. 44 p. 205-240, 2005.

LOU, S.; LIU, N.; YANG, Y; ZHANG, T.; JIN, J.; LIAO, J. Biosorption of americium-241 by *Candida sp*, **Radiochimica Acta**, v. 91, n. 6, p. 315-318, 2003.

LUK'YANOVA, E. A.; ZAKHAROVA, E. V.; KONSTANTINOVA, L. I.; NAZINA, T. N. Sorption of radionuclides by microorganisms from a deep repository of liquid low-level waste. **Radiochemistry**, v. 50, n. 1, p. 85-90, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock, **Prentice Hall**, 2008.

MARUMO, J.T. **Difusão de cloretos e ataque por sulfatos em pastas e argamassas de cimento Portland**. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências na Área de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível - IPEN/CNEN, 1997.

MARUMO, J. T. **Avaliação da contaminação provocada por pára-raios radioativos de Amerício-241 descartados em lixões.** Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais – IPEN/CNEN, 2006.

MACHADO, M. D.; JANSSENS, S.; SOARES, H. M.V.M. and SOARES, E. V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2107-2115, 2008.

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

MARTINSEN, A.; STORRO, I.; SKJAK-BROEK, G. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p.186-194, 1992.

MATSUMURA, T.; USUDA, S. Applicability of insoluble tannin to treatment of waste containing americium. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 271-273, p. 244-247, 1998.

MEENA, K.; RAJA, T.K. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells by gel entrapment using various metal alginates. **World Journal of Microbiology** v. 22, p.651-652, 2006.

MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHLEGEL, H.G.; GERITS, J.; CHARLES, P.; GIJGESEM, VAN. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p 338-324, 1985.

MERGEAY, M.; MONCH, S.; VALLAEYS, T.; AUQUIER, V. BENOTMANE, A; BERTIN, P.; DUNN, J.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. V.D.; WATTIEZ, R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p385-410, 2003.

MERROUN, M. L.; SELENSKA-POBELL, S. Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective. **Journal of Contamination Hydrology**, v. 102, p.285-295, 2008.

MIMURA, H.; OHTA, H.; AKIBA, K.; ONODERA, Y. Uptake behavior of americium on alginic acid and alginate polymer gels. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 247, p. 33-38, 2001.

MIMURA, H.; OHTA, H.; AKIBA, K.; ONODERA Removal of radioactive nuclides by multi-functional microcapsules enclosing inorganic ion-exchangers and organic extractants. **WM Conference**, Tucson, AZ, 2002.

MIRANDA, L. E. T.; VICENTE, R. **Processo para a gestão de pára-raios radioativos no Brasil**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Departamento de Rejeitos Radioativos. São Paulo, 1999.

MONCHY, S.; VALLAEYS, T.; BOSSUS, A.; MERGEAY, M. Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 86, p. 677-692, 2006.

MONCHY, S. ; BEN OTMANE, M. A.; JANSSEN, P.; VALLAEYS, T.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. V. D; MERGEAY, M. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7417–7425, 2007.

MOURA, L. A. A. **Proposta de Implantação de um Sistema de Gestão Ambiental no Laboratório de Rejeitos Radioativos do IPEN/SP** – Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações, 2008.

MURALEEDHARAN, T.R; LVENGAR, L. VENKOBACHAR. Biosorption: an attractive alternative for metal removal and recovery. **Curr. Scien.**, v. 61, p. 379-381, 1991.

NAKAJIMA, A., SAKAGUCHI, T. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 59-64, 1986.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. 6 ed. Villanova: NCCLS, 2003. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2009.

NAYAK, D.; LAHIRI, S. Biosorption of toxic, heavy, no-carrier-added radionuclides by calcium alginate beads. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 267, p. 59-65, 2005.

OLIVEIRA, L. P. **Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levadura imobilizada**. Tese apresentada ao proGrama de pós-graduação da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de doutor em biotecnologia, área de concentração Ciências Agrárias, 2006.

ÖNAL, S.; BAYSAL, S. H.; OZDEMIR, G. Studies on application of alginate-entrapped *Chryseomonas luteola* TEM 05 for heavy metal biosorption. **Journal of Hazardous Materials**, v.146, p. 417-420, 2007.

OZDEMIR, D.; SOYPACACI, Z.; SAHIN, I.; BICIK, Z.; SENCAN, I. *Ochrobactrum anthropi* Endocarditis and Septic Shock in a Patient in no Prosthetic Valve or Rheumatic Heart Disease: Case Report and Review of the Literature. **Jpn. J. Infect. Dis.**, n. 59, p. 254-265, 2006.

OZDEMIR, G.; OZTURK, T., CEYTHAN, N.; ISLER, R.; COSAR, T. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. **Bioresource Technology**, n. 90, p. 71-74, 2003.

OZDEMIR, G.; CEYHAN, N.; MANAV, E. Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions". **Biores. Technology**, v. 96, p. 1677–1682, 2005.

PACCEZ, J. D., NGUEYN, H. D., LUIZ, W. B., FERREIRA, R. C. C., SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; SCHUMAN, W.; FERREIRA, L. C. S. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine**, v. 25, p. 4671-4680, 2007.

PAPAGEORGIOU, S. K.; KATSAROS, F. K.; KOUVELOS, E. P. ; NOLA, J. W.; DEIT, H. L.; KANELLOPOULOS, N. K. Heavy metal sorption by alginate beads from *Laminaria digitata*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p.175-1772, 2006.

PAPAGEORGIOU, S. K.; KOUVELOS, E. P.; KATSARUS, F. K. Calcium alginate beads form *Laminaria digitata* for the removal of Cu⁺² and Cd⁺² from dilute aqueous metal Solutions. **Desalination**, v. 224, p. 293-306, 2008.

PERRIER, T.; GARIN-MARTIN, A.; MOERELLO. Am-241 remobilization in a calcareous soil under simplified rhizospheric conditions studied by column experiments. **Journal of Environmental Radioactivity**, n. 79, p. 205-221, 2005.

RENSHAW, J. C., LLOYD, J. R., LIVENS, R. L., Microbial interactions with actinides and long-lived fission products, **C. R. Chimie**, v. 10, p. 1067-1077, 2007.

ROZYCKI, T. V.; NIES, D. H., *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p.115–139, 2009.

SEKHAR, K.C.; KAMALA, C.T., CHARY, N.S.; ANJANEYULU, Y. Removal of heavy metals using a plant biomass with reference to environmental control, **Int. J. Process** v. 68, p.37-45, 2003.

SELEEM, M. N.; ALI, M.; BOYLE, S. M.; MUKHOPADHYAY, WITONSKY, S. G.; SCHURING, G.G.; SRIRANGANATHAN, N. Establishment of a Gene Expression System in *Ochrobactrum anthropi*. **Appl. Environ. Microbiol**, n. 72., v. 10, p. 6833-6836, 2006.

STRINGFELLOW, W.T.; KOMADA, T.; CHANG, L.-Y. Biological treatment of concentrated hazardous, toxic, and radionuclide mixed wastes without dilution, **Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory Formal Report No. LBNL-55928** Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA., 2000.

TAKENAKA, Y.; SAITO, T.; NAGASAKI, S.; TANAKA, S. Metal sorption to *Pseudomonas fluorescens*: influence of pH, sonic strength and metal concentrations, **Geomicrobiology Journal**, v. 24, p. 205-210, 2007.

TEIXEIRA, J. A.; ARAÚJO, M. M. Remoção de cromo de efluentes industriais utilizando géis de alginato. V CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 5, Aveiro, 1996. v.. 2. ISBN 972-569-088-5. Disponível em:< <http://hdl.handle.net/1822/3846> >, acesso em 20/02/2010.

TSEZOS, M.; BELL, J. P. I. Significance of biosorption for the hazardous organics removal efficiency of a biological reactor. **Water Res.** 22:391-394, 1988.

TSEZOS, M.; Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 241-243, 2001.

VECCHIO, A.; FINOLI, C.; DI SIMINE, D. Heavy metal biosorption by bacterial cells. **Fresenius J. Anal Chem.**, v. 361, p. 338-342, 1998.

VEGLIÓ, F.E; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 44, p. 301-316, 1997(a).

VEGLIÓ, F.; BEOLCHINI, F.; GASBARRO, A.; Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Athrobacter* sp. **Process Biochemistry**, v. 32, p.99-105, 1997(b).

VEGLIÓ, F; ESPOSITO, A.; REVERBERI, A. P. Copper adsorption on calcium alginate beads: equilibrium Ph- related models. **Hydrometallurgy**, v. 65, p. 43-57, 2002.

VELÁSQUEZ, L.; DUSSAN, J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. **Journal of Hazardous Materials**, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.44, 2009.

VELINGS, N.M.; MESTDAGH, M.M. Phisycs-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. **Polymer Gels and Netwrks**, v. 3, p. 311-330, 1995.

VENKOBACHAR, C., IYENGA, L., MISHRA, U. K., CHAUHAN, M. S. Release of U (VI) form spent biosorbent immobilized in cement concret blocks. **Cement and Concret Research**, v. 25, p. 1639-1646, 1995.

VIEIRA, R.H.S.F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution? **Internatinonal Microbiology**, v. 3, p. 17-24, 2000.

VIJAYARAGHAVAN, K. and YUN, Y.S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 266-291, 2008.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. In: Volesky B., editor **Biosrption of Heavy Metals**. Florida: CRC press; 1990.

VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z.R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* – **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 345-355, 1993.

VOLESKY, B. Advances in biosorption of metals: selection of biomass types. **FEMS Microbiol, Rev.**, v.14, p. 291-302, 1994.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H.A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Applied Microbiology Biotechnology**, n. 42, p. 797-806, 1995.

VOLESKY, B.; HOLAN Z.R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Prog.**, v. 11, p. 235–250, 1995.

VOLESKY, B.; CHONG, H. K. Description of Two-Metal Biosorption Equilibria by Langmuir-Type Models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 451-460, 1995.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 203-216, 2001.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Res.**, v. 41, p. 4017-4029, 2007.

WANG J.; CHEN, C.. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 427, 2006.

WEST, J.M.; McKINLEY, I.G.; STROES-GASCOYNE, S. Microbial Effects on Waste Repository Materials. In: **Keith-Roach, M., Livens, F. (Eds.)**, Interactions of microorganisms with radionuclides. Elsevier Sciences, Oxford. UK, p. 255-277, 2002.

WILKERSON, M. J. **Principles of flow cytometry and cell sorting**. In: 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ASVCP), 2004.

YAMAURA, M. **Determinação de tório em soluções do processo thorex por espectrometria de fluorescência de raios – X**. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências na Área de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível - IPEN/CNEN, 1982.