

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

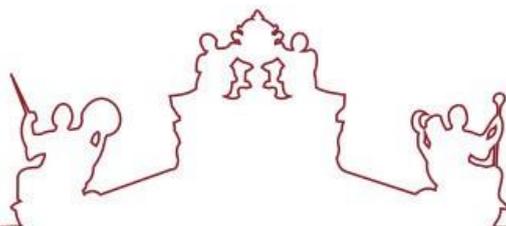
Dissertação

Isolamento e caracterização de rizobactérias de *Hymenachne grumosa* resistentes ao crómio

Raquel Luize de Carvalho

Orientador(es) / Ana Paula Pinto
Robson Andreazza

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

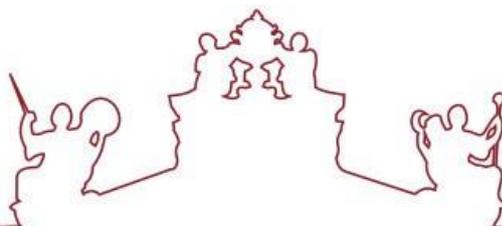
Dissertação

Isolamento e caracterização de rizobactérias de *Hymenachne grumosa* resistentes ao crómio

Raquel Luize de Carvalho

Orientador(es) / Ana Paula Pinto
Robson Andreazza

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente / Maria Elmina Lopes (Universidade de Évora)

Vogais / Ana Paula Pinto (Universidade de Évora) (Orientador)
Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora) (Arguente)

Dedico este trabalho a todos que acreditaram que sua realização seria possível e que de alguma forma me apoiaram para superar os obstáculos que surgiram durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais que tanto amo, Nei e Verena, por serem quem e como são, por todo amor e atenção que me dedicam, por serem minha base, meu porto seguro, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial, me dando força e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos professores do MAQA da Universidade de Évora, sobretudo às Professoras Ana Paula Pinto e Maria Elmina, por todo o auxílio e suporte, pelos esclarecimentos, pela prontidão no atendimento de todas minhas dúvidas e por me proporcionarem a realização da mobilidade acadêmica, para que eu pudesse voltar para perto dos que amo, quando a saudade já falava mais alto do que qualquer outra coisa.

Aos professores, auxiliares e colegas do Laboratório de Química Ambiental da Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Professor Robson Andreazza, por me receber em seu grupo de pesquisa, ajustando tudo da melhor forma para que a realização desse trabalho fosse possível, pela paciência em me orientar apesar dos imprevistos, pelas sugestões, pela compreensão da minha situação e por sempre me auxiliar no que fosse necessário.

À Amanda e à Dienifer, que foram essenciais para que meu trabalho pudesse ter sido concluído, sendo minhas mãos e meus olhos durante o período que precisei me afastar. Agradeço por não terem desistido, por toda ajuda, por todo o tempo disponibilizado a me auxiliar, por fazerem nosso trabalho ter dado certo, mesmo com as inúmeras tentativas e os incontáveis contratempos.

Ao Departamento de Botânica do Instituto de Biologia (UFPel), ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPel), Laboratório de Metrologia Química (UFPel) e ao Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul pelo apoio e disponibilidade no auxílio da execução dos testes e análises necessárias para realização deste estudo.

Ao Nilo, que mesmo longe, se fez tão presente durante esta fase complicada de nossas vidas, por todo o incentivo e por sempre ter uma palavra de carinho para me motivar a seguir em busca dos meus objetivos.

Aos meus familiares, em especial à Vó Maria, Tio Ivan, Tia Gi, Tia Pê, Dindo Rogério (*in memorian*) e Dinda Vera, que me apoiaram desde a decisão de ir pra

Portugal, na decisão de voltar para o Brasil (antes do tempo) e também pela força que me deram para que eu não abandonasse os estudos, mesmo com as reviravoltas que a minha vida deu neste período.

Às colegas que conheci e com as quais estreitei laços durante o Mestrado, por todo aprendizado, companheirismo e ajuda, tanto em Évora (Mariana) quanto em Pelotas (Marcela, Tays, Carolina, Louise, Josi e Cátia) e à Sheila, pela assistência nos ajustes do trabalho.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração, principalmente à Luísa (Portugal), Luana (Montenegro) e Camila (Cachoeira do Sul), com as quais muito desabafei durante os momentos difíceis e que sempre estavam com o ombro amigo à minha disposição, independente da distância, para me escutar e motivar.

A todos vocês, muito obrigada!

*“Viva como se você fosse morrer amanhã.
Aprenda como se você fosse viver para sempre”.*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Isolamento e caracterização de rizobactérias de *Hymenachne grumosa* resistentes ao crômio

O crômio ocorre naturalmente, principalmente nos estados de oxidação Cr(III) e Cr(VI). Pequenas concentrações de Cr(III) são essenciais à nutrição humana, porém o Cr(VI), geralmente proveniente de efluentes industriais, é altamente tóxico, teratogênico e mutagênico. A biorremediação, alternativa sustentável de descontaminação, é realizada através de organismos capazes de sobreviver em ambientes contaminados, que desenvolvem mecanismos de resistência e adaptação aos elementos aos quais estão expostos. No presente estudo, foram isoladas rizobactérias resistentes ao crômio encontradas na macrófita aquática *Hymenachne grumosa*, retirada do Arroio Santa Bárbara (Pelotas, RS, Brasil). Uma das estirpes, identificada como *Exiguobacterium acetylicum*, passou por tratamentos específicos para avaliação das condições ambientais ótimas de crescimento e remoção deste metal pesado. Observando os efeitos da variação do tempo de contato, temperatura de incubação, pH e concentração de Cr no meio, este microrganismo apresentou resultados satisfatórios, caracterizando-se como potencial biorremediador, podendo ser aplicado com sucesso para remoção de Cr.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminação por crômio; *Hymenachne grumosa*; Biorremediação; *Exiguobacterium acetylicum*; Rizobactérias resistentes ao crômio.

ABSTRACT

Isolation and characterization of chromium resistant rhizobacteria from *Hymenachne grumosa*.

Chromium occurs naturally, mainly in the oxidation states Cr (III) and Cr (VI). Small concentrations of Cr (III) are essential for human nutrition, but Cr (VI), usually from industrial effluents, is highly toxic, teratogenic and mutagenic. Bioremediation, a sustainable alternative for decontamination, is carried out through organisms capable of surviving in contaminated environments, which develop mechanisms of resistance and adaptation to the elements to which they are exposed. In the present study, chromium-resistant rhizobacteria found in the aquatic macrophyte *Hymenachne grumosa* were isolated from Arroio Santa Bárbara (Pelotas, RS, Brazil). One of the strains, identified as *Exiguobacterium acetylicum*, underwent specific treatments to assess the optimal environmental conditions for growth and removal of this heavy metal. Observing the effects of the variation of contact time, incubation temperature, pH and Cr concentration in the medium, this microorganism showed satisfactory results, being characterized as a potential bioremediator, and can be successfully applied to remove Cr.

KEYWORDS: Chromium contamination; *Hymenachne grumosa*; Bioremediation; *Exiguobacterium acetylicum*; Chromium resistant rhizobacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de Frost para o crômio em solução ácida.	20
Figura 2 – O ciclo do crômio.....	22
Figura 3 – Diagrama de Pourbaix do Cr de acordo com Dhal et al. 2013.	23
Figura 4 – Mecanismos bacterianos de resistência ao crômio.	31
Figura 5 – Processos presentes durante a fitoremediação.	36
Figura 6 – Tipos de macrófitas aquáticas.....	41
Figura 7 – Fases do crescimento bacteriano.....	44
Figura 8 – Localização do município de Pelotas – RS.	49
Figura 9 – Arroio Santa Bárbara e espécime de <i>H.grumosa</i>	52
Figura 10 – Comparação do crescimento e da remoção de Cr dos isolados resistentes encontrados na macrófita <i>H. grumosa</i>	61
Figura 11 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA.	63
Figura 12 – Comparação entre o crescimento e a remoção de Cr do Isolado HG5 em diferentes intervalos de tempo.	66
Figura 13 – Percentagem de remoção de Cr do Isolado HG5 para diferentes concentrações iniciais de crômio no meio.	68
Figura 14 – Comparação entre o crescimento e a remoção de Cr do Isolado HG5 para diferentes temperaturas de incubação.	69
Figura 15 – Comparação entre o crescimento e a remoção de Cr do Isolado HG5 em função do pH do meio.	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Limites de Cr de acordo com a legislação brasileira.	19
Quadro 2 – Métodos biológicos mais amplamente utilizados.	28
Quadro 3 – Mecanismos de resistência ao Cr em diferentes bactérias.	32
Quadro 4 – Principais técnicas de fitoremediação.	36
Quadro 5 – Caracterização das macrófitas aquáticas quanto ao modo de vida.	41
Quadro 6 – Macrófitas aquáticas identificadas no Arroio Santa Bárbara	42
Quadro 7 – Classificação taxonômica <i>Hymenachne grumosa</i> (Ness) Zuloaga.	43
Quadro 8 – Resumo das fases do crescimento bacteriano.	44
Quadro 9 – Caracterização morfológica das culturas puras dos isolados.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da água do Arroio Santa Bárbara e dos valores de referência CONAMA 357/2005 para Águas Doces Classe 2, segundo o estudo de Demarco et al. 2018.	18
Tabela 2 – Densidade ótica x UFC de cada um dos inóculos.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Espectroscopia de Absorção Atômica
AN – Ágar Nutriente
ANOVA – Análise de Variância
CN – Caldo Nutriente
CBR – Bactérias resistentes ao crômio
CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente (Brasil)
Cr – Crômio
Cr (III) – Crômio trivalente
Cr (VI) – Crômio hexavalente
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EP – Erro padrão
IQA – Índice de Qualidade das Águas
kg – quilograma
km – quilómetro
LQA – Laboratório de Química Ambiental
MAQA – Mestrado em Análises Químicas Ambientais
mg L⁻¹ – miligramas por litro (concentração)
mL – mililitros
OD – Densidade ótica ou DO
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
UFPeI – Universidade Federal de Pelotas
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

λ – Comprimento de onda
% – Percentual
°C – Graus Celsius
A – Absorvância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 POLUIÇÃO E CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS	17
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO CRÓMIO	20
3.2.1 O ciclo do crómio.....	21
3.2.2 O crómio no meio ambiente	24
3.3 REMEDIAÇÃO.....	26
3.3.1 Métodos físicos	26
3.3.2 Métodos químicos	27
3.4 BIORREMEDIAÇÃO	27
3.4.1 Bactérias na biorremediação de crómio	30
3.4.2 Biossorção	33
3.4.3 Bioacumulação.....	33
3.4.4 Biotransformação	34
3.5 FITORREMEDIAÇÃO	35
3.5.1 Macrófitas aquáticas	40
3.5.2 <i>Hymenachne grumosa</i>	42
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	44
3.6.1 Controlo do crescimento bacteriano.....	44
3.6.2 Quantificação de crómio.....	45
3.6.3 Identificação molecular do isolado	46
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 PREPARAÇÃO INICIAL	50
4.1.1 Soluções	50
4.1.2 Meios de cultura.....	51
4.2 RECOLHA DO ESPÉCIME DE <i>H. grumosa</i>	52
4.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO CRÓMIO	53
4.4 CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS RESISTENTES....	53

4.4.1	Preparação dos inóculos.....	53
4.4.2	Contagem das unidades formadoras de colónias	54
4.5	SELEÇÃO DE ISOLADOS RESISTENTES AO CRÓMIO	54
4.5.1	Avaliação do crescimento bacteriano.....	54
4.5.2	Avaliação da remoção de crómio	55
4.6	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS PARA REMOÇÃO DE Crómio	56
4.6.1	Curva de crescimento e remoção através do tempo	56
4.6.2	Efeito de diferentes concentrações iniciais de crómio.....	57
4.6.3	Efeitos da variação de temperatura de incubação	57
4.6.4	Efeitos da variação de pH do meio.....	57
4.7	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO SELECIONADO	58
4.7.1	Extração de DNA.....	58
4.7.2	Amplificação do DNA por PCR.....	58
4.7.3	Sequenciamento de DNA.....	59
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS	60
5.1.1	Contagem das unidades formadoras de colónias (UFC).....	60
5.2	COMPARAÇÃO DOS ISOLADOS RESISTENTES ENCONTRADOS	61
5.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO SELECIONADO	62
5.4	TESTES DE CONDIÇÕES IDEAIS.....	65
5.4.1	Período de incubação	65
5.4.2	Concentração de crómio	67
5.4.3	Temperatura de incubação	68
5.4.4	pH do meio.....	70
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de solos, sedimentos, ar e águas subterrâneas ou superficiais é um dos principais problemas existentes na atualidade, que afeta diretamente a saúde humana e o equilíbrio ambiental (ZOUBOULIS et al., 2018). A descarga indiscriminada de efluentes que contenham resíduos perigosos, agravam este cenário e provocam a degradação do meio ambiente (SOTEROMARTINS et al., 2014). Frente a isso, é necessária a aplicação de metodologias eficientes para reduzir os poluentes a um limite aceitável e não prejudicial, de acordo com a legislação ambiental em vigor (JOBBY et al., 2018; THATOI et al., 2014).

O crómio (Cr) é um metal encontrado de forma natural, geralmente em quantidades mínimas, em todos os componentes ambientais, porém quando presente em locais contaminados e em concentrações elevadas, pode ser altamente prejudicial a todo o ecossistema (JOBBY et al., 2018). Do ponto de vista ecológico, a forma trivalente (Cr III) e a hexavalente (Cr VI) são as mais impactantes, pois são os estados de oxidação mais estáveis do Cr no ambiente natural (JOBBY et al., 2018; SANJAY et al., 2018).

Existe uma diferenciada gama de atividades humanas que incorporam altas concentrações de Cr nos recursos hídricos acima do nível regulatório (PRADHAN et al., 2017). Desta forma, é pertinente que o método de remediação escolhido reduza a concentração deste metal para limites admissíveis, antes que águas contaminadas sejam descarregadas no meio ambiente sob forma de efluente (JOBBY et al., 2018; SANJAY et al., 2018).

As estratégias de remediação incluem técnicas físicas, químicas e biológicas, ou até mesmo uma combinação dessas técnicas, que podem ser utilizadas para remoção de contaminantes através de mecanismos distintos (PRADHAN et al., 2017). Estas técnicas podem ser classificadas em técnicas *in situ*, quando ocorrem no próprio local da contaminação, ou *ex situ*, quando o material contaminado é levado para tratamento em outro local (ASHA e SANDEEP, 2013; ZOUBOULIS et al., 2018).

A biorremediação, uma tecnologia emergente que pode ser usada isolada ou simultaneamente com outros métodos convencionais, utiliza uma ampla gama de organismos vivos capazes de transformar, imobilizar e remover contaminantes do solo ou da água (PRADHAN et al., 2017). O potencial que certos microrganismos possuem de remover ou reduzir o crómio hexavalente é uma propriedade que pode ser

aproveitada para desintoxicar locais contaminados com esse metal, sendo altamente relevante do ponto de vista da biorremediação (SANJAY et al., 2018).

A utilização de bactérias é considerada uma técnica bastante recomendada de tratamento, tendo em vista que algumas populações bacterianas podem mostrar resistência até concentrações da ordem dos 500 mg L⁻¹ de Cr (VI) (SANJAY et al., 2018). A biorremediação promove o desenvolvimento sustentável do controlo e gestão da poluição ambiental (PRADHAN et al., 2017), sendo uma solução promissora para remoção de Cr de ambientes contaminados de uma forma eficaz, económica e ecológica (CERVANTES et al., 2001; JOBBY et al., 2018).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Química Ambiental (LQA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) vem analisando o grau de contaminação do Arroio Santa Bárbara, uma das principais fontes de água potável para a população do município de Pelotas/RS. Demarco et al., em 2016, iniciaram esse estudo analisando o referido corpo hídrico quanto à presença de metais pesados e também identificaram macrófitas aquáticas que ocorrem naturalmente neste local, avaliando a função fitorremediadora de cada uma delas. A macrófita *Hymenachne grumosa* apresentou um bom potencial para rizofiltração e remoção dos contaminantes (DEMARCO et al., 2016), sendo então utilizada no presente trabalho para estudos mais aprofundados quanto à presença de bactérias em suas raízes que auxiliem na remoção de Cr de ambientes contaminados com o metal.

O conhecimento sobre a interação entre microrganismos e metais pesados tem aumentado e assim, o isolamento de bactérias tolerantes ao crómio, que habitam naturalmente ambientes contaminados, pode ser um passo importante para conduzir um processo de biorremediação (FERNÁNDEZ et al., 2018). A variação dos diferentes parâmetros físicos, químicos e biológicos pode afetar a eficiência desse tipo de processo, tendo impacto direto na realização e no sucesso dessa técnica (PRADHAN et al., 2017). Portanto, a realização de estudos é fundamental para compreender as potencialidades destas bactérias, para que sejam usadas de forma efetiva no tratamento de águas contaminadas com altas concentrações de crómio (SANJAY et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar bactérias resistentes ao crómio presentes nas raízes da macrófita aquática *Hymenachne grumosa* e que são capazes de auxiliar na remoção deste metal em ambientes contaminados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade de crescimento de bactérias presentes nas raízes em meio contendo crómio;
- Selecionar culturas que se desenvolvam na presença desse metal;
- Analisar e comparar o potencial de crescimento e de remoção de crómio das bactérias resistentes encontradas;
- Selecionar uma das estirpes bacterianas para identificação molecular;
- Realizar tratamentos específicos com a estirpe selecionada, avaliando as condições ambientais ótimas de crescimento e remoção deste metal, através de testes com concentrações diferentes de crómio no meio, valores diferentes de pH do meio, diferentes temperaturas e diferentes tempos de incubação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLUIÇÃO E CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS

Fenómenos naturais e ações antrópicas que incorporam compostos orgânicos e inorgânicos, em função do uso e ocupação do solo ou provenientes de atividades industriais, podem determinar a qualidade dos cursos de água (CORADI et al., 2009). Os poluentes podem causar mudanças drásticas nas propriedades físicas e químicas do meio e dos seus componentes, resultando em inúmeras alterações na biodiversidade (PRADHAN et al., 2017).

A contaminação por metais pesados tornou-se uma séria ameaça ao meio ambiente e à segurança alimentar, devido à descarga de efluentes domésticos e industriais sem tratamento, ao rápido crescimento das indústrias, ao avanço da agricultura, ao aumento da população mundial e ao crescente número de ocupações inadequadas às margens dos cursos d'água, que perturbam o ecossistema natural (SIMON et al., 2007; SARWAR et al., 2017). A monitorização da qualidade dos cursos hídricos é de fundamental importância, pois a presença nas águas de substâncias patogênicas, tóxicas ou nocivas pode alterar de forma negativa as características físicas, químicas e biológicas do meio aquático (CORADI et al., 2009).

No Brasil, o Índice de Qualidade das Águas (IQA) avalia a qualidade da água para o abastecimento público, após o tratamento convencional, e é o principal indicador qualitativo utilizado no país (ANA, 2019). O IQA é calculado com base em parâmetros como o pH e temperatura da água, a carência da demanda bioquímica de oxigênio, oxigênio dissolvido, azoto e fósforo total, resíduo total, turbidez e coliformes fecais (ANA, 2019). Esse indicador exprime a qualidade da água para diversos usos, agregando dados físicos, químicos e microbiológicos, por meio de metodologias específicas (CORADI et al., 2009).

Por outro lado, já que não analisa parâmetros importantes para o abastecimento público, como certas substâncias que possam interferir nas propriedades organolépticas da água, protozoários patogênicos e substâncias tóxicas, como compostos orgânicos, pesticidas e metais pesados, a avaliação da qualidade da água obtida pelo IQA apresenta certas limitações (ANA, 2019).

Os metais pesados, além de uma grande preocupação ambiental, são altamente prejudiciais aos seres humanos, animais e plantas, pois tendem a sofrer

bioacumulação na cadeia alimentar, persistindo a longo prazo no ambiente (YOON et al., 2006).

Esses metais, classificados como essenciais e não-essenciais, podem levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) além dos seus limites tóxicos, sendo que os metais não-essenciais ainda inibem diversos processos biológicos, substituindo os metais essenciais ou alterando a estrutura de biomoléculas e de importantes proteínas reguladoras do *stress* (SARWAR et al., 2017). A fonte natural, primária e mais importante de metais pesados é o material de origem do solo, porém, atividades relacionadas com o setor agrícola e industrial, importantes fontes pontuais de metais pesados no meio ambiente, podem também contribuir de forma significativa para o aumento da concentração destes metais em solos e águas (SARWAR et al., 2017).

Analisar a capacidade de bioacumulação de metais pesados por macrófitas aquáticas encontradas no Arroio Santa Bárbara no município de Pelotas/RS (Brasil), visando destacar diferenças entre as espécies e identificar aquelas com maior potencial para serem utilizadas em técnicas de fitorremediação, foi o principal objetivo do trabalho realizado por Demarco et al. em 2016. As macrófitas recolhidas foram preparadas e então a parte aérea e as raízes foram analisadas separadamente quanto à presença de metais (chumbo, crômio, manganês, níquel e zinco) para comparação da concentração destes metais entre as diferentes partes da planta, correlacionadas com amostras de água do Arroio, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação da água do Arroio Santa Bárbara e dos valores de referência CONAMA 357/2005 para Águas Doces Classe 2, segundo o estudo de Demarco et al. 2018.

Parâmetro	CONAMA (valor máximo)	Arroio Santa Bárbara
Chumbo total	0,01 mg L ⁻¹ Pb	0,18 ± 0,11 mg L ⁻¹
Crômio total	0,05 mg L ⁻¹ Cr	4,61 ± 0,23 mg L ⁻¹
Manganês total	0,10 mg L ⁻¹ Mn	0,56 ± 0,10 mg L ⁻¹
Níquel total	0,025 mg L ⁻¹ Ni	1,87 ± 0,08 mg L ⁻¹
Zinco total	0,18 mg L ⁻¹ Zn	1,74 ± 0,32mg L ⁻¹

Adaptado de Demarco et al. 2018.

As concentrações dos metais, tanto nas plantas como na água, foram quantificadas por Espectrometria por emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, de *Inductively Coupled Plasma Optic Emission*

Spectrophotometry) no Laboratório de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e a partir destes dados, constatou-se que o Arroio Santa Bárbara possui parâmetros acima do permitido (DEMARCO, 2018; 2019).

Algumas legislações brasileiras que regulam os limites de Cr em diferentes meios estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Limites de Cr de acordo com a legislação brasileira.

Legislação	Enquadramento	Valores Máximos
Resolução CONAMA N° 357/2005 *	Águas doces classes 1, 2 e 3; Águas salinas classe 1; Águas salobras classe 1.	Cr total: 0,05 mg L ⁻¹
	Águas salinas classe 2; Águas salobras classe 2.	Cr total: 1,1 mg L ⁻¹
Resolução CONAMA N° 430/2011 **	Lançamento de efluentes em corpos de água receptores	Cr (VI): 0,1 mg L ⁻¹ Cr (III): 1,0 mg L ⁻¹
Resolução CONSEMA N° 355/2017 ***	Lançamento de efluentes líquidos em corpos de água superficiais	Cr (VI): 0,1 mg L ⁻¹ Cr total: 0,5 mg L ⁻¹
NBR 9800 ****	Lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário	Cr (VI): 0,5 mg L ⁻¹ Cr total: 5,0 mg L ⁻¹

Fonte: * Brasil 2005; ** Brasil 2011; *** CONSEMA 2017; **** ABNT 1987.

A Resolução CONAMA N° 357/2005 e suas posteriores alterações dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, estabelecendo também as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2005). O Artigo 42 diz que, enquanto não forem aprovados os respectivos enquadramentos dos corpos d'água, "as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação da classe mais rigorosa correspondente" (BRASIL, 2005).

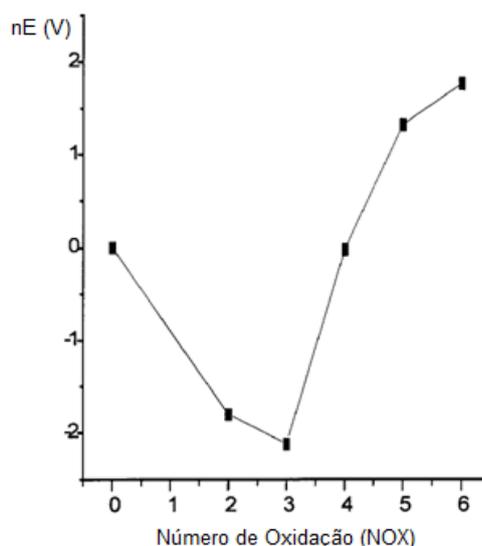
Compreender o comportamento dos metais em sistemas aquáticos naturais é de grande importância na busca de alternativas efetivas para remediar este tipo de contaminação (RICHARD e BOURG, 1991). Assim, considerando o Arroio Santa Bárbara como classe 2, tendo em vista a ausência de enquadramento aprovado anteriormente, foi possível observar que os teores apresentados se encontram acima do permitido na legislação brasileira, indicando a real necessidade de intervenção para a recuperação deste corpo hídrico (DEMARCO, 2018; 2019).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO CRÓMIO

O crómio é um elemento químico de símbolo Cr, número atómico 24 (24 prótons, 24 eletrões e 28 neutrões), massa atómica 52u e sólido a temperatura ambiente. É um metal de transição do bloco D, do 4º período e o primeiro membro do grupo 6 da tabela periódica moderna. Pode formar óxidos ácidos, alcalinos ou anfotéricos de acordo com o estado de oxidação, que varia entre -2 e +6 (PRADHAN et al., 2017), porém somente a forma trivalente e a hexavalente têm significado biológico (MORAES et al., 2012), sendo diferentes na carga, nas propriedades físico-químicas, bem como na reatividade química e bioquímica (KOTAŚ e STASICKA, 2000).

O estado de oxidação do Cr (III) é o mais estável, sendo que uma energia considerável é necessária para convertê-lo em estados de oxidação inferiores ou superiores. O Cr (VI) em solução ácida demonstra um potencial redox positivo muito alto, conforme mostra a Figura 1, evidenciando que é fortemente oxidante e instável na presença de doadores de eletrões (KOTAŚ e STASICKA, 2000).

Figura 1 – Diagrama de Frost para o crómio em solução ácida.



Fonte: adaptado de Kotaś e Stasicka 2000.

O crómio trivalente, Cr (III), é um oligoelemento essencial e necessário para o adequado funcionamento dos organismos vivos, atuando no metabolismo dos glúcidos, lípidos e de aminoácidos (JOBBY et al., 2018; PRADHAN et al., 2017; RICHARD e BOURG, 1991). É um suplemento dietético popular, encontrado na ordem

dos microgramas em alguns alimentos e também em diferentes partes do corpo humano (PRADHAN et al., 2017). Em concentrações elevadas o Cr (III) pode causar efeitos negativos nas estruturas celulares, resultando na inibição de alguns sistemas metaloenzimáticos, devido à sua elevada capacidade de coordenar diversos compostos orgânicos (KOTAŚ e STASICKA, 2000).

O crómio hexavalente, Cr (VI), está presente em lixiviados de várias indústrias, contribuindo para o aumento da concentração de crómio nas águas e nos solos (PRADHAN et al., 2017). A alta mobilidade e solubilidade do Cr (VI) ampliam as chances da sua difusão através da membrana celular, que pode gerar danos no DNA, por possuir uma variedade de efeitos tóxicos, teratogénicos, mutagénicos e carcinogénicos (CERVANTES et al., 2001; FERNÁNDEZ et al., 2018). Durante a redução biológica de Cr (VI) para Cr (III), que ocorre no interior das células, algumas das diferentes espécies reativas de oxigénio (ROS, de *Reactive Oxygen Species*) formadas são o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais livres (BARRERA-DÍAZ et al., 2012).

A exposição ao Cr (VI) ocasiona uma variedade de problemas clínicos, sendo que uma grande dose pode até mesmo causar a morte de animais e humanos, por exercer efeito tóxico nos sistemas biológicos (JOBBY et al., 2018). A inalação e retenção podem causar bronquite, asma, pneumonia, perfuração do septo nasal, inflamação da laringe, do fígado e aumento da incidência de carcinoma broncogénico (KOTAŚ e STASICKA, 2000). O Cr (VI) age diretamente como um oxidante na superfície da pele, podendo ser absorvido pelo sistema sanguíneo, especialmente se a superfície da pele sofreu algum dano (PRADHAN et al., 2017).

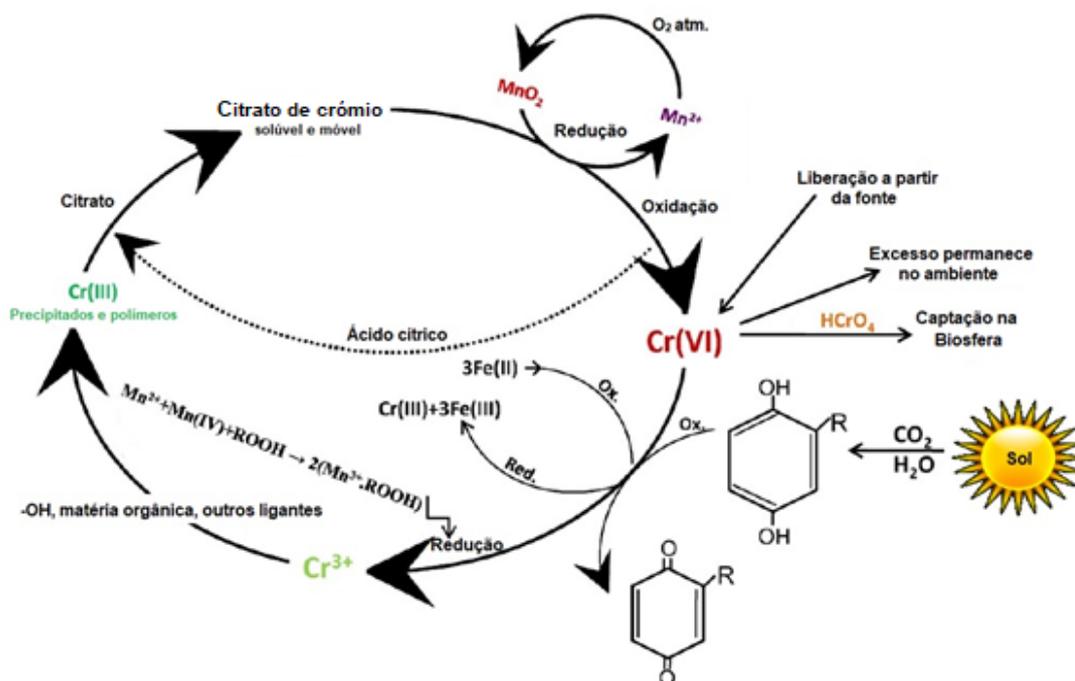
Nas plantas, o Cr (VI) pode estar associado a uma diminuição na absorção de nutrientes e da fotossíntese, o que conduz a um crescimento mais lento, afetando severamente vários processos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos, induzindo a geração de ROS nas células vegetais (JOBBY et al., 2018).

3.2.1 O ciclo do crómio

A presença, concentração e formas do crómio num determinado ambiente dependem de diferentes processos químicos e físicos, tais como a hidrólise, complexação, dissolução/precipitação, adsorção/dessorção e reações redox (KOTAŚ e STASICKA, 2000). A solubilidade do crómio é fortemente dependente do

seu estado de oxidação, porém além das condições redox, o efeito da química da água (pH, iões concorrentes, agentes complexantes) e dos sólidos naturais (adsorventes), também podem ser significativos e assim, os ciclos hidrogeoquímicos do crómio (Figura 2) são controlados principalmente pelas condições ambientais locais (RICHARD e BOURG, 1991).

Figura 2 – O ciclo do crómio.



Adaptado de Dhal et al. 2013 e Jobby et al. 2018.

A dessorção e mobilização do Cr (VI) para a água e a dissolução de minerais contendo Cr (III), seguida de uma reação redox que oxida o Cr (III) para o Cr (VI), são favorecidas em ambientes de pH elevado (BERTOLO et al., 2009). O Cr (III) predomina sob condições redutoras enquanto o Cr (VI) é dominante sob condições oxidantes, sendo que esta distribuição depende também de outros fatores como a concentração total de Cr, a presença de compostos oxidantes e redutores, o potencial redox, a cinética das reações redox, além do pH (JOBBOY et al., 2018).

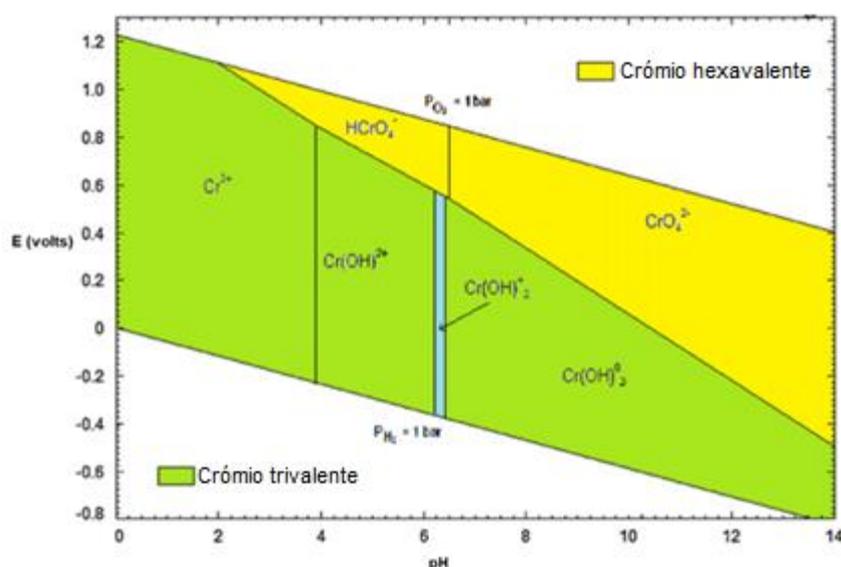
O Cr (III) migrará sob condições ácidas ou se presente como complexos de matéria orgânica dissolvida, exibindo um comportamento típico de sorção catiónica, sendo que sua adsorção aumenta com o pH, mas diminui quando catiões concorrentes estão presentes (RICHARD e BOURG, 1991). Já o Cr (VI) geralmente migra rapidamente, mas sua mobilidade é inibida quando as concentrações de Fe (II)

e de matéria orgânica são altas e quando os processos de sorção são favorecidos (RICHARD e BOURG, 1991).

As reações redox para esta transformação somente podem acontecer na presença de um outro par redox, como por exemplo $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_{2(\text{aq})}$, $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{4+}$, NO_2/NO_3 , $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}$, $\text{S}^{2-}/\text{SO}_4^{2-}$ e CH_4/CO_2 em ambientes aquáticos naturais (RICHARD e BOURG, 1991). O pH do meio é um dos principais fatores determinantes para estabelecer o predomínio do estado de oxidação deste elemento, sendo assim, em meio ácido ($\text{pH} < 7,5$) temos a predominância da forma trivalente e em meio básico ($\text{pH} > 8,0$) predomina-se a forma hexavalente (MORAES et al., 2012). O Cr (III) é muito estável em meio ácido e facilmente oxidado a Cr (VI) em meio alcalino. Abaixo de pH 5,0 os óxidos de Cr (III) são ligeiramente solúveis em água, mas acima de pH 5,0 o Cr (III) forma compostos hidratados que são ainda menos solúveis (PRADHAN et al., 2017).

Para demonstrar as condições de pH e de potencial elétrico sob os quais cada espécie é termodinamicamente estável, o Diagrama de Pourbaix é útil (Figura 3). Ele representa as espécies de crômio dominantes em soluções aquosas oxigenadas e diluídas, na ausência de quaisquer agentes complexantes, exceto H_2O ou OH^- (KOTAS e STASICKA, 2000).

Figura 3 – Diagrama de Pourbaix do Cr de acordo com Dhal et al. 2013.



Nota: para o sistema Cr-O₂-H₂O e concentração de $\Sigma\text{Cr} = 10^{-6} \text{ mol kg}^{-1}$ nos limites sólido/líquido.

Esse diagrama termodinâmico mostra a estabilidade das espécies Cr (III) e Cr (VI), demonstrando como o pH é realmente um parâmetro importante para a química

redox do crómio (KOTAŠ e STASICKA, 2000; PRADHAN et al., 2017). Em ambientes aquáticos de pH alcalino e sob condições oxidantes, com Eh elevado, as espécies de Cr (VI) predominam como aniões nas formas de HCrO_4^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ e CrO_4^{2-} , enquanto para valores de pH predominantemente ácido e baixo Eh, prevalecem espécies como Cr (III), CrOH^{2+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ e aniões $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ e CrO^{2-} (BARRERA-DÍAZ et al., 2012; BERTOLO et al., 2009; JOBBY et al., 2018).

3.2.2 O crómio no meio ambiente

O crómio é um elemento geoquímico amplamente distribuído, que pode ser encontrado naturalmente em rochas, minerais, solos, águas, ar e matéria biológica (FERNÁNDEZ et al., 2018). Entretanto, não é comum a ocorrência natural de concentrações elevadas, sendo o seu excesso diretamente associado à contaminação de origem antrópica, oriunda, portanto, de fontes pontuais ou difusas que necessitam de atenção (BERTOLO et al., 2009)

O crómio e seus compostos têm usos industriais variados, entrando nos sistemas ambientais através de processos como a produção industrial de aço refratário, ácido crómico e agentes de limpeza, galvanoplastia, mineração, operações de fundição, processamento de metais, uso agrícola, síntese de pigmentos e indústria de curtumes, entre outros (JOBBY et al., 2018; PRADHAN et al., 2017; SANJAY et al., 2018).

As diversas aplicações industriais deste metal ocorrem em razão da sua qualidade quanto à dureza e resistência à corrosão, porém os resíduos dessas indústrias são preocupantes fontes de crómio no meio ambiente (JOBBY et al., 2018). Os curtumes, que usam compostos de Cr no processo para curtir couro (peles de animais), são os principais contribuintes para contaminação ambiental com este metal, tendo em vista que o Cr utilizado no processo não é completamente absorvido pelo couro e grande parte dele escapa para o efluente, sendo eliminado, na maioria das vezes, sem qualquer tipo de tratamento (JOBBY et al., 2018).

A descarga de quantidades elevadas de crómio no ambiente (solo, água superficial ou atmosfera) resultam em graves problemas para o meio ambiente e para a saúde humana e animal, devido à sua toxicidade (FERNÁNDEZ et al., 2018). O Cr passa de sistemas terrestres para sistemas aquáticos, por fluxo superficial e por transporte através do solo, que variam de acordo com as condições específicas

existentes no local, tais como temperatura, profundidade, grau de mistura, condições de oxidação e quantidade de matéria orgânica (KOTAŠ e STASICKA, 2000).

As partículas atmosféricas contendo Cr são transportadas a diferentes distâncias pelo vento, antes de serem depositadas ou serem arrastadas do ar para as superfícies terrestres e aquáticas, sendo este processo diretamente afetado pela especiação química (KOTAŠ e STASICKA, 2000). O Cr (VI) é conhecido como a forma mais móvel em solos e águas, enquanto o Cr (III), em virtude da sua baixa solubilidade e tendência para ser adsorvido na faixa de pH típica para solos naturais e águas, geralmente não é transportado por grandes distâncias (KOTAŠ e STASICKA, 2000).

Nos rios, o mecanismo de transporte é associado principalmente a partículas suspensas e nos oceanos, o Cr entra através dos rios e pela atmosfera, sendo que o Cr precipitado e o dissolvido existem praticamente em equilíbrio (KOTAŠ e STASICKA, 2000). O Cr dissolvido é perdido na coluna de água oceânica através da incorporação em material biológico, principalmente esqueletos silicosos e carbonáceos, e pela adsorção em partículas de sedimentos (KOTAŠ e STASICKA, 2000).

Os lagos caracterizam-se por uma atividade biológica muito mais alta e uma proporção maior de área de superfície-sedimento-água. Assim, tanto a concentração quanto a especiação de Cr variaram em função da profundidade e da estação do ano além disso, o alto nível de matéria orgânica cria um meio redutor e complexante, favorecendo a redução de Cr (VI) para Cr (III), que depois é rapidamente precipitado ou adsorvido nos minerais do sedimento (KOTAŠ e STASICKA, 2000).

O Cr contido nos sedimentos pode ser remobilizado na água por oxidação ou via solubilização de sedimentos de Cr, sendo que o meio oxigenado favorece o Cr (VI), enquanto que em condições anóxicas, o Cr (III) é a principal forma encontrada (III) (KOTAŠ e STASICKA, 2000). Os organismos vivos também podem desempenhar um papel no transporte de metais. O plâncton nas áreas costeiras pode ter influência quantitativa no transporte de Cr nos oceanos, também absorvendo uma parte desse metal (KOTAŠ e STASICKA, 2000).

Considerando o impacto socioambiental relacionado à contaminação do ambiente através de resíduos industriais e para evitar, ou ao menos mitigar esse tipo de problema, existe uma busca de alternativas através do desenvolvimento de tecnologias para a remoção, conversão do crômio em formas menos tóxicas e redução

da concentração deste metal até um limite legalmente aceitável e não prejudicial (FERNÁNDEZ et al., 2018; JOBBY et al., 2018).

3.3 REMEDIAÇÃO

Está cada vez mais difícil impedir o contato dos produtos químicos e metais tóxicos com o meio ambiente, sendo a presença de metais pesados em solos e nas águas uma grande preocupação ambiental (SARWAR et al., 2017). Os usos industriais do crômio, de seus compostos ou das atividades de mineração resultam na libertação de resíduos contendo Cr no meio ambiente, e mesmo que essencial para numerosos organismos vivos em quantidades traço, o crômio é tóxico quando em concentrações elevadas (THATOI et al., 2014).

Atualmente, existe um grande desafio para enfrentar o problema da contaminação por metais, pois ao contrário dos compostos orgânicos, que são degradados naturalmente, os metais pesados não podem ser degradados e assim vão se acumulado em diferentes locais (JOBBY et al., 2018). Embora alguns procedimentos de tratamento físico e químico sejam simples, rápidos e possivelmente ajudem na recuperação dos metais, possuem um alto custo operacional, alto consumo de energia e produção de poluentes secundários indesejáveis (JOBBY et al., 2018).

Uma série de diferentes abordagens devem ser consideradas e desenvolvidas de modo a cumprir os requisitos para cada situação corretiva. Assim, técnicas físicas, químicas e biológicas estão sendo usadas para remover metais pesados e metaloides de ambientes contaminados (SARWAR et al., 2017).

3.3.1 Métodos físicos

Os métodos físicos exploram as propriedades físicas e físico-químicas das substâncias para a remoção de crômio de águas contaminadas, como por exemplo através da utilização de técnicas de osmose reversa, troca iônica, adsorção, eletrodialise, contenção e filtração através de membranas (JOBBY et al., 2018).

3.3.2 Métodos químicos

A remediação química implementa a utilização de produtos químicos e geralmente requer energia, grande quantidade de reagentes químicos e envolve a redução de Cr (VI) por agentes redutores como por exemplo, Fe (0), Fe (II) ou algum material orgânico à base de carbono (THATOI et al., 2014). Investigações recentes se concentraram na redução fotocatalítica de Cr (VI) por TiO₂ a pH 3 (JOBBOY et al., 2018).

A redução química do crómio hexavalente para a forma trivalente seguido de precipitação é o método mais comum e amplamente utilizado para a remoção de Cr de corpos hídricos contaminados, porém pode ser ineficaz na presença de menores concentrações de Cr (VI), quando diluído em grandes volumes de águas residuais, gerando grande quantidade de resíduos e lamas, cuja eliminação provoca poluição secundária (THATOI et al., 2014).

3.4 BIORREMEDIAÇÃO

Os métodos biológicos são económicos, seguros, sustentáveis e apresentam uma menor poluição residual (THATOI et al., 2014). Geralmente são processos de etapa única ou de poucas etapas, o que torna sua implementação mais conveniente (PRADHAN et al., 2017). A biorremediação abrange uma ampla gama de contaminantes, podendo ser combinada com outras tecnologias, aumentando assim a eficiência de todo o tratamento, que pode ser aprimorado e focado na remoção de poluentes perigosos específicos (ZOUBOULIS et al., 2018).

As tecnologias de biorremediação podem ser classificadas em duas categorias gerais. As técnicas *ex situ* requerem a remoção do material contaminado e o seu transporte para outra área para o tratamento, já as tecnologias *in situ* envolvem o tratamento de material contaminado no próprio local, ou seja, os microrganismos podem ser isolados de outra localidade e adicionados ao material a ser tratado, ou já podem estar presentes na área contaminada (ZOUBOULIS et al., 2018).

Além de abranger diversos métodos (Quadro 2), pode muitas vezes ser menos dispendiosa do que outras tecnologias de tratamento que poderiam ser aplicadas para o mesmo fim (JOBBOY et al., 2018; ZOUBOULIS et al., 2018).

Quadro 2 – Métodos biológicos mais amplamente utilizados.

MÉTODO	PRINCÍPIO
Atenuação natural	Organismos autóctones capazes de degradar contaminantes no próprio local; ocorre naturalmente, como uma “autolimpeza”.
<i>Bioaugmentation</i>	Adição de microrganismos autóctones ou alóctones com capacidade de biodegradar os contaminantes; frequentemente usada em biorreatores e sistemas <i>ex situ</i> .
Biofiltros	Aplicação de bactérias em filtros para a descontaminação de águas poluídas e resíduos; utilização de colunas de decapagem microbiana para tratar (principalmente) emissões atmosféricas ou odores (compostos voláteis).
Biossorção	Adsorção de metais e outros iões de uma solução aquosa pelo uso de materiais biológicos.
Bioestimulação	Estimulação do crescimento e desenvolvimento de microrganismos autóctones através da adição de nutrientes. Com o aumento da atividade metabólica se eleva também a biodegradação; pode ser realizado <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> .
Biorreatores	Biodegradação num recipiente ou reator; pode ser usado para tratar vários resíduos líquidos ou lamas; cinética de degradação rápida, mas capital relativamente alto para custo operacional.
Biolixiviação	Solubilização de metais promovida por microrganismos específicos como <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> e <i>T. thiooxidans</i> .
Bioventilação	Combina a ventilação do solo para remover os compostos voláteis com biorremediação que utiliza o oxigénio para estimular o crescimento e a atividade microbiana e promover a degradação de contaminantes orgânicos; geralmente realizado <i>in situ</i> ; não invasivo.
Biopilhas	O material a ser tratado é empilhado sobre um sistema com arejamento e adição de nutrientes.
Compostagem	Processo de tratamento aeróbio e termofílico; pode ser executado usando pilhas estáticas, pilhas arejadas ou reatores continuamente alimentados; baixo custo, mas prolongado tempo de tratamento; nutrientes podem ser adicionados, exigindo-se um elevado grau de mistura para aumentar o arejamento e ativar microrganismos.
<i>Land Farming</i>	O solo contaminado é organizado em pilhas e é periodicamente transformado por práticas agrícolas para estimular a degradação por microrganismos autóctones; pode ser realizada <i>in situ</i> ou em célula de tratamento construída.

Adaptado de Kavamura e Esposito 2010; Zouboulis et al. 2018.

A biorremediação consiste num processo pelo qual organismos vivos conseguem desintoxicar, degradar e/ou converter poluentes em formas menos tóxicas ou não tóxicas, transformando-os em inócuos ou reduzindo a sua disponibilidade para níveis abaixo dos limites de concentração estabelecidos pelas autoridades de controlo (ZOUBOULIS et al., 2018). É uma tecnologia ecologicamente viável para o tratamento de áreas contaminadas (SOTERO-MARTINS et al., 2014), realizada mais efetivamente por bactérias e fungos, devido ao seu baixo custo e baixa geração de resíduos finais (JOBBY et al., 2018).

A eficácia de um sistema de tratamento por biorremediação pode ser influenciada por características como a hidrogeologia, tipo de solo, propriedades físico-químicas do local contaminado e também por fatores como a temperatura, a presença e o tipo de microrganismos, a relação da concentração dos biorremediadores e dos poluentes, as propriedades físico-químicas do material a ser tratado, a extensão da contaminação e os objetivos de limpeza (JOBBY et al., 2018; ZOUBOULIS et al., 2018).

A alta concentração de metais pesados pode afetar diretamente a microbiota através da modificação do tamanho, diversidade e atividade da população (KAVAMURA e ESPOSITO, 2010). Um grande número de microrganismos apresenta a capacidade de se adaptar e colonizar ambientes contaminados, considerados inabitáveis para outros animais ou plantas (FERNÁNDEZ et al., 2018). Mesmo sendo altamente tóxicos para a maioria dos microrganismos, existem bactérias resistentes aos metais pesados e que podem ser capazes de os transformar em produtos de menor toxicidade, em virtude do aparato enzimático que possuem (SOTERO-MARTINS et al., 2014).

No caso do crómio, muitas espécies bacterianas possuem atividade de conversão do Cr (VI), altamente tóxico e solúvel, na sua forma trivalente, menos tóxica e com solubilidade muito inferior, por diferentes recursos (THATOI et al., 2014; PRADHAN et al., 2017). Assim, o primeiro passo nos estudos que visam a utilização de atividade microbiana na conversão de substâncias tóxicas em compostos menos nocivos é a busca por microrganismos que possam ser utilizados na biorremediação de ecossistemas contaminados (SOTERO-MARTINS et al., 2014).

Os microrganismos são capazes de adaptar diferentes estratégias para sobreviver num ambiente poluído por metais. Assim, diferentes microrganismos vêm sendo isolados e identificados como tendo a capacidade de remover o excesso de crómio no ambiente (JOBBY et al., 2018). Estes microrganismos podem ocorrer em associação a partículas de argila ou matéria orgânica, na rizosfera de plantas e em pequenas colónias nos poros entre as partículas (KAVAMURA e ESPOSITO, 2010).

No geral, as técnicas de biorremediação dependem da presença de microrganismos certos no local certo e com condições ambientais adequadas para que o processo ocorra com sucesso, pois são altamente suscetíveis aos parâmetros ambientais do local, que influenciam o crescimento microbiano e a taxa de degradação dos contaminantes (ZOUBOULIS et al., 2018).

A biossorção, a bioacumulação e a biotransformação (que pode mudar o estado oxidativo do metal em questão) são mecanismos baseados na natureza superficial do biossorvente e na disponibilidade de redutores para a remoção de metais através dos microrganismos (FERNÁNDEZ et al., 2018). Essas técnicas não apenas representam uma tecnologia em ascensão, mas também apresentam uma grande vantagem de serem mais econômicas quando comparadas aos métodos tradicionais de remediação (KAVAMURA e ESPOSITO, 2010).

3.4.1 Bactérias na biorremediação de crômio

Em virtude de algumas características que incluem rápido crescimento, metabolismo acelerado, plasticidade genética e ajustabilidade a uma variedade de ambientes, as bactérias são uma excelente escolha para a biorremediação (ZOUBOULIS et al., 2018). Assim, a remediação microbiana é o processo pelo qual os microrganismos são estimulados para degradar rapidamente os contaminantes perigosos para níveis ambientalmente seguros (ASHA e SANDEEP, 2013).

Microrganismos aeróbios, bem como anaeróbios, têm a capacidade de reduzir Cr (VI) a Cr (III) e tanto bactérias gram-negativas como gram-positivas, demonstraram a capacidade de remoção de Cr (VI) por biossorção ou biotransformação (JOBBY et al., 2018). Em procariontes e eucariontes, o Cr é transportado ativamente para dentro da célula através das membranas biológicas por transportadores de sulfato, sendo translocado com a ajuda de proteínas específicas de ligação ao metal e então reduzido a Cr (III), através de estados oxidativos altamente instáveis, como Cr (V) e Cr (IV) (JOBBY et al., 2018).

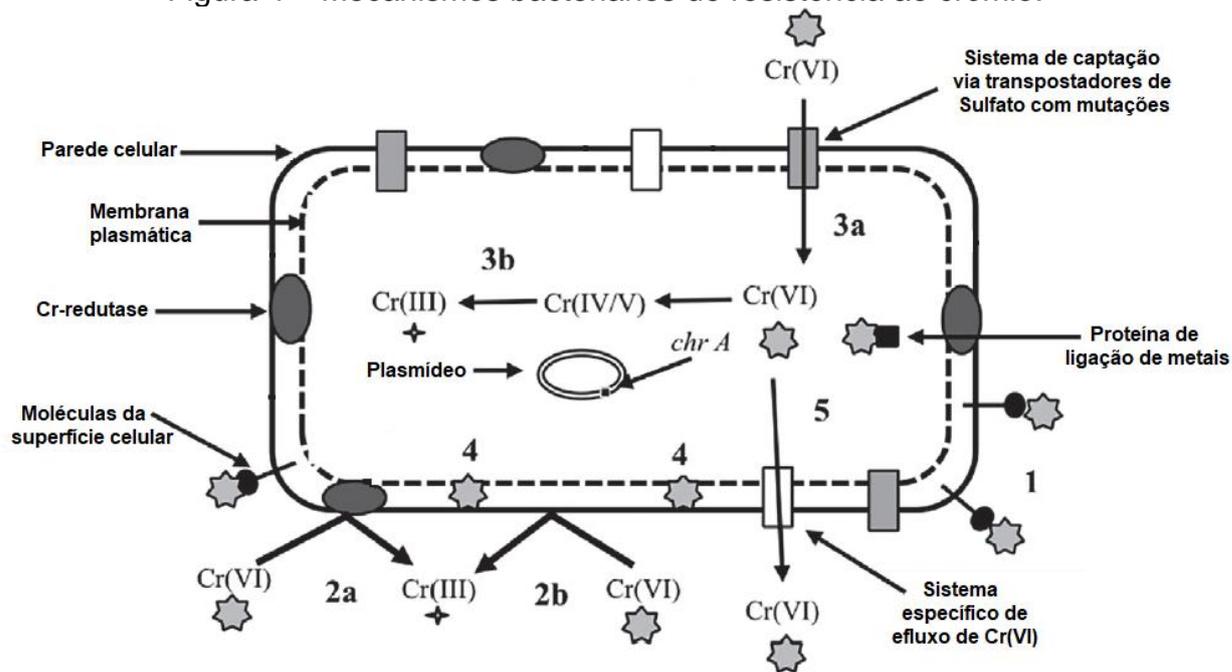
A resistência ao Cr (VI) foi relatada pela primeira vez em bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. por Romanenko e Korenkov em 1977, porém é importante salientar que a resistência e a redução do crômio não estão necessariamente inter-relacionadas, assim, nem todas as bactérias resistentes ao Cr (VI) podem reduzi-lo a Cr (III) (THATOI et al., 2014). A redução microbiana de Cr (VI) para Cr (III) é particularmente importante do ponto de vista da biorremediação, sendo considerado como um mecanismo adicional de resistência (CERVANTES et al., 2001).

Resistência é a capacidade de um microrganismo para sobreviver aos efeitos tóxicos da exposição a um determinado metal por meio de um mecanismo de desintoxicação produzido em resposta direta à espécie do metal em questão, já a

tolerância se refere à capacidade de um microrganismo sobreviver à toxicidade do metal por meio de propriedades e/ou modificação ambiental da toxicidade (GADD, 1992).

De acordo com a Figura 4, estes mecanismos de resistência e/ou remoção podem ocorrer de diversas formas numa célula bacteriana.

Figura 4 – Mecanismos bacterianos de resistência ao crómio.



Adaptado de Jobby et al. 2018.

Resumidamente, cada um dos mecanismos representados pelos números são: 1 - O crómio hexavalente é retido na parede celular da célula microbiana através da formação de ligações químicas com moléculas da superfície celular, que ocorrem entre o ião metálico e os grupos funcionais presentes nas estruturas da superfície celular, incluindo uma variedade de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e glicolipídeos; 2 - Redução extracelular: O Cr (VI) adsorvido pode ser reduzido em Cr (III) via enzima cromato redutase (2a) ou por conversão espontânea (2b); 3 - Redução intracelular- 3a: Cr(VI) entra na célula microbiana através do sistema de captação (mutação em transportadores de captação de sulfato codificados por cromossomas); 3b: Cr(IV) é reduzido a Cr (III) via intermediários altamente instáveis Cr (V/IV) no interior da célula e a translocação intracelular de Cr (VI) ocorre com a ajuda de proteínas de ligação do metal; 4 - Acumulação de Cr (VI) dentro da parede celular; 5 - O excesso de Cr (VI) é removido da célula através de sistema específico de efluxo de Cr do citoplasma. O transportador de proteína é codificado pelo gene

chrA (em *Pseudomonas aeruginosa*) que está presente em plasmídeos (JOBBY et al., 2018; THATOI et al., 2014).

A proteção de células bacterianas por enzimas de reparação de danos ao DNA causados por Cr (VI) é outro escudo de defesa, e além disso, existe também a ação de enzimas de eliminação de ROS para redução do *stress* oxidativo (THATOI et al., 2014). O Quadro 3 apresenta alguns mecanismos desenvolvidos por certas bactérias para ultrapassar a toxicidade do crômio, sendo consideradas então como alternativas para remoção deste metal pesado de um meio contaminado (FERNÁNDEZ et al., 2018).

Quadro 3 – Mecanismos de resistência ao Cr em diferentes bactérias.

BACTÉRIA	BIOSSORÇÃO	BIOACUMULAÇÃO	BIOTRANSFORMAÇÃO
<i>Acinetobacter</i> sp.	X		X
<i>Arthrobacter oxydans</i>			X
<i>Arthrobacter ps-5</i>	X		
<i>Arthrobacter viscosus</i>	X		X
<i>Bacillus amyloliquefacien</i>	X		X
<i>Bacillus cereus</i>	X		X
<i>Bacillus circulans</i>		X	
<i>Bacillus coagulans</i>	X		X
<i>Bacillus megaterium</i>	X		X
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	X	X	
<i>Bacillus subtilis</i>	X		X
<i>Bravibacterium</i> sp.			X
<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	X	X	X
<i>Corynebacterium paurometabolum</i>	X		X
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	X		
<i>Escherichia coli</i>	X		X
<i>Exiguobacterium</i> sp.			X
<i>Leucobacter</i> sp.			X
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	X		
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>			X
<i>Ochrobactrum</i> sp.	X		X
<i>Pannonibacter phragmitetus</i>			X
<i>Pantoea</i> sp.	X		
<i>Pediococcus acidilactici</i>			X
<i>Providencia</i> sp.			X
<i>Pseudomonas gessardii</i>			X
<i>Pseudomonas putida</i>	X		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	X		
<i>Serratia</i> sp.			X
<i>Streptomyces violaceoruber</i>			X
<i>Streptomyces werraensis</i>	X		

Adaptado de Fernández et al. 2018; Jobby et al. 2018 e Pradhan et al. 2017.

3.4.2 Biossorção

O fenómeno da biossorção é independente do metabolismo celular, ocorrendo essencialmente na parede celular (ACIOLY, 2014). Trata-se de um método no qual se utiliza microrganismos ou biomassa vegetal para remoção, recuperação ou retenção de metais pesados de um ambiente líquido (DA SILVA et al., 2014). É um processo físico-químico rápido, reversível e passivo, realizado por organismos ativos ou inativos e que ocorre entre o material biológico (biossorvente) e algum metal (sorbato) (FERNÁNDEZ et al., 2018). As espécies que serão adsorvidas, se encontram dissolvidas na fase líquida (DA SILVA et al., 2014).

O melhor desempenho de biomassa inativa em comparação com as células vivas ocorre devido à susceptibilidade das últimas aos efeitos tóxicos dos iões metálicos, que podem levar à morte celular durante o processo de remoção de metal (JOBBY et al., 2018). De acordo com a origem e o processamento da biomassa ou das espécies que serão utilizadas, os mecanismos envolvidos no processo de biossorção diferem qualitativa e quantitativamente, podendo incluir complexação, quelação, troca iónica, precipitação inorgânica ou adsorção (DA SILVA et al., 2014; FERNÁNDEZ et al., 2018).

A recuperação de metais em processos que usam células vivas pode ser difícil, especialmente se compartimentalizados ou internamente precipitados. Assim, o uso de biomassa morta possui algumas vantagens sobre células vivas, pois não se faz necessária a adição de nutrientes, é imune à toxicidade ou condições operacionais adversas, a recuperação de metais é mais fácil por meio de tratamentos que permitem a regeneração biomassa e a própria biomassa pode ser obtida de forma mais económica (FERNÁNDEZ et al., 2018).

3.4.3 Bioacumulação

A bioacumulação é um mecanismo dependente do metabolismo, que ocorre apenas em células vivas e requer energia para o transporte de Cr (VI) através da membrana das células, dependente também da concentração inicial de metal e do tempo de contato (FERNÁNDEZ et al., 2018). Na bioacumulação há absorção de substâncias tóxicas, através da membrana e do ciclo metabólico celular, que se acumulam intracelularmente (ACIOLY, 2014).

A principal limitação é a inibição do crescimento celular, que pode vir a ocorrer quando a concentração de metal é muito alta, assim, a compreensão do mecanismo pelo qual alguns microrganismos acumulam Cr (VI) é determinante para o desenvolvimento de processos de remoção, recuperação e concentração de soluções contaminadas (FERNÁNDEZ et al., 2018).

O custo é geralmente mais elevado e a taxa de captação relativamente mais lenta, uma vez que a acumulação intracelular é mais demorada se comparada com a biossorção, sendo que o processo envolve células vivas e, portanto, a manutenção dessas células, que são fortemente afetadas sob condições extremas de pH, de variação de temperatura, altas concentrações do metal e de sais (ACIOLY, 2014).

3.4.4 Biotransformação

Para os metais, os estados de oxidação mais altos são de 10 a 100 vezes mais tóxicos do que o menor estado de oxidação (THATOI et al., 2014). Existem diferentes microrganismos capazes de reduzir quase todas as espécies metálicas e metaloides, sendo a redução microbiana de Cr (VI) a Cr (III) o exemplo mais amplamente estudado de biorremediação de metais (THATOI et al., 2014).

As bactérias capazes de reduzir o Cr (VI) são chamadas de bactérias redutoras de crômio (CRB - *Chromium reducing bacteria*) (THATOI et al., 2014) e podem fazer isso por diferentes vias. No processo de redução não enzimática, o Cr (VI) reduz-se a Cr (III) na presença de compostos químicos produzidos no processo metabólico bacteriano (THATOI et al., 2014). Como exemplo, Fe (II) e o HS⁻, produtos finais metabólicos anaeróbios da redução bacteriana de ferro e sulfato, que podem reduzir o Cr (VI) (THATOI et al., 2014).

Na redução enzimática de Cr (VI), as enzimas utilizadas na remediação de ambientes são intracelulares (produzidas e retidas dentro das células microbianas) ou extracelulares (exportadas para fora das células) e a aplicação prática desse tratamento geralmente se depara com alguns desafios em termos de baixa atividade, baixa produtividade e estabilidade das enzimas (THATOI et al., 2014).

A produção de enzimas por microrganismos geralmente é baixa em suas condições naturais, mas pode ser melhorada, embora de forma limitada, em condições laboratoriais através da otimização dos parâmetros de crescimento, como por exemplo através da técnica de DNA recombinante (THATOI et al., 2014). Enzimas

de diferentes organismos, de bactérias a mamíferos, participam na redução do crómio hexavalente. Referentes aos mamíferos, as enzimas como aldeído oxidases, citocromo p450 e Dt-diaforase estão envolvidas na redução de Cr (VI), no entanto, as enzimas microbianas são mais importantes para redução de Cr (VI) do ponto de vista ambiental (THATOI et al., 2014).

Diferentes cromato-redutases (ChrR, YieF, NemA e LpDH) foram encontradas na fração citoplasmática (solúvel) ou ligadas à membrana que catalisa a reação sob condições aeróbicas ou anaeróbicas (ou às vezes ambas) e uma variedade de géneros de bactérias resistentes ao Cr com alto potencial de redução de Cr (VI) foi relatada, incluindo *Bacillus*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Escherichia* e *Thermus* (THATOI et al., 2014). Em bactérias dos géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Arthrobacter* a redução enzimática de Cr (VI) pode estar relacionada a proteínas citosólicas solúveis ou enzimas de membrana celular insolúveis (THATOI et al., 2014).

A redução anaeróbica de Cr (VI), é geralmente associada a redutases ligadas à membrana, como flavina-redutases, citocromos e hidrogenases, que podem fazer parte do sistema de transporte de eletrões e usar cromato/dicromato como aceitador terminal de eletrões durante a redução de Cr (VI) no espaço periplasmático por hidrogenase ligada à membrana ou citocromo reduzido (THATOI et al., 2014). Já a redução aeróbia de Cr (VI) é geralmente associada a proteínas e requer NAD(P)H como doador de eletrões. Por fim, a redução aeróbica e anaeróbica ocorre quando algumas bactérias são capazes de reduzir o cromato em ambas condições (THATOI et al., 2014).

3.5 FITORREMEDIAÇÃO

A palavra “Fitorremediação” é derivada da palavra grega *phyto* (planta média) e da palavra latina *remedium* (para corrigir ou remover um mal), sendo esta ideia sugerida pela primeira vez por Chaney em 1983 (SARWAR et al., 2017). É uma tecnologia que utiliza certas plantas superiores para remover poluentes de ambientes contaminados, principalmente do solo ou de águas (JOBBY et al., 2018; ZOUBOULIS et al., 2018).

Assim, a fitorremediação, como qualquer outro processo de remediação, destina-se à redução de substâncias nocivas ao ambiente e também à redução dos

teores de contaminantes a níveis compatíveis com a proteção à saúde humana e ambiental (ANDRADE et al., 2007). O estabelecimento de plantas em locais contaminados pode auxiliar na remoção de contaminantes por diversas técnicas (SARWAR et al., 2017).

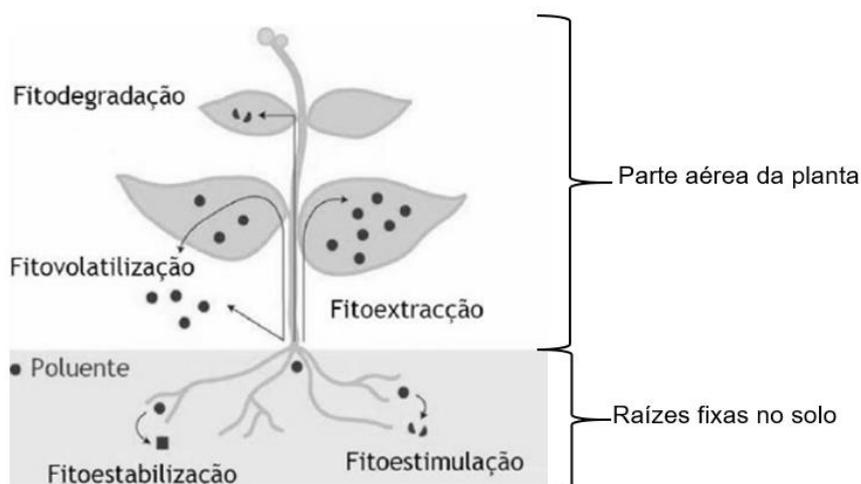
Conforme descritas no Quadro 4 e ilustradas na Figura 5, diferentes fitotecnologias fazem uso de diferentes propriedades das plantas (PILON-SMITS, 2005).

Quadro 4 – Principais técnicas de fitoremediação.

MÉTODO	MECANISMO DA PLANTA
Fitoextração	Absorção de contaminantes nas raízes e translocação para a parte aérea, com a subsequente remoção das plantas do local contaminado.
Fitotransformação	Absorção e degradação de compostos orgânicos pelas plantas.
Fitoestabilização/ Fitoimobilização	Exsudados radiculares ajudam a diminuir a mobilidade e/ou biodisponibilidade de um metal, diminuindo o transporte.
Fitodegradação / Rizodegradação	Degradação microbiana na planta / rizosfera.
Rizofiltração	Absorção, concentração e/ou precipitação de metais pelas raízes das plantas em áreas húmidas.
Fitovolatilização	Absorção do contaminante e volatilização para atmosfera através da parte aérea da planta. Aplicável a : solventes clorados (tetracloreto; triclorometano e tetraclorometano); selênio, mercúrio e hidrocarbonetos voláteis.

Adaptado de Asha e Sandeep 2013; Zouboulis et al. 2018.

Figura 5 – Processos presentes durante a fitoremediação.



Fonte: adaptado de Pilon-Smits 2005.

Esta técnica, que está relacionada com o uso de plantas verdes e de sua microbiota associada para remover, limitar e transformar diversos poluentes perigosos em inofensivos (PILON-SMITS, 2005; ZOUBOULIS et al., 2018), é considerada como uma alternativa não invasiva, económica e também complementar para outros métodos de remediação (PILON-SMITS, 2005). As diferentes técnicas de fitorremediação estão sendo testadas para remoção de diversas categorias de poluentes inorgânicos e orgânicos, incluindo metais pesados, solventes clorados, aromáticos, pesticidas, herbicidas, radionuclídeos, nutrientes, patógenos, petróleo e outros hidrocarbonetos (PILON-SMITS, 2005; ZOUBOULIS et al., 2018)

As plantas são sensíveis aos metais tóxicos em razão da seletividade para diferentes metais, e além da capacidade de absorção podem ainda realizar quelação de metais, podendo também alterar seu estado de oxidação (PRADHAN et al., 2017). Elevadas quantidades de metais pesados podem causar toxicidade severa nas plantas, perturbando processos enzimáticos, substituindo iões metálicos essenciais de fórmulas estruturais ou destruindo biomoléculas, modificando macromoléculas e alterando mecanismos antioxidantes de defesa (SARWAR et al., 2017).

Quando em contato com as raízes de uma planta, um metal pesado específico pode acumular-se nos tecidos da raiz ou translocar-se para as partes aéreas da planta, através do xilema, por vias simplásticas e/ou apoplásticas (SARWAR et al., 2017). As plantas podem imobilizar metais através da absorção e acumulação nas raízes, adsorção nas raízes ou precipitação dentro da rizosfera, sendo que estes processos reduzem a mobilidade do metal e a lixiviação em águas subterrâneas, reduzindo a biodisponibilidade do metal para entrada na cadeia alimentar (YOON et al., 2006).

A rizosfera é a interface da raiz da planta do solo e o lar de uma variedade de bactérias associadas às raízes, comumente chamadas de rizobactérias, em sua maioria benéficas, que influenciam positivamente o crescimento das plantas, que são referidas como rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (PGPR, de *Plant growth-promoting rhizobacteria*) (CHAUHAN et al., 2015; PANDEY, 2020). As PGPR são um grupo importante de inoculantes microbianos que foram estudados extensivamente por sua capacidade de promover o crescimento de plantas e melhorar a produtividade, operando por meio de mecanismos diretos ou indiretos, ou uma combinação de ambos, minimizando o impacto ambiental do uso intensivo de produtos químicos (CHAUHAN et al., 2015).

Existem PGPR sobre as quais há informações consideráveis disponíveis, como *Azoarcus*, *Exiguobacterium*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus* e *Pantoea*, mas tais organismos não atingiram escalas comerciais de produção, ao contrário de seus antecessores mais conhecidos, ganhando importância na pesquisa em razão do aumento da disponibilidade de ferramentas moleculares, para o estudo de vários habitats e a revelação dos modos de ação de inúmeras espécies bacterianas (CHAUHAN et al., 2015).

A seleção de plantas para essas técnicas exige alguns critérios, como por exemplo tolerância a metais, ciclo de vida curto e alto fator de bioacumulação, pois alguns dos métodos de fitorremediação só são viáveis devido ao potencial que algumas plantas têm de acumular metais nos seus tecidos (KAVAMURA e ESPOSITO, 2010). Os metais pesados podem causar severa fitotoxicidade e podem atuar para promover a evolução de populações de plantas tolerantes, sendo então possível identificar espécies de plantas tolerantes a metais a partir da vegetação natural existente em locais que estão contaminados (YOON et al., 2006).

A tolerância a metais pesados é um pré-requisito indispensável para processos de fitorremediação, pois quanto maior a tolerância, maior será a acumulação de metal nos seus tecidos vegetais, sem efeitos adversos na saúde da planta (SARWAR et al., 2017). Esta característica é determinada pelo equilíbrio iônico e pela capacidade de homeostase para regular metais e metaloides nos tecidos vegetais, que é regulada principalmente pelos processos de transcrição e pós-tradução, em que muitos genes estão envolvidos (SARWAR et al., 2017).

Geralmente espécies que podem acumular alta concentração de metais pesados em suas partes aéreas são supostamente melhores para processos de fitorremediação e são chamadas de plantas hiperacumuladoras (SARWAR et al., 2017). Estas plantas, que podem acumular alta concentração de metais na sua biomassa acima do solo, incluem árvores, hortaliças, ervas e ervas daninhas (YOON et al., 2006).

Segundo Baker e Brooks (1989), as hiperacumuladoras são definidas como plantas que acumulam mais de 1000 mg kg^{-1} de Cu, Co, Cr, Ni ou Pb, ou mais 10000 mg kg^{-1} de Mn ou Zn. Os metais são geralmente acumulados em vacúolos, que são organelos celulares com baixa atividade metabólica, e este é um dos mecanismos desenvolvidos pelas plantas hiperacumuladoras para manter o metal prejudicial longe de importantes processos metabólicos celulares (SARWAR et al., 2017). As plantas

tolerantes tendem a restringir as transferências solo-raiz e raiz-parte aérea, possuindo uma menor acumulação na sua biomassa, enquanto as hiperacumuladores ativamente retiram e translocam os metais para as partes aéreas (YOON et al., 2006).

Dentre os índices de fitorremediação, os fatores de bioconcentração (BCF) e o fator de translocação (TF) podem ser utilizados para estimar o potencial de uma planta para este fim. A capacidade de uma planta de acumular metais do meio pode ser estimada usando o BCF, que é definido como a razão de concentração de determinado metal nas raízes em relação ao meio em que se encontram (YOON et al., 2006). Já a capacidade de uma planta para translocar metais das raízes para as partes aéreas é medida usando o TF, que é definido como a razão entre a concentração de metal na parte aérea e nas raízes (YOON et al., 2006). Comparando BCF e TF, podemos verificar a capacidade de diferentes plantas em absorver metais dos solos ou da água e translocá-los para as partes aéreas.

As principais vantagens da fitorremediação são o baixo capital inicial necessário e custo de manutenção bem reduzido, além de baixo impacto ambiental por ser uma técnica não-invasiva, de fácil arranque e aplicabilidade em larga escala, com elevada aceitação do público, por proporcionar uma agradável paisagem, que eventualmente resulta como subproduto (ZOUBOULIS et al., 2018).

As limitações que precisam ser cuidadosamente consideradas envolvem questões como a necessidade de um período maior de tempo do que as abordagens tradicionais (podendo levar alguns anos para uma remediação eficaz), potencial interferência prejudicial da vegetação caso entre na cadeia alimentar, dificuldades em estabelecer e manter níveis desejáveis de vegetação adequada em locais que são fitotóxicos, devido a fatores como a falta de conhecimento da “biologia” da planta e também em virtude da biodisponibilidade dos metais que pode variar de acordo com fatores ambientais (ZOUBOULIS et al., 2018).

Estas inevitáveis limitações obrigam os pesquisadores a modificar as abordagens tradicionais para assegurar a aplicação em grande escala desta técnica, como por exemplo a utilização de plantas geneticamente modificadas, a fitorremediação quimicamente assistida, usando plantas não acumuladoras (através do uso de quelantes) ou assistida por microrganismos (SARWAR et al., 2017).

Alguns microrganismos vivem em associação com raízes de plantas, outros vivem livres, sendo que, independentemente da situação apresentada, a utilização de inóculos microbianos adequados podem ajudar espécies de plantas a

remediar metais pesados de forma mais eficaz (SARWAR et al., 2017). As interações entre microrganismos e plantas foram amplamente investigadas durante os últimos 50 anos, entretanto, esses estudos visaram principalmente as interações planta-patógeno, e somente há pouco mais de 20 anos que a ecologia dos microrganismos na rizosfera foi focada em processos de descontaminação (KAVAMURA e ESPOSITO, 2010).

De diferentes maneiras e em conjunto com seus microrganismos rizosféricos as plantas podem ser utilizadas para fitorremediação, sendo que fatores como pH do meio, presença de matéria orgânica, exsudados radiculares, biomassa microbiana e a presença de cátions competitivos podem afetar a disponibilidade de metais pesados e conseqüentemente, a eficiência da técnica escolhida (SARWAR et al., 2017).

3.5.1 Macrófitas aquáticas

As plantas cujas partes fotossinteticamente ativas estão durante o ano todo ou por alguns meses do ano submersas em água, bem como as que estão flutuantes em sua superfície, são classificadas como plantas aquáticas vasculares ou macrófitas aquáticas (ANDRADE, 2007). A definição do termo não é consensual em virtude da heterogeneidade filogenética e taxonômica, tratando-se de um grupo evolutivo recente, que segundo o Programa Biológico Internacional, compreende plantas de diferentes grupos que habitam desde áreas alagáveis até ecossistemas verdadeiramente aquáticos (ESTEVES, 2011; TUNDISI e TUNDISI, 2008).

As macrófitas também podem ser denominadas rizófitas quando as raízes as sustentam, limnófitas quando são encontrados totalmente submersas, anfífitas quando possuem sistemas de flutuação e helófitas quando estruturas emersas estão presentes (TUNDISI e TUNDISI, 2008). Frequentemente essas plantas prejudicam os múltiplos usos dos cursos hídricos por se proliferarem de forma indesejada, porém também têm sido utilizadas de forma promissora na recuperação de ambientes degradados, em sistemas de tratamento de efluentes, como plantas ornamentais e principalmente, na despoluição de ambientes aquáticos, como bioindicadoras da qualidade da água (ANDRADE, 2007).

Exemplos de classificação estão ilustradas na Figura 6 e também descritas no Quadro 5.

Figura 6 – Tipos de macrófitas aquáticas.



Legenda:

- 1 – Submersas fixas/enraizadas
- 2 – Submersas livres
- 3 – Flutuantes fixas
- 4 – Flutuantes livres
- 5 – Emergentes
- 6 – Anfíbias ou semiaquáticas - vivem bem tanto nas áreas inundadas quanto fora da água.
- 7 – Epífitas/epifíticas - vivem em outras plantas aquáticas.

Fonte: adaptado de Tundisi e Tundisi 2008.

Quadro 5 – Caracterização das macrófitas aquáticas quanto ao modo de vida.

CLASSIFICAÇÃO	DEFINIÇÃO	EXEMPLOS
Macrófitas aquáticas emergentes/ emersas	Plantas enraizadas no sedimento e com folhas fora d'água (parcialmente submersas). Produzem órgãos reprodutivos aéreos e localizam-se em regiões rasas (1,5 m de água).	<i>Typha</i> , <i>Pontederia</i> , <i>Echinodorus</i> e <i>Eleocharis</i> .
Macrófitas aquáticas flutuantes fixas / com folhas flutuantes	Plantas enraizadas no sedimento, com folhas e com órgãos reprodutores aéreos ou flutuantes. Principais angiospermas que ocorrem em regiões com profundidades de 0,5 a 3,0 m.	<i>Nymphaea</i> , <i>Vitoria</i> e <i>Nymphoides</i> .
Macrófitas aquáticas fixas / submersas enraizadas	Plantas que crescem totalmente submersa na água, enraizadas no sedimento. A maioria tem seus órgãos reprodutivos flutuando na superfície ou aéreos.	<i>Myriophyllum</i> , <i>Elodea</i> , <i>Egeria</i> , <i>Hydrilla</i> , <i>Vallisneria</i> , <i>Mayacae</i> e <i>Potamogeton</i> .
Macrófitas aquáticas submersas livres	Plantas que permanecem submersas na água em locais de pouca turbulência e com rizóides pouco desenvolvidos. Emitem flores emersas durante o período reprodutivo	<i>Utricularia</i> e <i>Ceratophyllum</i> .
Macrófitas aquáticas flutuantes livres	Flutuam livremente na superfície da água, sem raízes no substrato. Possuem órgãos reprodutivos aéreos ou flutuantes e geralmente seu desenvolvimento máximo ocorre em locais protegidos pelo vento.	<i>Eichhornia</i> , <i>Salvinia</i> , <i>Pistia</i> , <i>Lemna</i> e <i>Azolla</i> .

Adaptado de Esteves 2011; Tundisi e Tundisi 2008.

O Brasil possui grande biodiversidade de macrófitas aquáticas com grande potencial para fitorremediação, sendo muito importante a utilização de plantas nativas neste processo, por geralmente serem melhores em termos de adaptação, sobrevivência, crescimento e reprodução sob *stress* ambiental, do que plantas

introduzidas de outros ambientes (YOON et al., 2006). O conhecimento das espécies de macrófitas presentes naturalmente numa determinada região, bem como a análise da concentração dos metais pesados presentes nessa planta são essenciais para direcionar futuros estudos no que se refere à aplicação de técnicas de fitorremediação (DEMARCO et al., 2016).

As espécies recolhidas no Arroio Santa Bárbara em Pelotas/RS (Brasil) presentes no Quadro 6 foram identificadas pelo Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, através da análise de material fresco e de fotografias digitais, com auxílio das metodologias propostas por Irgand e Gastal (1996) e Pott e Pott (2000) (DEMARCO et al., 2016).

Quadro 6 – Macrófitas aquáticas identificadas no Arroio Santa Bárbara por Demarco et al. 2016.

FAMÍLIA	ESPÉCIE
Alismataceae	<i>Sagittaria montevidensis</i>
Araceae	<i>Lemna valdiviana</i>
Araceae	<i>Pistia stratiotes</i>
Araliaceae	<i>Hydrocotyle ranunculoides</i>
Asteraceae	<i>Enydra anagallis</i>
Poaceae	<i>Hymenachne grumosa</i>

Adaptado de Demarco et al. 2016.

3.5.2 *Hymenachne grumosa*

Para o presente estudo foi escolhida a macrófita aquática *Hymenachne grumosa* pelo fato dessa planta ser encontrada durante as coletas realizadas pelo Grupo do Laboratório de Química Ambiental da UFPel em duas épocas diferentes, e também por ser encontrada em maior quantidade em setembro de 2018, durante uma observação no local de estudo.

Além disso, através das análises realizadas durante o trabalho de Demarco et al. em 2016, foi observado que essa macrófita apresentou concentração total de cromo de 21,54 mg kg⁻¹, sendo 6,41 mg kg⁻¹ na parte aérea e 15,13 mg kg⁻¹ na raiz. Isso a considerou com bom potencial para uso em técnicas de fitorremediação pela rizofiltração e fitorremocção dos contaminantes, pois com relação aos teores obtidos na água, é possível verificar que possui alto valor de Fator de Bioconcentração (BCF) e baixo de Fator de Translocação (TF), apresentando então a capacidade de

bioconcentrar elementos e mantê-los em maiores concentrações em suas raízes (DEMARCO et al., 2016).

H. grumosa, cuja classificação taxonômica está apresentada no Quadro 7, é conhecida popularmente como capim-canivão, palharal ou canival, atinge até 2m de altura e é considerada como uma gramínea que se adapta tanto em situações de solo inundado quanto em solo temporariamente seco, ocorrendo em pântanos ou às margens de canais, favorecendo a fixação de macrófitas flutuantes (MMA, 2006).

Quadro 7 – Classificação taxonômica *Hymenachne grumosa* (Ness) Zuloaga.

Domínio	Eukaryota
Reino	Plantae
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Subclasse	Commelinidae
Ordem	Poales
Família	Poaceae
Subfamília	Panicoideae
Gênero	<i>Hymenachne</i>
Espécie	<i>Hymenachne grumosa</i> (Nees) Zuloaga
Basinômio	<i>Panicum grumosum</i> Nees

Fonte: adaptado de Re flora 2019 e Filgueiras 2015.

Possui hábito perene, rizomas alongados e colmos eretos com 130 a 200 cm de comprimento. As inflorescências são compostas por uma panícula de 15 a 45 cm de comprimento, as flores possuem 3 anteras e os frutos são cariopses obovoides de cor marrom claro e com 1,1 a 1,3 mm de comprimento (REFLORA, 2019).

É uma planta nativa da América do Sul, que ocorre principalmente no noroeste da Argentina, sul do Brasil, Paraguai e Uruguai (FILGUEIRAS, 2015; KEWSCIENCE, 2019). No Brasil, as ocorrências confirmadas são nas regiões Nordeste (Bahia, Pernambuco), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), ocorrendo nos domínios fitogeográficos Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (FILGUEIRAS, 2015).

Esta planta já foi utilizada em outros estudos, na aplicação de leitos construídos de macrófitas (LCMs) para o tratamento de efluentes secundários, sendo comprovadamente efetiva para o aporte de catiões e aniões, que configuram carga poluente nos esgotos domésticos (SILVEIRA, 2010). Foi utilizada também como organismo-teste em dois sistemas de tratamento de efluentes, apresentando

resultados nos quais, do ponto de vista da ecotoxicologia, representa uma alternativa promissora para remover toxicidade de efluentes domésticos (MOHR et al., 2015).

Em outro estudo, investigou-se a combinação de LCMs, cultivados com *H. grumosa*, com a ozonização fotocatalítica (UV/TiO₂/O₃) para o tratamento de esgoto urbano, apresentando esta planta também como uma alternativa interessante para o tratamento de poluentes tóxicos e não biodegradáveis (HORN et al., 2014).

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1 Controlo do crescimento bacteriano

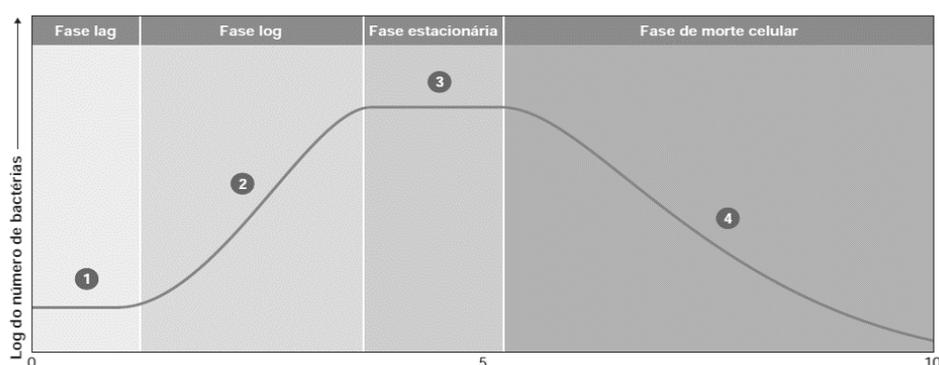
Em microbiologia, utiliza-se a palavra crescimento para fazer referência a um aumento no número de células em função do tempo, em consequência da divisão celular (MADIGAN et al., 2016). Há quatro fases básicas de crescimento bacteriano, que estão resumidas no Quadro 8 e demonstradas na Figura 7.

Quadro 8 – Resumo das fases do crescimento bacteriano.

FASE	DESCRIÇÃO
Fase lag	- Intensa atividade de preparação para o crescimento populacional; - Ocorre pouca ou nenhuma alteração no número de células, mas a atividade metabólica é intensa.
Fase log	- As bactérias se multiplicam em alta velocidade, considerando as condições fornecidas pelo meio; - Aumento logarítmico ou exponencial da população.
Fase estacionária	- Período de equilíbrio entre a divisão (produção de novas células) e a morte celular.
Fase de morte celular	- O número de mortes excede o número de novas células formadas; - A população reduz -se a uma taxa logarítmica.

Adaptado de Madigan et al. 2016; Tortora et al. 2012.

Figura 7 – Fases do crescimento bacteriano.



Fonte: adaptado de Tortora et al., 2012.

Um dos métodos indiretos utilizados para estimar o número de bactérias numa solução é a turbidimetria, na qual o instrumento utilizado para medir a turbidez é um espectrofotômetro, que mede a quantidade de luz que atravessa uma suspensão celular (TORTORA et al., 2012). Segundo a Lei de Beer, a intensidade de luz absorvida é diretamente proporcional à concentração de uma substância (BASQUES, 2016). Assim, à medida que os microrganismos se multiplicam num meio líquido, mais turva se torna a suspensão, e com o aumento do número de bactérias, maior quantidade de luz será dispersa e menos luz atingirá o detetor (MADIGAN et al., 2016; TORTORA et al., 2012).

Também denominada densidade ótica ou DO, a absorvância (A) é aplicada para representar graficamente o crescimento bacteriano (TORTORA et al., 2012). A correlação das contagens em placas e das leituras de absorvância podem ser utilizadas para estimativas futuras do número de bactérias obtidas pela medida de turbidimetria (MADIGAN et al., 2016; TORTORA et al., 2012).

A unidade de medida da turbidez corresponde a densidade ótica no comprimento de onda especificado, como por exemplo, DO600 para medidas de densidade ótica a 600nm. Um nanómetro (nm) é igual a 10^{-9} metros, sendo a unidade empregue para medida do comprimento de onda (BASQUES, 2016). A determinação do número de bactérias por turbidimetria ocorre através da inoculação de bactérias num meio líquido de crescimento, com leituras em intervalos regulares, possibilitando representar graficamente a curva de crescimento bacteriano (TORTORA et al., 2012).

3.6.2 Quantificação de crómio

3.6.2.1 Espectroscopia de absorção atômica

A espectroscopia de absorção atômica (AAS, de *Atomic Absorption Spectrometry*) envolve a medida da absorção da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos livres no estado gasoso (KRUG et al., 2004; SCHIAVO, 2013). A luz é absorvida somente quando a energia corresponde à energia necessária para provocar uma transição na substância, podendo esta energia ser eletrónica (através de mudanças nas distribuições dos eletrões), vibracional ou rotacional (ALVES, 2011).

O princípio da AAS consiste em gerar uma nuvem de átomos no estado fundamental, incidir na nuvem de átomos uma radiação com comprimento de onda adequado e então diferenciar o sinal de absorção atômica do sinal de absorção de fundo (espalhamento de radiação e absorção molecular) (SCHIAVO, 2013). A técnica de absorção utiliza esse fenômeno para a determinação quantitativa de elementos como metais, semimetais e alguns não metais numa ampla variedade de amostras, tais como materiais biológicos, ambientais, geológicos, tecnológicos e alimentos (KRUG et al., 2004).

É um método baseado na absorção de luz por átomos no estado atômico livre, baseada na Lei de Beer – Lambert e os dois tipos de atomizadores mais utilizados em AAS são o forno de grafite e chama (ALVES, 2011).

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, de *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} em amostras líquidas ou gasosas, enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (ETAAS, de *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*) é utilizada para determinações de baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras líquidas ou sólidas (ALVES, 2011; KRUG et al., 2004).

3.6.3 Identificação molecular do isolado

3.6.3.1 Reação em cadeia da polimerase

As amostras ambientais geralmente não contêm células suficientes dos microrganismos alvo para produzir uma detecção direta, assim, é utilizada uma técnica para amplificar exponencialmente uma sequência alvo específica e, como consequência, aumentar sua concentração relativa, após a extração do DNA total da amostra (BERTRAND et al., 2011).

A reação em cadeia da polimerase (PCR, de *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica na qual pequenas sequências específicas de Ácido Desoxirribonucleico (DNA, de *deoxyribonucleic acid*) podem ser rapidamente amplificadas, aumentando sua quantidade até níveis detectáveis, permitindo, por exemplo, o sequenciamento de genes para identificação e o diagnóstico de presença ou ausência de microrganismos específicos (TORTORA et al., 2012).

Segundo Madigan et al. (2016), a PCR amplifica sequências específicas de DNA da seguinte forma: 1) Desnaturação térmica do DNA-alvo para que ocorra a separação da dupla cadeia; 2) adição de grandes quantidades de dois iniciadores (*primers*), um complementar à cadeia-alvo e outro à cadeia complementar, juntamente com enzimas DNA-polimerase, que produzem cópias de moléculas de DNA; 3) após o emparelhamento dos *primers*, sua extensão gera uma cópia do DNA original de PCR; 4) a mistura é novamente aquecida para separar as cadeias após uma fase de incubação; 5) a mistura é então arrefecida, para permitir a hibridização dos *primers* nas regiões complementares dos DNA recém-sintetizados, repetindo-se assim, todo o processo.

Os reagentes necessários são acondicionados num tubo e colocado no termociclador, que é ajustado para o tempo, a temperatura e o número de ciclos desejados (TORTORA et al., 2012). Os termocicladores, realizam ciclos automáticos de aquecimento e arrefecimento, sendo realizados geralmente 20 a 30 ciclos para promover o aumento na quantidade da sequência-alvo (MADIGAN et al., 2016). A utilização da DNA-polimerase, retirada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, possibilita a utilização de termocicladores automatizados, pois esta enzima pode sobreviver à fase de aquecimento sem ser destruída (TORTORA et al., 2012).

3.6.3.2 Sequenciamento de DNA

A partir do DNA amplificado é possível obter informações para determinação da sequência exata de bases nucleotídicas do DNA através do processo de sequenciamento (TORTORA et al., 2012). As alterações na sequência de nucleotídeos entre dois organismos ocorrem em função do número de mutações que acumularam desde que compartilharam um ancestral comum, assim, é possível inferir também sobre relações evolutivas, através das diferenças nas sequências de DNA (MADIGAN et al., 2016)

De acordo com Tortora et al. (2012), inicialmente o DNA amplificado é digerido com enzimas de restrição, gerando milhares de fragmentos de diversos tamanhos. Estes fragmentos são colocados numa canaleta, na extremidade de uma camada de gel de agarose e então uma corrente elétrica é passada através deste gel. Durante o tempo em que a carga é aplicada, os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos migram com diferentes velocidades através do gel. Os fragmentos que foram

separados e os chamados de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs, de *restriction fragment length polymorphisms*) são transferidos para um filtro por absorção (*blotting*) e expostos a uma sonda radioativa, produzida a partir do gene de interesse amplificado (TORTORA et al., 2012).

Se a sequência do gene for conhecida, é possível usar *softwares* projetados para fornecer *primers*, verificando a especificidade, comparando sua sequência em bancos de genes, usando por exemplo, o *software Blastn* no NCBI (BERTRAND et al., 2011). Se a sequência a ser amplificada não for conhecida para o organismo alvo, uma possibilidade é comparar as sequências de genes conhecidos para diferentes organismos (por exemplo, para alinhamento de sequência global com o *software Clustal*) e selecionar áreas conservadas como sequências potenciais, atentando para sua especificidade e evitando incompatibilidades (hibridização de bases não complementares) (BERTRAND et al., 2011).

Para que se desenvolva uma filogenia, após a obtenção da sequência de DNA de um gene, deve-se alinhar essa sequência com outras sequências de genes homólogos, relacionadas por uma ancestralidade comum, de outras linhagens ou espécies (MADIGAN et al., 2016). Para procurar regiões codificadoras de proteínas, programas computacionais podem ser utilizados. As sequências de DNA são armazenadas no banco de dados chamado *GenBank*, onde informações genômicas podem ser adicionadas e comparadas, em busca de padrões semelhantes nos genomas de organismos diferentes (TORTORA et al., 2012).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

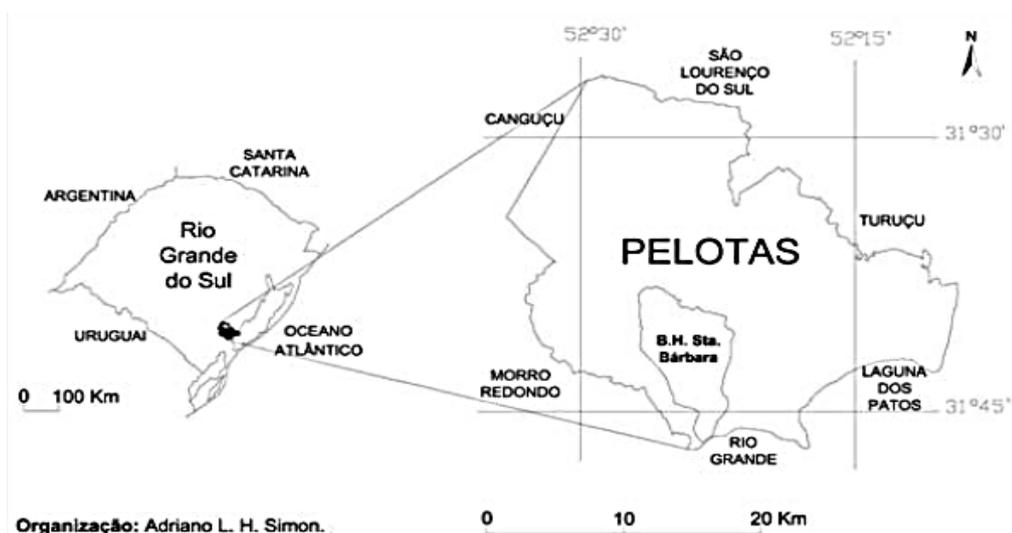
A cidade de Pelotas, que possui cerca de 300.000 habitantes, está localizada na região sudeste do estado do Rio Grande do Sul (RS), a cerca de 250 km da capital, Porto Alegre (CORADI et al., 2009).

Entre os sistemas hidrográficos que compõem este município, a bacia hidrográfica do Arroio Santa Bárbara localiza-se na porção sudoeste, numa área de aproximadamente 83 km² (Figura 8), sendo caracterizada por apresentar um dos maiores índices de ocupação urbana (SIMON et al., 2010).

Pelotas é um polo geoeconômico da região Sul do Brasil e um dos mais importantes municípios gaúchos, assim, as transformações espaciais ocorridas na

bacia Santa Bárbara representam um processo motivado principalmente pela redução das áreas de mata nativa e pela expansão da área urbana (SIMON et al., 2010; 2007).

Figura 8 – Localização do município de Pelotas – RS.



Fonte: adaptado de Simon et al. 2010.

No entorno do canal do Arroio Santa Bárbara, nas áreas ainda preservadas, a vegetação ciliar é composta predominantemente por pântanos, que possuem a função natural de absorção das águas durante os períodos de chuva intensa, e também por gramíneas de 0,1 a 2 m, plantas aquáticas e vegetações implantadas após a canalização do curso, que ajudam a impedir o seu assoreamento (SIMON et al., 2007).

Conforme previsto no Novo Código Florestal Brasileiro, através da Lei Nº 12.651 de 25 de maio de 2012, os cursos d'água com até 10 metros de largura devem apresentar uma faixa de mata ciliar em ambas margens com uma largura de, no mínimo, 30 metros, que são consideradas áreas de preservação permanentes (APP) (BRASIL, 2012). A maior parte do Arroio Santa Bárbara se enquadra nesse perfil e sendo assim, deveriam ser mantidas e preservadas as florestas e outras formas de vegetação ciliar situadas nesta faixa (SIMON et al., 2007).

Como já consolidadas anteriormente, estas áreas que deveriam ser destinadas para a proteção do curso hídrico não existem na maior parte do percurso. Isso ocorre, principalmente, em virtude da ação estrutural originada por atividades antrópicas, enfatizando a importância do acompanhamento, monitorização e controle deste curso hídrico (CORADI et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO INICIAL

Toda a vidraria e os materiais utilizados nas análises, como ponteiras, frascos, tubos Eppendorf e Falcon, foram previamente preparados antes de sua utilização. A vidraria e os itens reutilizáveis foram lavados com sabão neutro, enxaguados em água corrente e deixados de molho por, no mínimo, 4 horas em solução de limpeza (1:HNO₃ + 2:H₂SO₄ + 9:H₂O), para remoção de qualquer contaminante, principalmente Cr residual, passando por nova lavagem com água destilada.

Os materiais foram então devidamente preparados/embalados/acondicionados e esterilizados em autoclave vertical (Phoenix Luferco AVPlus), por 15 min a 121°C. Após isso, todo o material, meio de cultura ou solução autoclavados foram arrefecidos em temperatura ambiente e colocados em estufa a 30°C por 24h, para verificação de que nenhuma colônia se desenvolveria nesse período, garantindo assim a eficiência do processo de esterilização.

4.1.1 Soluções

A balança utilizada para pesagem dos reagentes, tanto das soluções como dos meios de cultura e também das raízes, marca BEL Engineering, modelo M254Ai, fica localizada em sala separada, anexa ao laboratório. Na preparação das soluções e meios de cultura foi utilizada água proveniente de destilador (Quimis), e os detalhes seguem abaixo.

4.1.1.1 Solução salina

Foram utilizados 0,85 gramas de cloreto de sódio (PA), marca Proquimios, para cada 100mL de água. O sal foi completamente diluído e o frasco contendo a solução foi encaminhado para esterilização.

Todas as vezes em que o termo “solução salina” for utilizado, refere-se à solução autoclavada de NaCl a 0,85%.

4.1.1.2 Solução mãe de crômio

A solução mãe de crômio foi preparada com 1000 mg L⁻¹ de cloreto de Cr (III) hexahidratado PA (CrCl₃.6H₂O), marca Dinâmica Química Contemporânea LTDA, e serviu de base para os cálculos e preparação dos meios de culturas utilizados nos testes seguintes, cujas concentração variam conforme a necessidade para a realização de cada um dos testes.

4.1.2 Meios de cultura

Para aferição do pH dos meios de cultura, foi utilizado um potenciômetro (MS Tecnopon, modelo mPa-210), após realização de calibração com soluções tampão pH 4 e 7 ou 7 e 10, conforme a faixa de trabalho.

4.1.2.1 Caldo nutriente

O meio de cultura líquido, a partir de agora denominado como CN, foi preparado com Caldo Nutriente (marca Kasvi – extrato de carne: 1,0 g L⁻¹; extrato de levedura: 2,0 g L⁻¹; peptona: 5,0 g L⁻¹ e cloreto de sódio: 5,0g L⁻¹) na proporção de 13g para cada 1000mL de água destilada, conforme recomendação do fabricante. A concentração foi calculada para 50 mg Cr L⁻¹ (TIRRY et al., 2018) e então o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M (WANI et al., 2018).

Foram colocados 10mL de CN em tubos de vidro, que entreabertos foram autoclavados, fechados e posteriormente incubados para teste de esterilidade. Após este período, o CN foi mantido sob refrigeração até a utilização nos testes subsequentes. Este meio de cultura líquido foi considerado como padrão, porém passou por algumas alterações nas concentrações de Cr e no pH para a realização de alguns testes posteriores.

4.1.2.2 Ágar nutriente

O meio de cultura sólido utilizado nas placas de Petri, a partir de agora denominado como AN, foi preparado com Ágar-ágar bacteriológico (marca Dinâmica Química Contemporânea LTDA) na proporção de 15g para cada 1000mL de água

destilada e caldo nutriente (marca Kasvi, descrito no item anterior) na proporção de 13g para cada 1000mL de água destilada, conforme recomendação dos fabricantes. A concentração foi calculada para 50 mg Cr L⁻¹ (TIRRY et al., 2018) e então o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M (WANI et al., 2018).

Este meio de cultura foi autoclavado no frasco em que foi preparado, e colocado ainda quente nas placas de Petri, já previamente esterilizadas, que então foram solidificadas e levadas para realização do teste de esterilidade. Após este período, as placas com AN foram mantidas sob refrigeração até a utilização. Este meio de cultura sólido foi considerado padrão para o crescimento e manutenção das estirpes bacterianas, não tendo a sua concentração ou pH sido alterados.

4.2 RECOLHA DO ESPÉCIME DE *H. grumosa*

Um espécime de *H. grumosa* foi recolhida no Arroio Santa Bárbara (Figura 9) em Pelotas/RS no mês de novembro de 2018, acondicionada em recipiente esterilizado e encaminhada até o LQA da UFPel, onde foram separadas a parte aérea das raízes. Essas últimas, que são a parte de interesse deste estudo, foram cuidadosamente lavadas com solução salina para a remoção de partículas grosseiras indesejadas. Com auxílio das metodologias propostas por Irgand e Gastal (1996) e Pott e Pott (2000), a identificação da espécie foi realizada pelo Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Figura 9 – Arroio Santa Bárbara e espécime de *H.grumosa*.



4.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO CRÓMIO

Após a lavagem das raízes, uma porção de aproximadamente 1g foi pesada, colocada em 100 mL de solução salina num Erlenmeyer e, durante 30 minutos, permaneceu em agitador magnético, a fim de desagregar os microrganismos das raízes. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, foi utilizada uma alíquota de 100µL do sobrenadante da solução com as raízes para a realização de diluições seriadas até 10^{-4} , em microtubos Eppendorf contendo 900µL de solução salina (GALDIANO JR., 2009).

Após cada diluição, sucessivamente, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em placas de Petri com o meio AN, e espalhadas com alça de Drigalski. Por fim, foram incubadas a 30°C por 24 horas (PATTANAPIPITPAISAL et al., 2001; TIRRY et al., 2018; WANI et al., 2018).

4.4 CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS RESISTENTES

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados em câmara de fluxo laminar para garantir a assepsia. Após as 24h de incubação, as placas das diluições seriadas foram comparadas e então foi escolhida a diluição 10^{-1} , pois apresentava o maior número de colônias isoladas, facilitando a observação e a seleção das colônias distintas formadas.

As colônias foram demarcadas, assepticamente coletadas com alça de platina e purificadas pelo método de estrias, por pelo menos três vezes em placas com meio AN para garantia de obtenção de colônias puras. A refrigeração é utilizada para o armazenamento de culturas bacterianas por curtos períodos (TORTORA et al., 2012), então as linhagens bacterianas purificadas foram preservadas sob refrigeração e estriamentos em AN, quinzenais ou mensais, foram realizados para que as colônias mantivessem as suas atividades metabólicas para os testes seguintes.

4.4.1 Preparação dos inóculos

Assepticamente na câmara de fluxo laminar, uma colônia purificada e isolada de cada uma das estirpes selecionadas foi coletada com alça de platina e transferida

para um tubo de vidro contendo 10mL CN. Os inóculos foram então incubados a 30°C por 24h para serem utilizados nos testes subsequentes.

4.4.2 Contagem das unidades formadoras de colónias

As principais formas para realização de contagem em placas são o método de sementeira em profundidade (*pour plate*) e método de sementeira por espalhamento, sendo a quantificação dessas amostras evidenciada pelo número de unidades formadoras de colónias (UFC), que pode incluir uma ou mais células (MADIGAN et al., 2016). Para contagem, muitos microbiologistas preferem placas com 30 a 300 colónias, porém a *Food and Drug Administration* recomenda que a contagem de placas seja realizada com 25 a 250 colónias (TORTORA et al., 2012).

A contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) foi realizada por meio de diluição seriada, com 100 µL dos inóculos (preparados na secção 4.4.1) para 900 µL de solução salina. Após agitação, foram retiradas alíquotas de 20 µL correspondente a cada diluição e então depositadas em duplicatas, em placas de Petri contendo AN, que foram incubadas a 30°C por 24h para a realização da contagem. Para obter a relação com a biomassa de cada amostra, a densidade ótica foi medida em Espectrofotómetro UV-VIS (Kasuki IL-592) a um comprimento de onda (λ) de 600 nm (PATTANAPIITPAISAL et al., 2001; TIRRY et al., 2018).

4.5 SELEÇÃO DE ISOLADOS RESISTENTES AO CRÓMIO

4.5.1 Avaliação do crescimento bacteriano

Para este teste, que foi realizado com 7 das estirpes encontradas, primeiro, assepticamente foi transferido 100µL do inóculo de cada uma das bactérias encontradas (descritos na secção 4.4.1) para 4 tubos contendo 10mL de CN, que foram então incubados a 30°C por 24h. Após este período, os tubos foram homogeneizados e então parte da suspensão foi transferida para uma cuvete. Os resultados das leituras foram obtidos no Espectrofotómetro UV-VIS (Kasuki IL-592) a 600 nm, no LQA da UFPel, para comparação do crescimento, após 24h, de cada uma das estirpes bacterianas resistentes ao Cr encontradas.

Após as leituras e cálculo das médias, o restante de cada amostra foi transferido para tubo Eppendorf e centrifugado por 15 minutos a 5.000 rpm em centrífuga de bancada digital (Novatecnica NT800). O sobrenadante, sem a biomassa de bactérias, foi cuidadosamente transferido para outro microtubo identificado e então armazenado para realização do teste seguinte.

4.5.2 Avaliação da remoção de crómio

As amostras para realização deste teste são provenientes do teste anterior, ou seja, oriundas dos sobrenadantes das centrifugações, que se trata do meio de cultura já sem as bactérias. A quantificação de Cr presente no meio foi calculada pela diferença de concentração inicial (que foi de 50mg L^{-1}) e das concentrações obtidas através das leituras, sendo esta diferença representada pela quantidade de crómio removida pelas bactérias.

Para garantir que as leituras ficassem dentro da faixa de trabalho do equipamento, as amostras foram diluídas. Assim, utilizou-se 1mL de cada amostra contida nos tubos Eppendorf preparados no fim da secção 4.5.1, e 9mL de água destilada esterilizada em tubos Falcon também esterilizados, sendo acidificadas com 15 μL de HCl 1M. Além das amostras, também foram preparados tubos com diferentes concentrações de Cr para a curva padrão.

Na determinação de crómio total, os tubos Falcon contendo as amostras já diluídas foram encaminhadas ao Laboratório de Metrologia Química da UFPel, para leitura por meio de Espectroscopia de Absorção Atômica (AAAnalyst 200 - Perkin Elmer). A chama foi produzida a partir de ar comprimido e acetileno (APHA, 1999) com vazões de 10 e 3,3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. A resolução espectral foi de 0,2 nm (MATOS e NÓBREGA, 2009; PINA, 2011).

As quantificações de crómio foram realizadas com lâmpada de cátodo oco, utilizando comprimento de onda de 357,9 nm, corrente elétrica aplicada de 2,7 mA e correção de sinal de fundo com lâmpada de deutério (APHA, 1999; MATOS e NÓBREGA, 2009; PINA, 2011; SCHNEIDER, 1995).

Considerando que o meio de cultura padrão apresentava concentração de 50 mg L^{-1} de Cr, foram realizadas as médias dos dados obtidos pelas leituras por AAS e então subtraídas da concentração inicial, para então obter a quantidade de Cr que foi removida.

Para todos os testes subsequentes de remoção esse mesmo raciocínio foi utilizado, porém no teste em que foram avaliadas as diferentes concentrações de crómio no meio, a percentagem foi calculada em relação à concentração inicial, que variava conforme o tratamento.

4.6 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS PARA REMOÇÃO DE CRÓMIO

Devido à impossibilidade de realização de testes com todas as estirpes bacterianas resistentes encontradas nas raízes da macrófita aquática *H. grumosa*, uma delas, denominada como HG5, foi selecionada para a realização de testes mais específicos, onde foram verificadas as condições ideais de crescimento e de remoção de crómio do meio.

A mesma estirpe também foi encaminhada para testes de extração de DNA e PCR para identificação molecular, conforme apresentado na secção 4.7.

4.6.1 Curva de crescimento e remoção através do tempo

A estirpe bacteriana selecionada foi avaliada quanto ao seu crescimento e potencial de remoção de Cr numa solução contendo 50 mg Cr L⁻¹ (TIRRY et al., 2018) e pH ajustado para 7,0 com NaOH 1M (WANI et al., 2018) para os tempos de 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação.

Assepticamente foi transferido 100µL do inóculo da bactéria selecionada para 4 tubos contendo 10mL com CN. Os tubos foram incubados em estufa a 30°C (PATTANAPIITPAISAL et al., 2001; TIRRY et al., 2018) e as amostras foram lidas nos tempos pré-determinados para obtenção de dados, cálculo das médias e elaboração da curva de crescimento, além da comparação com a remoção de Cr em cada um dos tempos.

Todas as amostras para leitura dos testes de crescimento e de remoção foram preparadas e lidas conforme os procedimentos descritos nas secções 4.5.1 e 4.5.2.

4.6.2 Efeito de diferentes concentrações iniciais de crómio

Para verificar a capacidade de remoção em meios contendo diferentes concentrações iniciais de Cr, a bactéria selecionada foi testada em meios de cultura contendo 0, 25, 50 e 75 mg L⁻¹ de crómio.

Assim, assepticamente foram transferidos 100µL do inóculo da bactéria selecionada para 4 tubos contendo 10mL de CN com a respectiva concentração de Cr. Os tubos foram incubados em estufa por 24h a 30°C (PATTANAPIITPAISAL et al., 2001; TIRRY et al., 2018). Após este período, as amostras para leitura dos testes de crescimento e de remoção foram preparadas e lidas conforme os procedimentos descritos nas secções 4.5.1 e 4.5.2.

4.6.3 Efeitos da variação de temperatura de incubação

Para verificar qual temperatura de incubação onde ocorre a maior remoção de crómio, a bactéria selecionada foi testada em meios de cultura com 50mg Cr L⁻¹ (TIRRY et al., 2018), incubadas durante 24h a 15°C, 20°C, 30°C, 35°C e 40°C (PATTANAPIITPAISAL et al., 2001; TIRRY et al., 2018; WANI et al., 2018).

Assim, assepticamente foram transferidos 100µL do inóculo da bactéria selecionada para 4 tubos contendo 10mL com CN e então, os tubos foram incubados em estufa por 24h com a temperatura ajustada de acordo com cada teste. Após este período, as amostras para leitura dos testes de crescimento e de remoção foram preparadas conforme os procedimentos descritos nas secções 4.5.1 e 4.5.2.

4.6.4 Efeitos da variação de pH do meio

Para verificar em qual pH ocorre a melhor remoção de crómio, a bactéria selecionada foi testada em meios de cultura com 50 mg Cr L⁻¹ (TIRRY et al., 2018), que tiveram o pH ajustado para 5, 6, 7 e 8 através da adição de soluções previamente preparadas de HCl 1M e NaOH 1M.

Assim, assepticamente foram transferidos 100µL do inóculo da bactéria selecionada para 04 tubos contendo 10mL de CN, sendo o pH da suspensão celular ajustado para os diferentes valores em estudo e em seguida incubados em estufa por 24h a 30°C (PATTANAPIITPAISAL et al., 2001; TIRRY et al., 2018; WANI et al.,

2018). Após este período, as amostras para leitura dos testes de crescimento e de remoção foram preparadas conforme os procedimentos descritos nas secções 4.5.1 e 4.5.2.

4.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO SELECIONADO

A técnica de extração de DNA da estirpe selecionada e o teste de PCR foram realizadas com o auxílio do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), de acordo com protocolos padronizados por eles, como seguem.

4.7.1 Extração de DNA

Os microrganismos foram crescidos *overnight* em meio LB (Luria Bertani - HiMedia) em agitação a 140 rpm à 37°C. A extração do DNA foi realizada com HiMedia HiPura™ Bacterial genomic DNA Purification Kit (HiMedia Laboratories), seguindo o protocolo do fabricante.

4.7.2 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação dos genes 16S rRNA foi realizada por PCR com o Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega), utilizando os oligonucleotídeos universais 11F (5'-GTTTGATCCTGGCT-3') (KANE et al., 1993) e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (LIN e STAHL, 1995), de acordo com a seguinte reação: 1µL de cada oligonucleotídeo, 10µL do Master Mix, 7µL de água Milli-Q e 1µL do DNA extraído, totalizando 20µL. Todas as amplificações foram acompanhadas por controlo negativo, isto é, sem DNA.

A reação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems), com desnaturação inicial a 94°C durante 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, emparelhamento a 52°C por 1 min, extensão por 1 min e extensão final, a 72°C por 10 min. Os amplificadores foram analisados em gel de agarose (1,5%) e eletroforese (80 volts). A visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador com luz UV (Vilber Loumart) após coloração com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

Os produtos da PCR foram purificados utilizando 0,25µL da enzima Exonuclease I (Amershan Bioscience 2500U), 0,25µL da enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (Amershan Bioscience 5000U), 0,50µL de água Milli-Q e 6,0µL do amplificado. A reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos e após a 80°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

4.7.3 Sequenciamento de DNA

Após a purificação, os produtos foram submetidos ao sequenciamento genético utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do oligonucleotídeo específico e 0,5µL do kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante.

Os dados do sequenciamento foram coletados, os arquivos FASTA obtidos foram alinhados e a identificação dos microrganismos isolados deu-se pela comparação das sequências de DNA com as sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST (BLASTn) (EDGAR, 2010).

A análise filogenética foi realizada através do software MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 10.10.2, após o alinhamento das sequências com ClustalW (KUMAR et al., 2018).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tratados por meio de estatística descritiva (média, desvio padrão e erro padrão) e analisados utilizando a análise de variância One-Way (ANOVA) com auxílio do programa Statistica 7, tomando como base os níveis de significância maiores que 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS

As diferentes culturas bacterianas resistentes ao Cr isoladas da região rizosférica de *H. grumosa* recolhida no Arroio Santa Bárbara, RS (Brasil), ambiente com extrema contaminação de metais pesados e compostos orgânicos, foram caracterizadas. A dimensão, forma, elevação, opacidade, pigmentação e textura de cada uma das colónias foram observadas e apresentadas no Quadro 9.

Quadro 9 – Caracterização morfológica das culturas puras dos isolados.

BAC	Dimensão	Forma	Elevação	Opacidade	Pigmentação	Textura	Margem
HG1	Pequena	Circular	Elevada	Opaca	Preto/Roxo	Lisa	Inteira
HG 2	Pequena	Circular	Elevada	Opaca	Laranja-Avermelhado	Lisa	Inteira
HG 3	Média	Circular	Papilada	Translúcida	Furta-cor	Lisa	Ondulada
HG 4	Grande	Circular	Plana	Translúcida	Amarela Incolor	Áspera	Ondulada
HG 5	Média	Circular	Convexa	Opaca	Amarelada	Viscosa	Inteira
HG 6	Média	Circular	Convexa	Translúcida	Branca/Furta-cor	Viscosa	Inteira
HG 7	Grande	Irregular	Elevada	Opaca	Branco-Amarelado	Áspera	Inteira
HG 8	Média	Circular	Convexa	Opaca	Amarelo-Alaranjado	Viscosa	Inteira
HG 9	Grande	Puntiforme	Plana	Translúcida	Incolor	Áspera	Ondulada
HG10	Grande	Circular	Elevada	Opaca	Branca	Viscosa	Inteira

5.1.1 Contagem das unidades formadoras de colónias (UFC)

Os inóculos dos isolados de cada uma das colónias purificadas obtiveram os resultados de densidade ótica (OD_{600nm}) para relação da biomassa e a contagem das UFC, realizada a partir de diluições seriadas, como apresentado na Tabela 2.

Essa contagem, com função informativa, foi realizada para inferir sobre a concentração de bactérias por mL dos inóculos preparados. Devido ao fato de apresentarem concentrações diferentes, nenhuma comparação direta entre eles foi realizada, pois os inóculos não foram padronizados, por motivo da inviabilidade de tempo frente à Pandemia de COVID-19.

Tabela 2 – Densidade ótica x UFC de cada um dos inóculos.

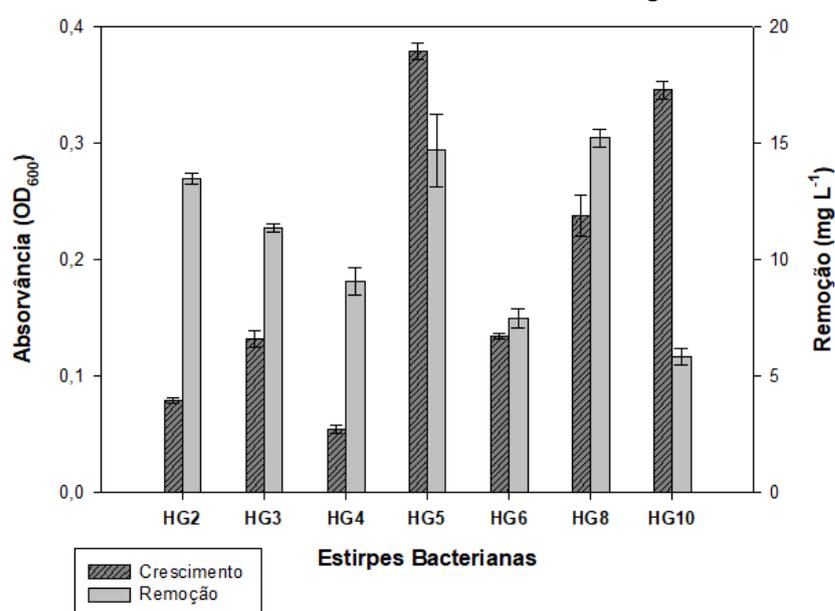
Isolado	Densidade Ótica (OD _{600nm})	log UFC.mL ⁻¹
HG 1	---	---
HG 2	0,072	2,95
HG 3	0,087	2,30
HG 4	0,082	5,05
HG 5	0,349	4,90
HG 6	0,155	4,65
HG 7	---	---
HG 8	0,204	4,35
HG 9	---	---
HG 10	0,403	6,40

Nota: Durante a realização dos testes, devido à Pandemia de COVID-19, as cepas HG1, HG7 e HG9 morreram durante o intervalo entre os estriamentos para manutenção das colônias, não sendo possível a sua utilização nos testes posteriores.

5.2 COMPARAÇÃO DOS ISOLADOS RESISTENTES ENCONTRADOS

As bactérias morfologicamente distintas encontradas foram observadas quanto ao crescimento, através da relação da absorvância com a concentração de células (biomassa), e quanto à remoção de Cr em contendo 50 mg L⁻¹, através das leituras realizadas por AAS, para percebermos se existe alguma relação entre o crescimento e a remoção, como mostra a Figura 10.

Figura 10 – Comparação do crescimento e da remoção de Cr dos isolados resistentes encontrados na macrófita *H. grumosa*.



Nota: Resultados obtidos após 24 h, em meio de cultura com 50 mg Cr L⁻¹, pH 7 e temperatura de incubação de 30°C. Média ± EP.

Como mencionado na secção 3.6.1, no caso de organismos unicelulares como as bactérias e dentro de certos limites, a densidade ótica é proporcional ao número de células (MADIGAN et al., 2016). Através das análises iniciais das bactérias selecionadas e da observação da média dos dados obtidos pelas leituras, pode verificar-se que todos os inóculos se desenvolveram no meio líquido com 50mg L⁻¹ de crómio e pH 7, quando incubadas a 30°C por 24h.

Pode constatar-se também que todas as bactérias possuem a capacidade de remoção de Cr do meio, sendo que a estirpe HG10 obteve o menor potencial de remoção, considerando a maior concentração do seu inóculo comparada com as outras estirpes bacterianas, conforme apresentado na Tabela 2. Como comentado anteriormente, a biomassa das colónias variou em cada uma das estirpes, não podendo assim ser considerado um parâmetro direto para comparação do crescimento e da remoção de Cr do meio.

Diversos fatores podem ter afetado a capacidade de crescimento e de remoção das estirpes encontradas, desta forma, devido a indisponibilidade de tempo, de material humano e operacional para realização de testes com todas elas, foi selecionada uma das estirpes para identificação e para realização de testes mais específicos. Com base nos resultados dos dois testes, apresentando um bom crescimento e uma das mais elevadas remoções de crómio do meio, a bactéria HG5 foi selecionada para identificação e para realização dos testes seguintes, onde foram verificadas a influência de algumas variáveis ambientais sobre a capacidade de remoção de Cr do meio.

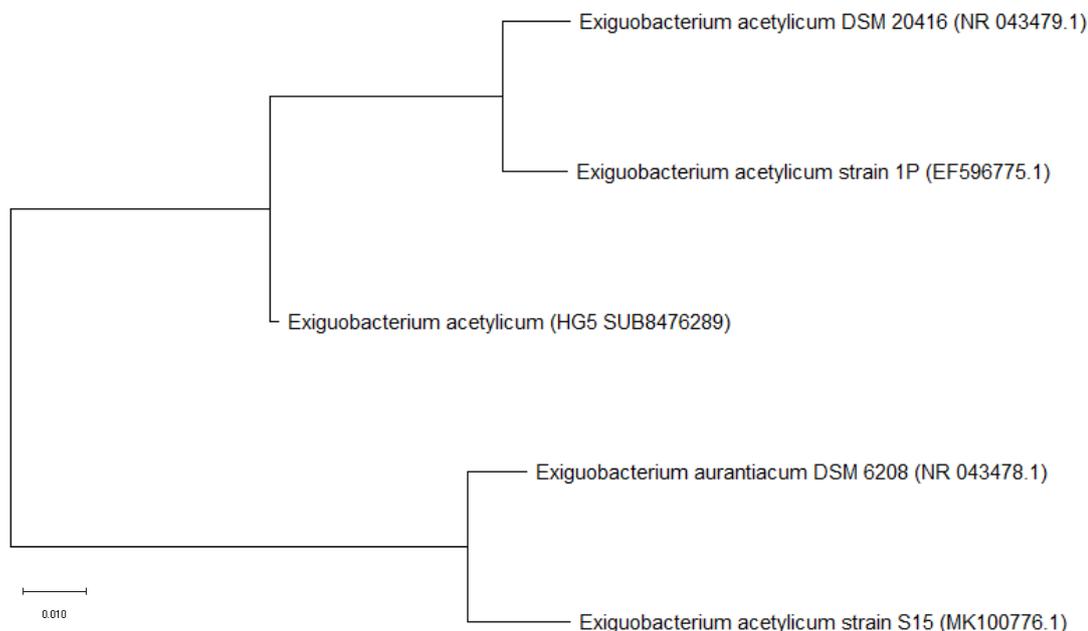
5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO SELECIONADO

A análise de identificação da estirpe selecionada foi realizada por PCR do DNA extraído da amostra, utilizando oligonucleotídeos específicos para o domínio bactéria (16S rDNA). O amplificado foi purificado, submetido ao sequenciamento genético e a identificação do microrganismo foi realizada comparando a sequência de DNA obtida, com as sequências depositadas no GenBank (NCBI).

O microrganismo apresentou 98,84% de similaridade com *Exiguobacterium acetylicum*, sob o número de acesso NR_043479.1 no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) – Anexo I. A sequência do gene 16S rRNA foi depositada no banco de dados Genbank sob o número de acesso SUB8476289. A

árvore filogenética de *E. acetylicum* e algumas cepas relacionadas são mostradas na Figura 11.

Figura 11 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA.



Nota: Os números de acesso do GenBank para as sequências do gene 16S rRNA de todas as cepas estão entre parênteses.

A história evolutiva foi inferida usando o método *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU e NEI, 1987). A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composto (TAMURA et al., 2004) e estão nas unidades de número de substituições de nucleotídeos por local. Esta análise envolveu 5 sequências de nucleotídeos e as posições de códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + DNA não codificante, sendo todas as posições ambíguas removidas para cada par de sequência (opção de exclusão em pares). Havia um total de 1553 posições no conjunto de dados final.

Exiguobacterium é um gênero de bacilos que foi descrito pela primeira vez em 1983 por Collins et al. com a caracterização de *E. aurantiacum* cepa DSM6208T (PANDEY, 2020). As espécies bacterianas pertencentes ao gênero são gram-positivas e aparecem como colônias circulares (1 - 5 mm de diâmetro) amarelas e

posteriormente laranja com o envelhecimento (SELVAKUMAR et al., 2008). São bactérias em forma de bastonete, não formadoras de esporos e móveis, cuja morfologia celular pode variar de ovoide, bastonetes, bastonetes duplos ou cadeia de células, dependendo da espécie, da cepa e das condições ambientais (VISHNIVETSKAYA et al., 2009).

São bactérias anaeróbias facultativas, com alta diversidade morfológica e geográfica, raramente associadas a infecções humanas (CHAUHAN et al., 2015; CHEN et al., 2017). O tamanho médio do genoma de *Exiguobacterium* fica na faixa de 2,8 e 3,2 Mb com o conteúdo G+C baixo, variando entre 46% e 48% (PANDEY, 2020). Mono ou dioxigenases, desidrogenases e citocromos envolvidos em vias de biodegradação de hidrocarbonetos foram encontradas no genoma, explicando a sua capacidade para biodegradar hidrocarbonetos e diversas lipoproteínas, lipopolissacarídeos e polissacarídeos (PANDEY, 2020). Genes de biossíntese estão presentes no genoma e estão associados à sua capacidade de produzir bioemulsificantes (PANDEY, 2020).

As cepas de *Exiguobacterium* podem ser isoladas ou detectadas por técnicas independentes de cultivo numa ampla gama de habitats, incluindo ambientes frios e quentes com temperaturas variando de 12 a 55°C, e incluem espécies e cepas psicrótróficas, mesofílicas e moderadamente termofílicas (VISHNIVETSKAYA e KATHARIOU, 2005). Além das adaptações térmicas dinâmicas, que resistem a uma faixa de extremos de temperatura, tornando-as ambientalmente robustas e versáteis, algumas cepas também são halotolerantes (13% NaCl), podendo ainda crescer dentro de uma ampla faixa de valores de pH (5 - 11) e tolerar altos níveis de radiação UV e *stress* de metais pesados (VISHNIVETSKAYA et al., 2007; 2009).

O género *Exiguobacterium* é fisiológica e geograficamente diverso, sendo encontrado em diversos nichos, de regiões tropicais a polares, sendo isoladas de origens marcadamente distintas, incluindo fontes termais, pergelissolo siberiano, rizosfera, depósitos sedimentares, glaciares, oceanos, lagos de água doce, fontes hidrotermais profundas, etc. (PANDEY, 2020). Muitas espécies de *Exiguobacterium* são conhecidas hoje e estão amplamente distribuídas no meio ambiente, sendo que, devido à sua versatilidade, estão a ser exploradas para aplicações na agricultura, meio ambiente e indústria (KASANA e PANDEY, 2018).

Estudos apoiam o fato de que cepas de *Exiguobacterium* são capazes de biodegradar uma série de compostos xenobióticos e podem ainda ser usadas para

mitigar a poluição ambiental, apresentando mecanismos de resistência frente a metais e semi-metais como: cádmio, cobre, mercúrio, telúrio, crômio, zinco, manganês e arsênio, demonstrando capacidade de biorremediação (PANDEY, 2020).

Os membros deste género foram investigados para a biodegradação de compostos orgânicos complexos, como os corantes trifenilmetano e 4-cloroindol, alguns pesticidas e ainda crômio e arsênio (KASANA e PANDEY, 2018). *Exiguobacterium acetylicum* PTCC1756 produz vários compostos bioativos que foram relatados para inibir patógenos fúngicos e outras bactérias patogénicas (ALIABADI et al., 2014).

Alguns isolados também possuem capacidades de promoção de crescimento de plantas, regulando fitohormonas, melhorando a aquisição de nutrientes, produzindo sideróforos e aumentando o sistema antioxidante, sendo explorados atualmente para aumentar a produção agrícola (CHAUHAN et al., 2015; PANDEY, 2020).

Liu et al., em 2019, estudaram as distribuições verticais de comunidades microbianas em solos contaminados com crômio e verificaram que essas comunidades estão intimamente relacionadas com as profundidades de amostragem e foram afetadas principalmente pelo valor do pH, Cr total, Cr (VI) e Ni. Foi sugerido que o estudo da diversidade microbiana de solos contaminados é essencial para o controlo da poluição por metais, sendo que dos 25 isolados cultiváveis e identificados por análise da sequência do gene 16S rRNA, estavam incluídos *Exiguobacterium arabatum* S8, *Exiguobacterium profundum* S5, *Exiguobacterium aurantiacum* S11, *Exiguobacterium alkaliphilum* S13 e *Exiguobacterium acetylicum* S15 (LIU et al., 2019).

5.4 TESTES DE CONDIÇÕES IDEAIS

A estirpe bacteriana selecionada, HG5, foi testada em diferentes condições, com o objetivo de otimizar a eficiência da remoção quando aplicada a ambientes contaminados com crômio.

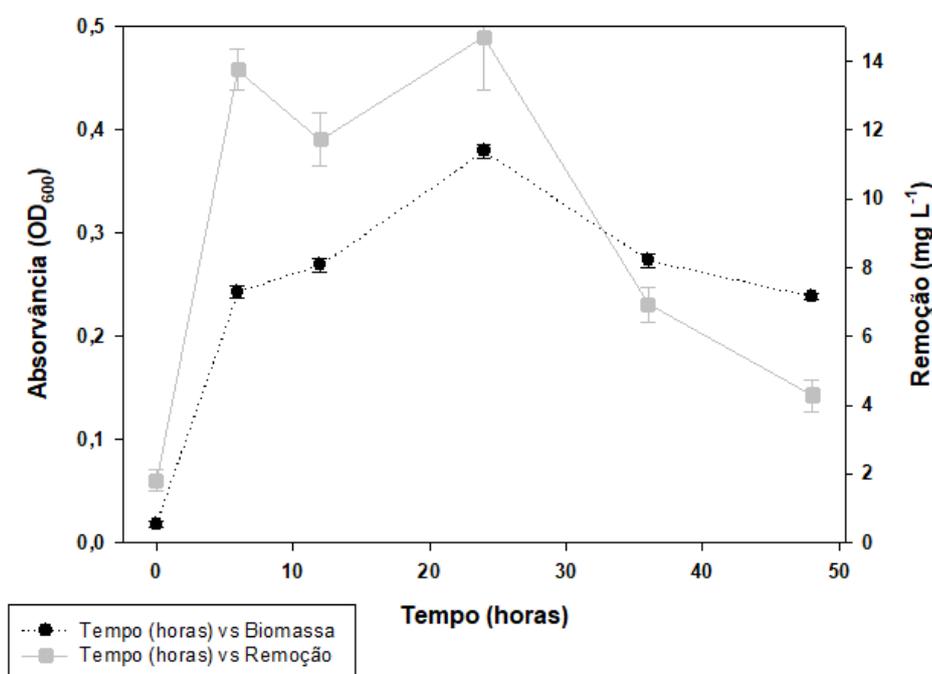
5.4.1 Período de incubação

Observando a Figura 12, podemos perceber que o salto de reprodução destas bactérias ocorre nas primeiras 6 horas, com decaimento da biomassa a partir das 24h

de incubação, sendo esta redução à volta de 28% entre 24h e 36h, e de aproximadamente 13% entre 36h e 48h de incubação.

Comportamento semelhante encontramos referente à remoção, onde se observa um pico após 6h de incubação. Houve uma redução da remoção entre 6 e 12h, com um aumento transcorridas 24h, sendo neste período o maior valor registrado, de aproximadamente 30% de remoção de Cr do meio, tendo como base a concentração inicial de 50 mg Cr L⁻¹. Após isso, ocorre um declínio significativo, da ordem dos 70%, na quantidade de Cr removido por estas bactérias.

Figura 12 – Comparação entre o crescimento e a remoção de Cr do Isolado HG5 em diferentes intervalos de tempo.



Nota: Resultados obtidos em meio de cultura com 50 mg Cr L⁻¹, pH 7, temperatura de incubação de 30°C em diferentes intervalos de tempo. Média ± EP.

Tão logo que as bactérias entram em contato com o meio contaminado, as bactérias iniciam sua reprodução, iniciando também a remoção de Cr. Após 6h, a taxa de remoção segue superior ao crescimento, sendo que após 12h parece haver maior densidade de células, porém com uma queda na remoção. Passadas 24h as taxas de crescimento e remoção encontram-se em seus valores máximos e depois deste período, transcorridas 48h, a densidade de células cai à volta de 40% e a remoção diminui de forma significativa, podendo este resultado dever-se ao fato de que o Cr

ligado/adsorvido em células mortas, possa, supostamente, ter sido novamente libertado na solução.

A pequena variação de remoção observada entre 6 e 12h e entre 36 e 48h de incubação foi consideravelmente baixa, podendo esta oscilação de valores estar associada ao mecanismo de resistência destes microrganismos, que são vivos e dotados de recursos particulares de sobrevivência.

No primeiro período, devido à grande absorção e/ou adsorção do metal, metabolicamente pode ter sido expelido o excesso de metal, retornando-o ao meio. Já no segundo período de queda, com a morte celular e conseqüentemente com a falha dos sistemas de defesa, parte deste Cr retido pode ter sido ressolubilizado no meio. Com a redução na densidade de células, a remoção não foi mais possível, sugerindo assim, que, a faixa ótima de remoção do metal, se encontra após 24 horas de incubação.

Resultado semelhante é encontrado em estudos utilizando filmes nanocompósitos à base de celulose bacteriana, onde se observa que a remoção de Cr aumenta consideravelmente transcorridas 24h (HOSSEINI e MOUSAVI, 2020).

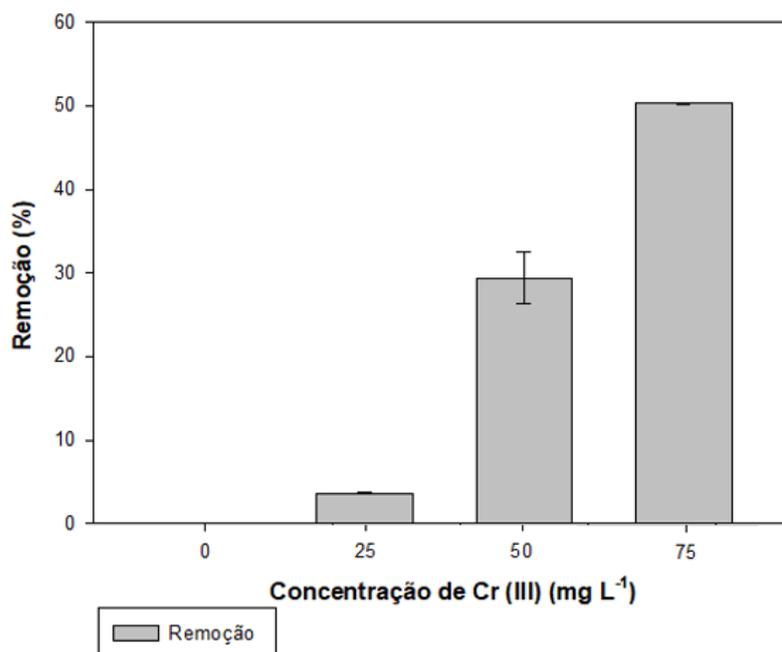
5.4.2 Concentração de crómio

A Figura 13 mostra as diferentes taxas de remoção de Cr promovida pelo isolado HG5 em diferentes concentrações de crómio no meio, sendo possível observar que esta bactéria se mostra mais eficiente quanto maior a concentração do metal, considerando testes em pH 7, a 30°C após 24 horas de incubação.

Como os meios de cultura apresentavam concentrações iniciais de Cr diferentes, após o cálculo da média das leituras de AAS, este valor foi descontado da concentração especificada (25, 50 ou 75 mg Cr L⁻¹) para verificação da quantidade de Cr removido do meio e então, com a concentração ainda presente após a remoção das bactérias, a percentagem de remoção foi calculada com relação à concentração inicial de cada um dos testes.

O aumento de 25 mg Cr L⁻¹ na concentração de cada um dos meios de culturas testados resultou num aumento de aproximadamente 13% na remoção de crómio comparando os meios de 25 e 50 mg Cr L⁻¹ e por volta de 58% comparados os meios de 50 e 75 mg Cr L⁻¹.

Figura 13 – Percentagem de remoção de Cr do Isolado HG5 para diferentes concentrações iniciais de crómio no meio.



Nota: Resultados obtidos após 24 horas, em meio de cultura com diferentes concentrações iniciais de Cr, pH 7 e temperatura de incubação de 30°C. Média \pm EP.

Assim, é possível inferir que quanto maior a concentração e disponibilidade do metal no meio, mais significativa é a percentagem de remoção de Cr pelas bactérias, mantendo uma certa proporção, considerando que essa afirmação só é válida para as concentrações testadas, ou seja, até 75 mg L⁻¹ de Cr (III), na qual foi obtida uma taxa de aproximadamente 50% de remoção de Cr.

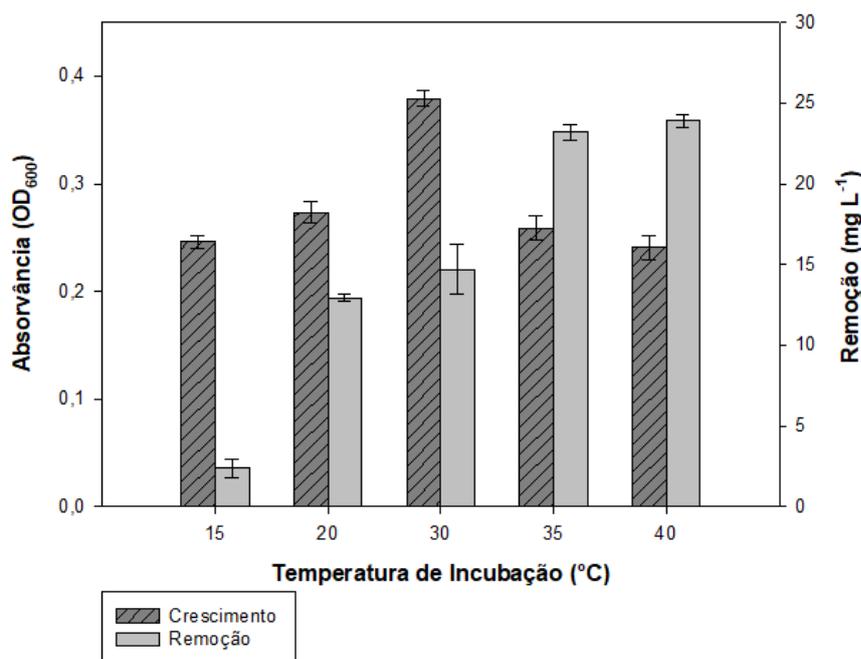
5.4.3 Temperatura de incubação

De acordo com a bibliografia, bactérias do género *Exiguobacterium*, apresentam crescimento ótimo entre 30 e 37°C (PANDEY, 2020). A Figura 14 mostra que, comparadas as diferentes temperaturas de incubação, o maior desenvolvimento ocorreu para a temperatura de 30°C, não se observando diferenças significativas no crescimento para as restantes temperaturas. Isso mostra que seu desenvolvimento parece não ser diretamente afetado por esta variável, considerando as temperaturas escolhidas para o teste.

O mesmo não acontece em relação à remoção, pois quanto menor o valor de temperatura, menor a eficiência de remoção de crómio observada. As melhores taxas ocorreram entre 35 e 40°C, em uma proporção por volta de 90% maior, que equivalem

a uma remoção média de 20 mg L⁻¹ a mais, comparados aos 15°C, temperatura na qual foi apresentada a menor taxa de remoção, com taxa de remoção de 48% em relação ao meio inicial, com 50 mg Cr L⁻¹.

Figura 14 – Comparação entre o crescimento e a remoção de Cr do Isolado HG5 para diferentes temperaturas de incubação.



Nota: Resultados obtidos após 24 horas, em meio de cultura com 50 mg Cr L⁻¹, pH 7 e diferentes temperaturas de incubação. Média ± EP.

A temperatura é um dos fatores de influência para o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Quando a temperatura aumenta, a velocidade das reações químicas e enzimáticas aumenta, até uma temperatura máxima além da qual os componentes celulares como as enzimas, ácidos nucleicos e proteínas são sensíveis e podem sofrer desnaturação, o que leva à inativação das funções celulares, uma interrupção do crescimento ou morte celular (BERTRAND et al., 2011).

Já em baixas temperaturas, as atividades enzimáticas e o crescimento bacteriano podem continuar mais lentamente. Enquanto a membrana citoplasmática permanecer fluida as funções celulares continuam, não sendo destruídas, apenas permanecendo como células dormentes. Quando a temperatura é baixa, há uma tendência a gelificar, solidificando e causando um bloqueio do crescimento ao interromper o transporte celular, a respiração e a produção de energia (BERTRAND et al., 2011).

A maioria dos microrganismos que vivem em temperaturas médias entre 15 e 45°C, com crescimento ótimo entre 25 e 37°C, são considerados mesofílicos, os microrganismos que crescem em baixa temperatura são chamados de psicrófilos e aqueles que vivem em altas temperaturas são chamados de termófilos (BERTRAND et al., 2011).

Testes usando bactérias magnetotáticas para remoção de Cr (VI) mostraram que a eficiência de remoção ultrapassou 50% quando a temperatura se encontrava entre 25 e 50°C, podendo a diminuição da eficiência ser atribuída à redução da atividade do metabolismo celular em temperaturas superiores ou inferiores à ótima, que se encontrava em torno de 30°C (QU et al., 2015).

Em estudos anteriores, foi observado um leve aumento na captação de metais pesados pela elevação dos valores de temperatura e também que o aumento de temperatura aumentou a troca iônica e conduziu a uma mudança no tamanho dos poros do adsorvente, gerando o aumento da eficiência de remoção (HUSIEN et al., 2019). Para o presente estudo, isso explica a maior taxa de remoção a 40°C, que se encontra em torno de 48%.

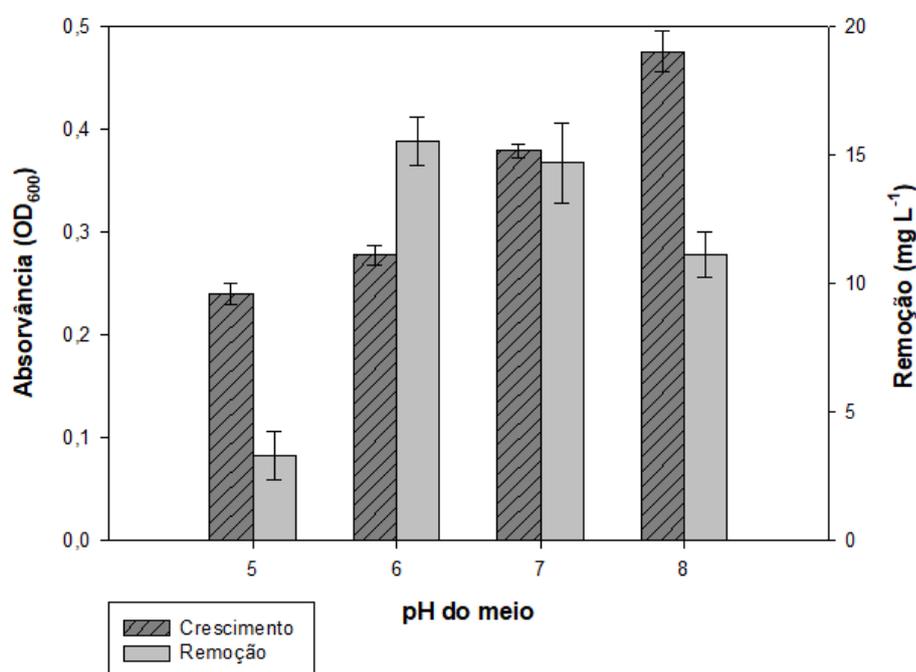
Em testes realizados com Cr (VI), o isolado *Exiguobacterium* sp. GS1, 99% semelhante a *Exiguobacterium acetylicum*, apresentou a maior remoção entre 35 - 40°C, com uma leve diminuição acima dos 45°C (OKEKE, 2008). O padrão para o desenvolvimento da biomassa bacteriana seguiu a mesma tendência, máxima aos 30 - 35 °C, diminuindo significativamente a 45°C (OKEKE, 2008).

5.4.4 pH do meio

De acordo com os dados apresentados na Figura 15, podemos perceber que valores de pH mais alcalinos conduziram a um maior desenvolvimento bacteriano. Em contrapartida, no que se refere à remoção de crômio, os diferentes pHs do meio, com exceção das análises realizadas em pH 5, que foi o menos eficiente em ambos testes, não apresentam grande diferença entre as quantidades removidas.

A melhor taxa de remoção ocorreu na faixa de pH 6-7, apresentando uma taxa de 30% considerando o meio inicial de 50 mg Cr L⁻¹, que equivale a uma remoção por volta de 78% maior de remoção comparado ao pH 5.

Figura 15 – Comparação entre o crescimento e a remoção de Cr do Isolado HG5 em função do pH do meio.



Nota: Resultados obtidos após 24 h, em meio de cultura com 50 mg Cr L⁻¹, diferentes valores de pH e temperatura de incubação de 30°C. Média ± EP.

Os procariontes estão presentes em ambientes com pH extremos, sendo possível distinguir acidófilos, neutrófilos e alcalifílicos de acordo com a capacidade de crescimento em pH ácido, neutro ou alcalino, respectivamente. A maioria deles vive a um pH próximo da neutralidade, mesmo moderadamente ácido ou alcalino, dentro de uma faixa de pH 5 a 8, sendo que para cada espécie, podemos definir um pH mínimo de crescimento, um pH ótimo e um pH máximo além do qual o crescimento não é favorecido (BERTRAND et al., 2011).

Quando um organismo se desenvolve, ele tem a capacidade de alterar o pH do ambiente onde se encontra através do seu metabolismo, absorvendo ou excretando compostos ácidos ou alcalinos, adaptando-se às variações de pH, desde que permaneçam dentro da faixa de pH tolerável ao seu desenvolvimento (BERTRAND et al., 2011). Para as bactérias do género *Exiguobacterium*, a faixa de pH ideal de acordo com a bibliografia, situa-se entre 6,5 e 8,5 (PANDEY, 2020).

Em experiências de adsorção para desintoxicar iões de crómio presente em soluções, o pH teve um impacto substancial devido à sua influência no aparecimento de diferentes espécies de Cr (VI) junto com a carga superficial do adsorvente (HOSSEINI e MOUSAVI, 2020). Assim, o pH do meio é um dos parâmetros

determinantes para estabelecer o predomínio do estado de oxidação do Cr, sendo que em meio ácido ($\text{pH} < 7,5$) predomina a forma trivalente e em meio alcalino ($\text{pH} > 8,0$) predomina a forma hexavalente (MORAES et al., 2012).

Testes utilizando biomassa de *Sargassum dentifolium* para adsorção de Cr (VI) mostraram que a capacidade de adsorção foi aumentada com o aumento do pH, com a eficiência de remoção diminuída após o pH 8, onde apresentou remoção máxima de 53% (HUSIEN et al., 2019.) Em estudos utilizando filmes nanocompósitos à base de celulose bacteriana, se observou que a remoção de Cr (VI) em pH 7 chega a quase 85% após 24 h e que a adsorção de Cr (III) na condição ácida é mais baixa, aumentando, devido à existência de cargas negativas, com o aumento do pH (HOSSEINI e MOUSAVI, 2020).

Testes utilizando usando bactérias magnetotáticas para remoção de Cr (VI) indicam que a taxa de remoção depende significativamente do pH das soluções, sendo o pH 6 ideal para a remoção de Cr (VI) por essas bactérias, podendo a diminuição da remoção de Cr (VI) ser atribuída à redução da atividade da célula e da biomassa em pH superior ou inferior ao ideal (QU et al., 2015). Nos testes realizados com o isolado *Exiguobacterium* sp. GS1, 99% similar a *Exiguobacterium acetylicum*, a remoção de Cr (VI) foi semelhante para valores de pH entre 6 e 8, apenas diminuindo significativamente para valores de pH 9, enquanto o crescimento, aparentemente aumentou com o aumento do pH inicial (OKEKE, 2008), tal como se verificou no nosso estudo.

6 CONCLUSÕES

Uma das mais relevantes adversidades ambientais que existem atualmente é a contaminação do meio ambiente com compostos perigosos e tóxicos. A contaminação por crómio impacta negativamente a saúde humana, pois este metal pode bioacumular-se nos tecidos dos organismos e sofrer biomagnificação ao longo da cadeia alimentar.

Visando a redução dos efeitos deletérios que as altas concentrações de crómio, como também de outros metais pesados, causam aos seres vivos e à natureza, a remoção destes elementos das águas residuais é um ponto que necessita de atenção. A biorremediação é uma alternativa eficiente e sustentável, capaz remover contaminantes do solo, do ar e da água.

Esta tecnologia emprega organismos vivos, principalmente bactérias, fungos ou plantas, com capacidade para biodegradar, desintoxicar ou transformar os contaminantes em formas inócuas ou menos tóxicas. Com isso, diversas estratégias podem ser utilizadas de forma isolada ou em conjunto, visando uma melhor eficácia das técnicas envolvidas.

Para que o processo de biorremediação ocorra com sucesso, deve haver uma correlação adequada entre os microrganismos utilizados e as condições ambientais e locais. Os microrganismos podem já estar presentes no local (microrganismos autóctones), ou podem ser isolados de outro local (microrganismos alóctones) e adicionados ao material a tratar, com a utilização de biorreatores.

Dado que o processo de biorremediação depende do crescimento e da atividade microbiana, a sua eficiência é altamente dependente de parâmetros ambientais, que comprovadamente influenciam o desenvolvimento microbiano e as taxas de biorremoção. No presente estudo, observou-se que bactérias isoladas das raízes da macrófita aquática *Hymenachne grumosa* apresentaram um bom desenvolvimento e potencial para biorremediar meios contendo crómio.

Um ponto a ser considerado é que as bactérias empregam diferentes mecanismos de resistência para superar a toxicidade de crómio no meio ambiente. Ao escolher uma das estirpes bacterianas para os testes subsequentes, objetivou-se um crescimento microbiano suficiente, bem como uma eficiente remoção de crómio, com vista a melhor adequar a composição e as condições para biorremediação de

ambientes contaminados com este metal, incluindo o tratamento de efluentes industriais que utilizam crômio e outros metais pesados.

Taxas de remoção da ordem dos 50% foram obtidas neste estudo pelo isolado HG5, identificado como *Exiguobacterium acetylicum*, após 24 horas de incubação, pH 7 e temperaturas entre 35 e 40 °C, para uma concentração inicial em solução de 50 mg Cr L⁻¹. Já no que se refere à remoção na presença de diferentes concentrações de Cr, foi possível observar que quanto maior a concentração do metal em solução, maior a percentagem de remoção obtida.

É importante salientar, frente aos resultados obtidos, que o principal objetivo se encontra em potencializar as condições de remoção do contaminante, para que quando aplicado a situações reais, a biorremoção seja realmente efetiva. Explorar ramos multidisciplinares de pesquisa, reunindo diferentes abordagens ecológicas e biológicas pode fornecer novas formulações e oportunidades para a utilização desta tecnologia.

É possível inferir, pela presença de microrganismos como *E. acetylicum* nas raízes da macrófita aquática *H. grumosa*, que o Arroio Santa Bárbara já passa por um processo de atenuação natural. Isso enfatiza a importância da presença das macrófitas e de sua microbiota associada para auxiliar na melhoria da qualidade das águas contaminadas.

Os leitos construídos de macrófitas, capazes de reter concentrações significativas de crômio, são outra alternativa, e neste caso, ensaios para verificar a capacidade destas mesmas bactérias, já presentes nas raízes, de remover mais do que um tipo de contaminante são ainda necessários.

Assim, deve ser considerada a realização de estudos aprofundados no que se refere às bactérias rizosféricas isoladas de *H. grumosa* inicialmente, que deverão ser testadas quanto à remoção de crômio como também de outros metais. Isso possibilitaria a aplicação de consórcios bacterianos, que permitiriam otimizar o tratamento de efluentes que contenham outros tipos de contaminantes, potencializando a eficiência da taxa de descontaminação.

Como resultado deste trabalho observou-se que alterações nos parâmetros físicos e químicos, que representam alterações de variáveis ambientais reais, afetaram de diferentes formas a eficiência e o sucesso da biorremediação, por se tratar da ação de organismos vivos.

As respostas fisiológicas decorrentes de variações de temperatura, pH, tempo de incubação e concentração inicial de Cr mostram que a *E. acetylicum* apresentou resultados satisfatórios sob diversas condições ambientais na remoção do metal, tanto nos testes realizados, como também nos estudos já publicados, o que demonstra assim, tratar-se de uma bactéria com potencial para a biorremediação de águas residuais contaminadas com crómio.

REFERÊNCIAS

ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 9800**. Critérios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário. 1987.

ACIOLY, Leonila Maria Leandro. **Pantoea isolada de efluente industrial: identificação, caracterização, susceptibilidade e aplicação na remoção de metais pesados**. Recife: 2014. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Indicadores de qualidade**. Disponível em: <<https://www.ana.gov.br/panorama-das-aguas/qualidade-da-agua/indicadores-de-qualidade>>. Acesso em 10 out. 2019.

ALIABADI, M.A., GHASEMI, M.F., ISAAZADEH, K.H. Antimicrobial activity bioactive compounds produced by *Exiguobacterium acetylicum* PTCC1756 against pathogenic bacteria. **Sci. J. Microbiol.** 3, 55 e 61. 2014.

ALVES, Nilton Pereira. **Espectrofotometria Atômica Fundamentos e Instrumentação**. 2011. Disponível em: <http://www.quimlab.com.br/cursos_quimlab/espectrofotometria_atomica_crq.pdf>. Acesso em nov. 2019.

ANDRADE, Júlio Cesar da Matta e; TAVARES, Silvio Roberto de Lucena; MAHLER, Cláudio Fernando. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007, 176 p.

BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. **Biorecovery**, 1, 81-126. 1989.

BARRERA-DÍAZ, C. E., LUGO-LUGO, V.; BILYEU, B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr (VI) reduction. **Journal of Hazardous Materials**, 223-224, 1–12. 2012.

BASQUES, José Carlos. **Fotometria e Padronização**. 2016. Disponível em: <https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/FOTOMETRIA_E_PADRONIZACAO.pdf>. Acesso em nov. 2019.

BERTOLO, Reginaldo Antonio; MARCOLAN, Leonardo Nobuo Oshima; BOUROTTE, Christine Lauremarie. Relações Água-Rocha e a Hidrogeoquímica do Crômio na Água Subterrânea de Poços de Monitoramento Multiníveis de Urânia, SP, Brasil. **Revista do Instituto de Geociências–USPGeol. USP, Sér. Cient.**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 47-62, junho 2009.

BERTRAND, Jean-Claude; CAUMETTE, Pierre; LEBARON, Philippe; MATHERON, Robert; NORMAND, Philippe; SIME-NGANDO, Téséphore (Editors). **Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications**. France: Springer Science, 2011.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. **RESOLUÇÃO CONAMA N° 357/2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. **RESOLUÇÃO CONAMA N° 430/ 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. 2011.

BRASIL. **Lei n° 12.651, de 25 de maio de 2012**. Institui o novo código florestal brasileiro.

CAMARGO, F. A. O., BENTO, F. M., OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. **Journal of Environment Quality**, 32(4), 1228-1233. 2003.

CERVANTES, C., CAMPOS-GARCÍA, J., DEVARAS, S., GUTIERREZ-CORONA, F., LOZA-TAVERA, H., TORRES-GUZMAN, J.C., MORENO-SANCHEZ, R. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) **Microbiol. Rev.** 25, 335-347. 2001.

CHAUHAN, H., BAGYARAJ, D. J., SELVAKUMAR, G., & SUNDARAM, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria - Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, 95, 38–53. 2015.

CHEN, X., WANG, L., ZHOU, J., WU, H., LI, D., CUI, Y., & LU, B. *Exiguobacterium* sp. A1b/GX59 isolated from a patient with community-acquired pneumonia and bacteremia: genomic characterization and literature review. **BMC Infectious Diseases**, 17(1). 2017.

CORADI, P. C.; FIA, R., PEREIRA-RAMIREZ, O. Avaliação da qualidade da água superficial dos cursos de água do município de Pelotas-RS, Brasil. **Ambi-Água, Taubaté**, v. 4, n. 2, p. 46-56, 2009.

DA SILVA JLBC, PEQUENO OTBL, ROCHA LKS, ARAÚJO ECO, MACIEL TAR, BARROS AJM. Biossorção de metais pesados: uma revisão. **Revista saúde e ciência Online**, 2014; 3(3): 137-149, set-dez, 2014.

DEMARCO, Carolina Faccio; NAZARI, Mateus Torres; CAMARGO, Flávio Anastácio de Oliveira; Quadro, Maurício Silveira; Pieniz, Simone; Andreazza, Robson. Seleção de macrófitas aquáticas com potencial de fitorremediação no Arroio Santa Bárbara, município de Pelotas/RS. p. 72-79. In: **Anais do XIV Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Ambiental** [Blucher Engineering Proceedings v.3 n.2]. São Paulo: Blucher, 2016.

DEMARCO, Carolina Faccio et al. Environmental and multivariate analysis of Santa Bárbara stream, Brazil, contaminated with heavy metals and nutrients. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 13(1): 53-63. 2019.

DEMARCO, Carolina Faccio et al. In situ phytoremediation characterization of heavy metals promoted by *Hydrocotyle ranunculoides* at Santa Bárbara stream, an anthropogenic polluted site in southern of Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**. 25:28312–28321. 2018

DHAL, B., THATOI, H. N., DAS, N. N; PANDEY, B. D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: **A review. Journal of Hazardous Materials**, 250-251, 272–291. 2013.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics** 26, 2460–2461. 2010.

ESTEVES, Francisco de Assis (Coord.). **Fundamentos de Limnologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 790p.

FERNÁNDEZ, P. M., VIÑARTA, S. C., BERNAL, A. R., CRUZ, E. L., & FIGUEROA, L. I. C. Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. **Chemosphere**, 208, 139–148. 2018.

FILGUEIRAS, T.S., OLIVEIRA, R.P. **Hymenachne in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13268>>. Acesso em: ago. 2019.

GADD, G.M. Metals and microorganisms: A problem of definition. **FEMS. Microbiol. Lett.** 100 (1-3), 197-203. 1992.

GALDIANO JR., Renato Fernandes. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. 2009. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas. 2009.

GHEJU, M. Hexavalent Chromium Reduction with Zero-Valent Iron (ZVI) in Aquatic Systems. **Water, Air, & Soil Pollution**, 222(1-4)., 103–148. 2011.

HORN, T. B., ZERWES, F. V., KIST, L. T., & MACHADO, Ê. L. Constructed wetland and photocatalytic ozonation for university sewage treatment. **Ecological Engineering**, 63, 134–141. 2014.

HOSSEINI, H., & MOUSAVI, S. M. (2020). Bacterial cellulose/polyaniline nanocomposite aerogels as novel bioadsorbents for removal of hexavalent chromium: Experimental and simulation study. **Journal of Cleaner Production**, 123817.

HUSIEN, Sh.; LABENA, A.; EL-BELELY , E.F.; MAHMOUD HAMADA, M. and HAMOUDA ASMAA, S. Adsorption studies of Hexavalent Chromium [Cr (VI)] on

micro-scale biomass of *Sargassum dentifolium*, Seaweed. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. 2019.

JOBBY, R., JHA, P., YADAV, A. K., & DESAI, N.. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr (VI)]: A comprehensive review. **Chemosphere**, 207, 255–266. 2018.

KANE, M.D., POULSEN, L.K., STAHL, D.A. Monitoring the enrichment and isolation of sulfatereducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16s ribosomal RNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 (3), 682–686. 1993.

KASANA, R.C.; PANDEY, C.B. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. **Crit. Rev. Biotechnol.** 38, 141 e 156. 2018.

KAVAMURA, V. N. e ESPOSITO, E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, 61–69, 2010.

KEWSCIENCE. **Royal Botanic Gardens**. Plants of the world online. Disponível em: <<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:20012706-1>>. Acesso em: fev. 2019.

KOTAŚ, J., & STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, 107(3), 263–283. 2000.

KRUG, Francisco José; NÓBREGA, Joaquim Araújo; OLIVEIRA, Pedro Vioriano. **Espectrometria de Absorção Atômica**. 2004.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ ,C. and TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549.

LIN, C. e STAHL, D.A. Comparative analyses reveal a highly conserved endoglucanase in the cellulolytic genus *Fibrobacter*. **J. Bacteriol.** 177, 2543–2549. 1995.

LIU, B., SU, G., YANG, Y., YAO, Y., HUANG, Y., HU, L., HE, Z. Vertical distribution of microbial communities in chromium-contaminated soil and isolation of Cr(VI)-Reducing strains. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 180, 242–251. 2019.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MATOS, Wladiana Oliveira e NOBREGA, Joaquim Araújo. Especificação de cromo em cimentos e derivados de cimento brasileiros. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 8, 2094-2097, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biodiversidade**. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul – Brasília: MMA / SBF, 2006. 388 p – Capítulo 6 Flora e vegetação. Maria de Lourdes

A. A. de Oliveira, Rosana M. Senna, Márcia T. M. B. das Neves, Martina Blank, Ilsi lob Boldrini. Disponível em <https://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/cap_6_lagoa_casamento.pdf>. Acesso em ago. 2019

MOHR, Geani; DUPONT, Adriana; Machado, Enio Leandro; LOBO, Eduardo A. Avaliação da eficiência da macrófita *Hymenachne grumosa* como organismo-teste, em dois sistemas de tratamento de efluentes, através de ensaios ecotoxicológicos. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 5, n. 2, p. 02-12, 2015.

MORAES, Isaac Pedro Soares; NETO, Cesar Bianchi; GLADEK, Anthony. Redução /remoção de cromo hexavalente na água de captações subterrâneas. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. **Revista ÁGUAS SUBTERRÂNEAS**, São Paulo, Brasil.eISSN 2179-9784 (eletrônico) 2012.

OKEKE, B. C. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 35(12), 1571–1579. 2008.

PANDEY, N. *Exiguobacterium*. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, 169–183. 2020.

PATTANAPIITPAISAL P., BROWN N.L.; MACASKIE L.E. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57(1-2), 257–261. 2001.

PILON-SMITS, E. **PHYTOREMEDIATION**. Annual Review of PlantBiology, 56(1), 15–39. 2005.

PRADHAN, D., SUKLA, L. B., SAWYER, M., & RAHMAN, P. K. S. M. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 55, 1–20. 2017.

QU, Y., ZHANG, X., XU, J., ZHANG, W., & GUO, Y. (2014). Removal of hexavalent chromium from wastewater using magnetotactic bacteria. **Separation and Purification Technology**, 136, 10–17. doi:10.1016/j.seppur.2014.07.054

REFLORA- Flora do Brasil 2020 em construção. ***Hymenachne grumosa***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13268>>. Acesso em: Ago. 2019.

RICHARD, F. C. & BOURG, A. C. M.. Aqueous geochemistry of chromium: A review. **Water Research**, 25(7), 807–816. 1991.

RIO GRANDE DO SUL. **Resolução CONSEMA nº 355/2017**. Dispõe sobre os critérios e padrões de emissão de efluentes líquidos para as fontes geradoras que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. 2017.

SAITOU, N. and NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.

SANJAY, M. S., SUDARSANAM, D., RAJ, G. A., & BASKAR, K.. Isolation and identification of chromium reducing bacteria from tannery effluent. **Journal of King Saud University - Science**. 2018.

SARWAR, N., IMRAN, M., SHAHEEN, M. R., ISHAQUE, W., KAMRAN, M. A., MATLOOB, A., REHIM, A. E HUSSAIN, S.. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. **Chemosphere**, 171, 710–721. 2017.

SCHIAVO, Daniela. **Espectrometria de absorção atômica**: Fundamentos, figuras de mérito, otimização do instrumento e aspectos práticos. 2013. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/18MET/palestras/31-10-2013/Abs_Atomatica_Daniela.pdf>. Acesso em nov. 2019.

SELVAKUMAR, G., JOSHI, P., NAZIM, S., MISHRA, P. K., KUNDU, S.; GUPTA, H. S. 2008. *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25(1), 131–137.

SILVEIRA, Daniele Damasceno. **Estudos fenológicos da macrófita *Hymenachne grumosa* (Magnoliophyta-Poaceae) na aplicação de wetlands construídos para o tratamento de efluentes secundários de campus universitário**. 106 f. Dissertação Mestrado em Tecnologia Ambiental. Universidade de Santa Cruz do Sul, 2010.

SIMON, A. L. H.; GONÇALVES, A. M. B. A.; HILSINGER, R.; NOAL, R. E. **Impactos Ambientais e estado de degradação ambiental do Canal do Santa Bárbara, Município de Pelotas, R.S.** In: Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, 10, 11 p., 2007. Anais eletrônicos. Disponível em <<http://www.cibergeo.org/XSBGFA/eixo3/3.3/202/202.htm>>. Acesso em set. 2019.

SIMON, Adriano Luís Heck; Gracieli TRENTIN y Cenira Maria Lupinacci da CUNHA. Avaliação da dinâmica do uso da terra na Bacia do Arroio Santa Bárbara – Pelotas (Brasil), no período de 1953 a 2006. Scripta Nova. **Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales**. [on Line]. Barcelona: Universidad de Barcelona, 20 de junio de 2010, vol. XIV, n° 327.

SOTERO-MARTINS, Adriana; VIANA, Mônica de Oliveira; CARVAJAL, Elvira. Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por mercúrio e crômio. **Geochimica Brasiliensis** 28(1): 36-42, 2014.

TAMURA, K.; NEI ,M. and KUMAR, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

TANNER, C.C. Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. **Water Science Technology**, v.44, n.11-12, p. 9-17. 2001.

- THATOI, H., DAS, S., MISHRA, J., RATH, B. P., & DAS, N.. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. **Journal of Environmental Management**, 146, 383–399. 2014.
- TIRRY, N., TAHRI JOUTEY, N., SAYEL, H., KOUCHOU, A., BAHAFID, W., ASRI, M., & EL GHACHTOULI, N. Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 2018.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. 967p (versão digital).
- TUNDISI, José Galizia e TUNDISI, Takako Matsumura. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 161-163 (632 páginas).
- VISHNIVETSKAYA, T.A. e KATHARIOU, S. Putative transposases conserved in *Exiguobacterium* isolates from ancient Siberian permafrost and from contemporary surface habitats. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 6954–6962. 2005.
- VISHNIVETSKAYA, T.A., KATHARIOU, S., TIEDJE, J.M. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. **Extremophiles** 13, 541 e 555. 2009.
- VISHNIVETSKAYA, T.A., SILETZKY, R., JEFFERIES, N., TIEDJE, J.M., KATHARIOU, S. Effect of low temperature and culture media on the growth and freeze-thawing tolerance of *Exiguobacterium* strains. **Cryobiology** 54, 234–240. 2007.
- WANI, P. A., WAHID, S., SINGH, R., & KEHINDE, A. M. Antioxidant and chromium reductase assisted chromium (VI) reduction and Cr (III) immobilization by the rhizospheric *Bacillus* helps in the remediation of Cr (VI) and growth promotion of soybean crop. **Rhizosphere**, 6, 23–30. 2018.
- YOON, J., CAO, X., ZHOU, Q., & MA, L. Q. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of The Total Environment**, 368(2-3), 456–464. 2006.
- ZOUBOULIS, A. I.; MOUSSAS, P. A. E AND PSALTOU, SAVVINA G. **Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation**. Encyclopedia of Environmental Health, 2nd Edition, 1-13. 2018.

ANEXOS

ANEXO I – Laudo identificação molecular do isolado HG5



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Identificação da amostra

Número da amostra: 01 – HG 5

Origem: UFPel

Município: Pelotas

Data de recebimento: 09 de setembro de 2020

Material entregue por: Raquel Carvalho

Responsável pelo recebimento da amostra: Flaviane Eva Magrini (Bióloga – Téc. Laboratório de Diag. Molecular)

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS POR SEQUENCIAMENTO DE DNA POR CAPILAR (Método Sanger*)

METODOLOGIA

A análise da identificação de microrganismos é realizada por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do DNA extraído utilizando oligonucleotídeos específicos para o domínio bactéria (16S rDNA). O amplificado foi purificado e submetido ao sequenciamento genético por capilar usando sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). A identificação do microrganismo foi realizada comparando sua sequência de DNA obtida com as sequências depositadas no GenBank (NCBI).

* Sterky & Lundberg (2000). Journal of Biotechnology 76: 1–31.

RESULTADO

O microrganismo apresentou 98,84% de similaridade com *Exiguobacterium acetylicum*, sob o número de acesso [NR_043479.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Caxias do Sul, 07 de outubro de 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Suelen Paesi', is written over a light blue circular stamp.

Prof. Dra Suelen Osmarina Paesi
Bióloga Responsável
CRB – 3:092339-03