



**UNILASALLE**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE



MATHEUS SOUZA SPAGIARI

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32  
EM SOLUÇÕES CONTENDO CROMO HEXAVALENTE**

CANOAS, 2014

MATHEUS SOUZA SPAGIARI

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32  
EM SOLUÇÕES CONTENDO CROMO HEXAVALENTE**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Avaliação de Impactos Ambientais.

Orientação: Prof. Dr. Delmar Bizani

CANOAS, 2014



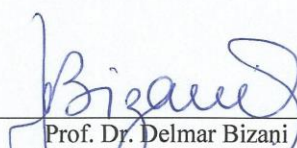
**UNILASALLE**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE




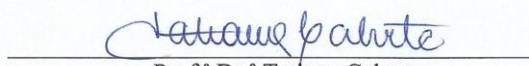
Credenciamento: Decreto de 29/12/98 - D.O.U. de 30/12/98  
Recredenciamento: Portaria 626 de 17/05/12 - D.O.U. de 18/05/12

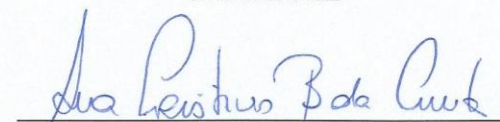
**Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais**

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Delmar Bizani  
UNILASALLE, Orientador e Presidente da  
Banca

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Alessandra Marqueze  
UNILASALLE

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Tatiana Calvete  
UNILASALLE

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Ana Cristina Borba da Cunha  
UFCSPA

**Área de Concentração:** Avaliação de Impactos Ambientais

**Curso:** Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais

Canoas, 18 de Julho de 2014.

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S733a Spagiari, Matheus Souza.

Análise do comportamento de *Klebsiella Oxytoca* CIP 79.32 em soluções contendo cromo hexavalente [manuscrito] / Matheus Souza Spagiari. – 2014.

61f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais) –  
Centro Universitário La Salle, C

Bibliotecário responsável: Melissa Rodrigues Martins - CRB 10/1380

*A minha família, pelo apoio que me  
forneceram durante toda a minha vida  
acadêmica.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por estar sempre me guiando durante toda a minha vida.

Agradeço à minha mãe Lucy, por ter me ensinado a ser uma pessoa com caráter, empenho e companheirismo em todos os dias da minha vida.

Agradeço a minha avó, por todo carinho e dedicação que teve por mim durante todos esses anos, sempre acreditando que eu poderia ser uma pessoa com sucesso.

Agradeço as minhas tias Luciane e Luz Mary, pelo apoio em todas as dificuldades que tive durante minha maratona acadêmica.

Meus agradecimentos especiais por este trabalho são para as pessoas que me ajudaram a tornar isso tudo possível, são eles:

Ao Prof. Delmar Bizani, por me mostrar como é grande e magnífico o mundo da microbiologia, onde seres tão pequenos podem realizar feitos tão grandes.

A Maritsa Brito e Jamile Pereira por me ajudar na parte prática do projeto, no qual sem essa ajuda esse trabalho não seria concluído.

Aos professores, pelos conhecimentos obtidos durante todos os anos de estudo, desde o ensino fundamental até a conclusão da graduação.

Obrigado a todos de coração, pelo apoio e companheirismo durante toda minha vida de saber.

“O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma a esse dia.”

(Albert Einstein)

## RESUMO

Com o aumento do desenvolvimento tecnológico e industrial, uma grande quantidade de contaminantes, tanto de caráter industrial, quanto agrícola vem aumentando no Brasil nas últimas décadas. Inúmeras técnicas visam diminuir as agressões, que esses provocam ao meio ambiente. Infelizmente, tais técnicas por si só não são suficientes para o controle da degradação sofrida pelos recursos naturais. A biorremediação pode ser considerada como um novo processo para o tratamento de áreas impactadas mediante o uso de microrganismos capazes de modificar ou decompor poluentes agressivos ao ambiente. O presente trabalho expõe um estudo do comportamento de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em soluções contendo cromo hexavalente. Este foi diluído em caldo BHI como fonte de carbono, juntamente com dicromato de potássio numa concentração de 300 mg L<sup>-1</sup>, no qual o efluente foi utilizado para averiguação da curva de crescimento e quantificação da redução num intervalo de sete dias à 32°C. Para atividade da enzima cromato-redutase no meio extracelular foram utilizadas três concentrações de cromo: 75, 150 e 300 mg L<sup>-1</sup> à 32°C por 48 horas. Foi possível observar um crescimento ótimo da linhagem bacteriana no efluente contaminado e, como consequência, houve uma redução na taxa do íon metálico presente nos inóculos, numa média de 93%. Entretanto, o microrganismo, não apresentou nenhuma atividade enzimática no meio extracelular. Com os resultados obtidos, a aplicação da linhagem de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em processos de biorremediação é aconselhável, visto a grande taxa de redução de cromo hexavalente.

**Palavras-chave:** Íon cromo hexavalente, *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32, Cromato—redutase.



## ABSTRACT

With increasing technological and industrial development, a large amount of contaminants, both industrial character, as agriculture is increasing in Brazil in recent decades. Numerous techniques aim to reduce aggression that these cause to the environment. Unfortunately, such techniques alone are not sufficient to control the degradation suffered by natural resources. The bioremediation can be considered as a new procedure for the treatment of areas impacted by the use of microorganisms capable of modifying or decomposing pollutants harmful to the environment. This paper presents a study on the behavior of *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 in solutions containing hexavalent chromium. This was diluted in BHI broth as a source of carbon along with potassium dichromate in a concentration of 300 mg L<sup>-1</sup>, where the effluent was used to investigate the growth curve, and quantification of reducing an interval of seven days at 32°C. For chromate-reductase enzyme in the extracellular medium activity three concentrations of chromium were used: 75, 150 and 300 mg L<sup>-1</sup> at 32°C for 48 hours. It was possible to observe a great growth of bacterial strain in contaminated effluent and, consequently, a reduction in the rate of metal ion present in the inoculum, an average of 93%. However, the microorganism, showed no enzyme activity in the extracellular medium. With the results obtained, the application of strain of *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 in bioremediation process is advisable, since the vast reduction rate of hexavalent chromium.

**Keywords:** Hexavalent chromium ion, *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32, Chromate-reductase.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Crescimento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CIP 79.32 em ágar MacConkey .....  | 20 |
| Figura 2 – Mecanismo de metilação do mercúrio pela metilcobalamina.....  | 25 |
| Figura 3 – Reação entre a 1,5-difenilcarbazida e íons $\text{CrO}_4^{2-}$ .....  | 29 |
| Figura 4 – Preparo do pré-inóculo da <i>K. oxytoca</i> CIP 79.32.....  | 33 |
| Figura 5 – Amostras contaminadas com íon cromo hexavalente utilizadas no bioprocesso pela linhagem de <i>K. oxytoca</i> CIP 79.32.....                       | 35 |
| Figura 6 – Inoculação da bactéria nos efluentes para verificação do comportamento microbiano .....   | 35 |
| Figura 7 – Amostras utilizadas para análise da curva de crescimento microbiano.....  | 36 |
| Figura 8 – Amostras de cromo centrifugadas após o bioprocesso .....  | 38 |
| Figura 9 – Gráfico que relaciona o crescimento de <i>K. oxytoca</i> CIP 79.32 em presença e ausência de íon cromo hexavalente .....                          | 42 |
| Figura 10 – Gráfico da relação inicial e final da concentração de cromo hexavalente no bioprocesso realizado pela bactéria <i>K. oxytoca</i> CIP 79.32 ..... | 46 |
| Figura 11 – Análise da eletroforese em gel de poliacrilamida.....  | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Relação de equipamentos, marcas, modelos e função utilizada em cada etapa do experimento .....   | 31 |
| Tabela 2 – Relação de reagentes utilizados nos procedimentos .....  | 32 |
| Tabela 3 – Composição das amostras utilizadas no experimento e sua finalidade ....  | 34 |
| Tabela 4 – Medidas da densidade óptica para avaliação do crescimento de <i>K. oxytoca</i> CIP 79.32 em presença e ausência de cromo hexavalente ..... | 41 |
| Tabela 5 – Valores de pH no início e final do bioprocessamento .....  | 43 |
| Tabela 6 – Valores de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) x Absorbância utilizados para a curva de calibração .....                                   | 44 |
| Tabela 7 – Média da redução da concentração de íon cromo hexavalente no bioprocessamento .....  | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - Brain Heart Infusion

CIP - Collection of Institut Pasteur

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

EMB - Eosina azul de metileno

NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio

NADPH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

pH - Potencial Hidrogeniônico

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

VP - Voges-Proskauer

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | 14 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>  | 16 |
| <b>2.1 Cromo</b>  | 16 |
| 2.1.1 <i>Propriedades químicas do cromo</i>   | 16 |
| 2.1.2 <i>Compostos contendo cromo</i>   | 16 |
| 2.1.3 <i>Toxicidade do cromo</i>  | 17 |
| 2.1.4 <i>Cromo no meio ambiente</i>   | 17 |
| 2.1.5 <i>Cromo em sistemas microbianos</i>  | 18 |
| 2.1.6 <i>Resoluções</i>   | 18 |
| <b>2.2 Microbiologia</b>  | 19 |
| 2.2.1 <i>Gênero Klebsiella</i>  | 19 |
| 2.2.2 <i>Plasmídeo</i>  | 20 |
| <b>2.3 Biorremediação</b>   | 21 |
| 2.3.1 <i>Fatores ambientais limitantes a biorremediação</i>   | 21 |
| 2.3.1.1 <i>Substrato primário</i>   | 21 |
| 2.3.1.2 <i>Outros nutrientes</i>  | 22 |
| 2.3.1.3 <i>Temperatura</i>  | 22 |
| 2.3.1.4 <i>Umidade</i>  | 23 |
| 2.3.1.5 <i>pH</i>   | 23 |
| 2.3.2 <i>Mecanismos de biotransformação de metais</i>   | 24 |
| 2.3.2.1 <i>Volatilização</i>  | 24 |
| 2.3.2.2 <i>Precipitação extracelular</i>  | 25 |
| 2.3.2.3 <i>Adsorção</i>   | 25 |
| 2.3.2.4 <i>Bioacumulação intracelular</i>   | 26 |
| 2.3.2.5 <i>Biotransformação do cromo</i>  | 26 |
| <b>2.4 Técnicas de análise do experimento</b>   | 27 |
| 2.4.1 <i>Eletroforese em gel</i>  | 27 |
| 2.4.2 <i>Espectrofotometria de absorção molecular na região do visível para determinação de cromo hexavalente</i> | 28 |

|  |    |
|--|----|
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....   | 30 |
| <b>3.1 Objetivo geral</b> .....  | 30 |
| <b>3.2 Objetivos específicos</b> .....                                       | 30 |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 31 |
| <b>4.1 Reagentes e equipamentos</b> .....                                    | 31 |
| <b>4.2 Preparo do pré-inoculo</b> .....                                      | 33 |
| <b>4.3 Preparo das amostras contendo íon cromo hexavalente</b> .....         | 34 |
| <b>4.4 Inoculação das amostras com a bactéria</b> .....                      | 35 |
| <b>4.5 Análise do crescimento microbiano</b> .....                           | 36 |
| <b>4.6 Medição do pH</b> .....   | 37 |
| <b>4.7 Método colorimétrico para determinação de cromo hexavalente</b> ..... | 37 |
| <b>4.8 Curva de calibração do íon cromo hexavalente</b> .....                | 37 |
| <b>4.9 Tratamento das amostras</b> .....                                     | 38 |
| <b>4.10 Quantificação de cromo hexavalente</b> .....                         | 39 |
| <b>4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida</b> .....                      | 39 |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....                                       | 40 |
| <b>5.1 Curva de crescimento</b> .....  | 41 |
| <b>5.2 Curva de calibração do íon cromo hexavalente</b> .....                | 44 |
| <b>5.3 Determinação da redução de cromo hexavalente</b> .....                | 44 |
| <b>5.4 Determinação da atividade enzimática no meio extracelular</b> .....   | 48 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....   | 51 |
| <b>7 SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS</b> .....                                | 52 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 53 |
| <b>ANEXO A – MEIOS DE CULTURA</b> .....                                      | 59 |
| <b>ANEXO B – CERTIFICADO DA LINHAGEM BACTERIANA</b> .....                    | 60 |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil demonstra nessas últimas décadas uma maior preocupação em relação ao meio ambiente e, inúmeras técnicas que visam diminuir a agressão. Infelizmente, essas técnicas, por si só não são suficientes para o controle da degradação sofrida pelos recursos naturais. Para assegurar o manejo correto do meio ambiente é necessário que o desenvolvimento seja promovido de forma sustentável, e que o uso dos recursos naturais seja realizado com responsabilidade e coerência, preservando-os e disponibilizando-os para as futuras gerações (CARNEIRO & GARIGLIO, 2010). Quando isso não é possível, uma alternativa deve ser utilizada, então os reparos aos danos ambientais, devem ser feitos de forma rápida e preferencialmente de baixo custo, porém é uma questão difícil de conciliar, pois os processos de manutenção do ambiente estão associados a longos períodos e a altos custos. (ABBAS, 2003; SILVEIRA & SPAREMBERGER, 2004).

Os processos biotecnológicos que utilizam microrganismos e enzimas por eles liberadas encontram-se neste novo contexto de procura por opções viáveis, econômica e ambientalmente. A habilidade de biodegradação de compostos pode ser utilizada para a redução de impactos ao meio ambiente. Uma prática muito antiga é a biotransformação de compostos orgânicos por bactérias e fungos, denominado de compostagem, no qual os povos gregos, romanos e orientais já utilizavam esse processo na biodegradação dos resíduos produzidos pela sociedade da época. (NOURBAKHSI *et al.*, 2002).

A biorremediação pode ser considerada como uma nova estratégia para o tratamento de locais impactados mediante o uso de microrganismos capazes de modificar ou decompor poluentes. As estratégias de biorremediação incluem a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, da própria área a ser revitalizada, a adição de agentes estimulantes como: a) nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e; b) a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento). O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a sua transformação em gás carbônico, água e biomassa (BENTO *et al.*, 2003).

A técnica de biorremediação tem sido um processo de crescente utilidade e uso para o controle de contaminantes, principalmente compostos metálicos, onde um dos principais constituintes é o cromo, na sua forma hexavalente, que afeta e

prejudica o meio ambiente e a saúde humana (ABBAS, 2003; SANTOS, *et al.*, 2007).

O cromo é um metal pesado, obtido através do beneficiamento do minério da cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), podendo ser encontrado em alguns estados de oxidação, sendo os estados mais importantes o cromo bivalente (reduzidor), cromo trivalente (mais estável) e o cromo hexavalente (oxidante), onde esse estado de oxidação apresenta o maior grau de toxicidade das suas espécies. A concentração permitida para o lançamento de efluentes com cromo, segundo a Resolução CONAMA 430/2011 (CONAMA/MMA, 2011) é no máximo  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  para cromo hexavalente e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo trivalente, porém efluentes industriais lançados no ambiente, que não possuírem um tratamento antecipado, poderão conter concentrações muito elevadas do íon (CONCEIÇÃO, 2006; BAE *et al.*, 2005).

Apesar do cromo hexavalente ser um agente químico de caráter tóxico, tanto para os seres eucarióticos, quanto para os procarióticos, no qual os mecanismos da resistência perante o contaminante têm sido identificados na comunidade microbiana. Essa resistência é altamente atribuída à baixa absorção ou a redução biológica, por enzimas, principalmente do grupo das cromato-redutases, que transformam rapidamente o cromo hexavalente em cromo trivalente, mais estável e de menor toxicidade. A produção de enzimas seria responsável pela rápida redução do íon cromo hexavalente no citosol celular e seu efluxo, sendo precipitado no meio externo provavelmente como hidróxido de cromo (CONCEIÇÃO, 2006; RAMÍREZ-DIAZ, 2009).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cromo

#### 2.1.1 Propriedades químicas do cromo

O cromo elementar é um metal de transição, que possui número atômico igual a 24, massa atômica 51,99 u, obtido a partir do minério de cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), e possui estados de oxidação que variam de -2 até +6, em que os estados trivalente, bivalente e hexavalente são as formas mais importantes e estáveis. O estado bivalente é facilmente oxidado para o trivalente, mais estável, embora a forma hexavalente (incluindo cromatos) seja mais estável do que a forma bivalente, raramente é encontrado na natureza. As soluções de cromo hexavalente são fortes agentes oxidantes e altamente corrosivos. No ambiente, eles são geralmente reduzidos a compostos trivalentes (CONCEIÇÃO, 2006; NTP, 2011).

O cromo pode ser gerado nos processos de beneficiamento do minério de cromita, no curtimento de peles, no refino de petróleo, na indústria metalúrgica ou no tratamento da madeira (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

#### 2.1.2 Compostos contendo cromo

O cromo é normalmente encontrado em compostos químicos na sua forma trivalente, e pode ser visualizados em estruturas de óxidos, hidróxidos ou sulfatos (MATOS *et al.*, 2008). Na forma de óxidos o cromo pode ser encontrado nas estruturas de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , que é um sólido verde, precedido pela queima de sua estrutura anterior, o  $\text{CrO}_3$ . Esse óxido é utilizado em indústrias, nos ramos de pigmentos para tintas, cimento, borracha, catalizadores de reações químicas e outros usos. O  $\text{CrO}_3$  é um sólido com coloração alaranjada, obtido através da reação do ácido sulfúrico com o dicromato de potássio, um sólido vermelho – alaranjado, altamente tóxico e forte agente oxidante (CONCEIÇÃO, 2006).

O cromo trivalente possui característica estável em meio ácido, é facilmente oxidado a cromo hexavalente em soluções de caráter básico. O cromo metálico é inerte, pois possui uma película de óxidos, por essa propriedade, o metal é utilizado em eletrodeposição sobre ferro e outros tipos de metais, na proteção contra a corrosão (MATOS *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Toxicidade do cromo

Milhares de pessoas estão comumente expostas diretamente ao cromo, em seus locais de trabalho. A exposição aguda ao cromo hexavalente produz náuseas, diarreias, danos no fígado e rim, hemorragias internas, dermatites, e problemas respiratórios, enquanto que a exposição aguda ao cromo trivalente raras vezes resulta em efeitos tóxicos, onde se torna mais grave quando há risco de inalação por parte desses compostos. Outras fontes de contaminação são os cigarros, fumaça de automóveis, emissões vulcânicas, alimentos e água contaminada. Entre as lesões causadas pela intoxicação por cromo, pode-se citar câncer na cavidade nasal, hemorragia nasal, irritação da mucosa nasal e úlceras. A manipulação de compostos contendo cromo pode causar úlcera de pele e forte alergia, sendo considerado o metal que mais causa alergias em humanos (NTP, 2011).

Para a Organização Mundial de Saúde, a concentração máxima de cromo hexavalente na água potável deve ser de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  (OMS, 1998). O valor foi estabelecido pela instituição em 1958, mas, segundo as últimas pesquisas realizadas pelo *National Toxicological Program*, nos Estados Unidos, algumas evidências comprovam que, mesmo em pequenas quantidades, a ingestão de cromo hexavalente pode provocar câncer

### 2.1.4 Cromo no meio ambiente

A grande demanda pode tornar o cromo um sério agente poluidor do ar, água e solo. A concentração média deste íon metálico em água doce não poluída é de  $0,1$  a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e em oceanos de  $0,0016$  a  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , porém efluentes industriais lançados no ambiente, que não possuem um tratamento antecipado, podem conter concentrações muito elevadas de cromo (HAYASHI, 2001).

O cromo trivalente é encontrado em muitos suplementos alimentares, pois é considerado um micronutriente necessário para a atividade biológica da insulina e para o metabolismo de carboidratos em seres humanos. Apesar de o cromo hexavalente ser tóxico para as células, mecanismos de defesa têm sido identificados na comunidade microbiana, provavelmente pela seleção natural em locais contaminados (FERREIRA, 2002).

### 2.1.5 Cromo em sistemas microbianos

O cromo, como outros metais, tal qual o níquel, molibdênio e o titânio é necessário para alguns microrganismos em certas funções metabólicas específicas. As principais rotas metabólicas em que o cromo é essencial são as requeridas ao metabolismo da dextrose (glicose) e ativação enzimática (CASTILHOS, 1998).

A entrada do metal nos microrganismos é realizada através do sistema de transporte de sulfato, onde foi demonstrado primeiramente no gênero *Salmonella* e posteriormente em uma linhagem bacteriana de *E. coli*, entretanto, em fungos o transporte ocorre através do carregamento não específico de ânions no sistema de permeases (CONCEIÇÃO, 2006).

A utilização de cromo hexavalente pelos microrganismos como aceptores de elétrons não é recente, entretanto, esse assunto atualmente demonstra a extrema importância sobre a utilização de bactérias e fungos, na eliminação de cromo hexavalente de efluentes. As primeiras pesquisas na área demonstraram que anaeróbios facultativos dos gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas*, removiam o cromo hexavalente na forma de um precipitado, o hidróxido de cromo ( $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ). Conseqüentemente, outros estudos foram realizados, com diversas espécies e constataram, que os gêneros *Bacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* e a espécie *E. coli*, conseguiam reduzir a concentração de cromo (CONCEIÇÃO, 2006).

### 2.1.6 Resoluções

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a concentração máxima de cromo hexavalente na água potável deve ser de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  (OMS, 1998). O valor foi estabelecido pela instituição em 1958, mas, segundo as últimas pesquisas realizadas pelo *National Toxicological Program*, nos Estados Unidos, algumas evidências comprovam que, mesmo em pequenas quantidades, a ingestão de cromo hexavalente pode provocar câncer (NTP, 2011).

No Brasil a Resolução CONAMA 430/2011 (CONAMA/MMA, 2011) estabelece que os valores máximos permitidos, para lançamento de efluentes com os íons de cromo, não devem ultrapassar as concentrações de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  para cromo trivalente e de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  para cromo hexavalente.

## 2.2 Microbiologia

### 2.2.1 Gênero *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella* é de bactérias bacilares gram-negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, catalase positiva, oxidase negativa, KCN<sup>1</sup> e VP<sup>2</sup> positivo, não-movéis, capsuladas, da família das *Enterobacteriaceae*. Ocorrem normalmente no trato entérico, em isolamentos clínicos, na água, no solo, no trato gastrointestinal, em vegetais, frutas e nos cereais (ALMEIDA, 2005; BEHAR, 2004; FREITAS, 2007).

Esse gênero apresenta aspectos de colônias diferentes de acordo com o meio de cultivo, onde em meio Eosina Azul de metileno, sua morfologia tende a ser grande, gomosa, com núcleo central escuro que se espalham pela placa, em relação ao ágar MacConkey, a sua aparência tende a ser de uma cor rosa-avermelhada, pois fermentam a lactose, mucóides em geral com difusão do pigmento vermelho para o ágar circundante (PERES *et al.*, 2007).

As principais espécies desse gênero são denominadas de *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, onde a primeira tem sido utilizada industrialmente, na produção de etanol, e atualmente, pesquisas indicam que suas linhagens conseguem produzir gás hidrogênio (H<sub>2</sub>). Não apresenta uma alta patogenicidade como *K. pneumoniae*, que infecta o sistema pulmonar, causando pneumonia. Essa bactéria também pode ser encontrada no sistema urinário, mas esses casos são menos comuns que nos pulmões (MADIGAN *et al.*, 2010).

Hoje em dia, esse gênero bacteriano está sendo estudado não somente na área clínica, mas também no ambiental, e vários estudos relatam a utilização de espécies de *Klebsiella*, na degradação de metais, fungicidas e diversos compostos orgânicos. Esse gênero de bactéria produz enzimas como peroxidase, catalase, lacase e lignina peroxidase, que são de extrema importância para indústrias, onde funcionam como catalisadores no tratamento de efluentes, em indústrias de celulose e papel, entre outras (LOPES, 2008).

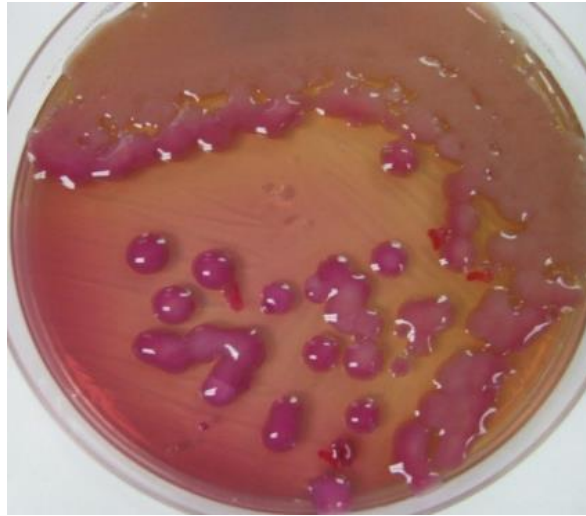
A seguir, a Figura 1 demonstra colônias típicas de *Klebsiella oxytoca*.

---

<sup>1</sup> Potassium Cyanide (KCN) Broth-Test - KCN é usado para diferenciação de membros de Enterobacteriaceae com base na tolerância a cianeto de potássio.

<sup>2</sup> Testes de Voges-Proskauer - CALDO MR-VP (seg. CLARK - LUBS), Meio de cultura para diferenciação de bactérias coliformes.

Figura 1 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em ágar MacConkey.  
As colônias rosa-clara indicam a capacidade de lactofermentação.



Fonte: Aatoria Própria, 2014.

### 2.2.2 Plasmídeo

A resistência e a capacidade de utilizar certos compostos químicos em seu metabolismo se devem aos plasmídeos, que são ácido desoxirribonucleico (DNA) extra cromossomais, que podem ser transferidos de bactérias de geração a geração, levando informações genéticas e novas características às bactérias receptoras. Os plasmídeos estão presentes em várias bactérias (UNIPAR, 1994).

Os plasmídeos podem ser pequenos com baixo peso molecular, ou grandes com alto peso molecular. Quanto maior o peso molecular do plasmídeo, menor será o número de cópias possíveis de serem realizadas, numa média de três cópias. Já os plasmídeos de baixo peso molecular podem realizar até cem cópias por células (PERCI, 1994).

Sua constituição é feita pela estrutura denominada de Fator de Transferência de Resistência, que é um conjunto de genes necessários para transferência, pelo determinante, que é a estrutura responsável pelas características do plasmídeo, e pelo elemento IS, que é uma estrutura sequencial de DNA, responsável pela sua inserção no código genético da célula receptora (UNIPAR, 1994).

Existem vários tipos de plasmídeos:

- Plasmídeo F e F': são responsáveis pelo fator de fertilidade bacteriana;

- Plasmídeo R: responsável pelos fatores de resistência bacteriana a antimicrobianos;
- Plasmídeo COL (ou fator colicinogênico);
- Plasmídeos responsáveis pela fixação do nitrogênio do solo;
- Plasmídeos que degradam metais pesados;
- Plasmídeos codificadores de toxinas bacterianas.

## **2.3 Biorremediação**

Biorremediação é um processo no qual se utiliza organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, tais como bactérias e fungos, com a capacidade tecnológica de remover ou reduzir poluentes no ambiente. Esse processo tem sido intensamente utilizado e recomendado como alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais (GAYLARDE *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Fatores ambientais limitantes à biorremediação

#### 2.3.1.1 Substrato primário

Se a concentração de um contaminante for muito baixa para suportar o crescimento, deve ser degradado como um contaminante secundário. Por outro lado, altas concentrações de um contaminante que é usado como substrato primário, pode ser inibitório ou fazer com que o substrato de crescimento complementar e/ou nutrientes se torne limitante. Por exemplo, altas concentrações de hidrocarbonetos que servem como um doador de elétrons em solo ou água subterrânea pode rapidamente consumir o oxigênio dissolvido na água ou nos gases presentes em poros. É importante, porque alguns contaminantes são apenas biodegradados sob condições aeróbias, enquanto muitas taxas de biodegradação de contaminantes são mais rápidas em condições aeróbias do que em anaerobiose. Como resultado,

muitas tecnologias de biorremediação focam na adição de oxigênio (MITCHELL & GU, 2010).

Um número de receptores de elétrons que não seja o oxigênio está muitas vezes presente no meio ambiente de subsuperfície e muitos compostos orgânicos podem ser biodegradados anaerobiamente. Depois do consumo do oxigênio, altos níveis de contaminação poderão esgotar rapidamente os receptores de elétrons anaeróbios, e a taxa natural de reposição tenderá a ser muito lenta. Assim, com o acoplamento de transporte de massa pelo fluxo de águas e a reação microbiana é provável que resulte em gradientes de concentrações do receptor de elétrons. (MITCHELL & GU, 2010).

#### 2.3.1.2 Outros nutrientes

Microrganismos quimiotróficos exigem macronutrientes, micronutrientes e elementos traços, no qual são fatores de crescimento para a síntese de materiais celulares. Se todos os requisitos nutricionais celulares não forem satisfeitos, a biodegradação pode não ocorrer ou, simplesmente, o processo parar. No entanto, o foco é geralmente na disponibilidade de nitrogênio (N) e/ou fósforo (P). Doses de N e P apropriadas podem ser calculadas usando estequiometria, e aplicações de biorremediação *in situ*, muitas vezes, incluem a adição de nutrientes inorgânicos. Enquanto muitos estudos de laboratório indicam que adições de nutrientes aumentam a taxa de degradação, muitas vezes pouco efeito é observado em campo (ABREU *et al.*, 2010).

#### 2.3.1.3 Temperatura

Em geral, as taxas de biodegradação diminuem com a temperatura, no entanto, os efeitos da temperatura podem ser complexos, visto que a grande maioria dos microrganismos tem o seu desenvolvimento ótimo na faixa de temperatura entre 25°C a 40°C, denominados de mesófilos. Entretanto, existem microrganismos que possuem crescimento em temperaturas fora da faixa considerado normal, tais como os psicrófilos que crescem em temperaturas muito baixas, e como a espécie *Pseudomonas ingrahamii*, com temperatura ótima de crescimento em 0°C a 15°C.

Em contraste, há os termófilos, com crescimento em altas temperaturas, variando entre 50°C e 60°C o seu crescimento (MADIGAN *et al.*, 2010).

#### 2.3.1.4 Umidade

Níveis de umidade inadequados pode severamente restringir a biodegradação em solos superficiais, que estão sujeitos à secagem aos níveis de qualidade inferior, principalmente quando o fluxo de ar ocorre em solos insaturados. O nível de umidade ideal para uma determinada situação é uma função das propriedades do solo, características de contaminantes e necessidades de oxigênio. Quando os níveis de umidade são altos, o nível de oxigênio diminui e, o meio se torna anaeróbio, devido à baixa taxa de difusão de oxigênio através da água. No entanto, as taxas de degradação também diminuem se os níveis de umidade ficar demasiado baixo (MITCHELL & GU, 2010).

#### 2.3.1.5 pH

As reações químicas em sistemas vivos são extremamente sensíveis mesmo em pequenas variações do pH do ambiente no qual elas ocorrem. Qualquer alteração em relação à faixa celular de concentrações normais de íons hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) podem modificar de forma agressiva as funções celulares (MITCHELL & GU, 2010).

A maioria das bactérias cresce melhor em uma faixa estreita de pH perto da neutralidade, entre 6,5 e 7,5. Poucas bactérias crescem em um pH ácido abaixo de 4. Essa é a razão pelas quais muitos alimentos como o chucrute, pickles e muitos queijos são protegidos da deterioração pelos ácidos produzidos pela fermentação bacteriana. No entanto, algumas bactérias chamadas de acidófilas, são resistentes à acidez (MADIGAN *et al.*, 2010).

As bactérias alcalófilas são as que crescem em lagos de soda cáustica, como os que ocorrem nos desertos do oeste americano, cujo pH é 11,5. Os procaríotos, em vez de se adaptarem ao pH desfavorável, como fazem em relação à temperatura desfavorável, resistem, ao mesmo, bombeando prótons para dentro ou para fora de suas células, mantendo, com isso, um pH interno praticamente constante (ABREU, 2010).



### 2.3.2 Mecanismos de biotransformação de metais

Muitos contaminantes estão sujeitos a reações de caráter químico ou fotoquímico. Entretanto, organismos – particularmente microrganismos – desempenham um importante papel na remoção de contaminantes químicos perigosos ao meio ambiente. Transformações termodinamicamente viáveis de contaminantes, que muitas vezes não acontecem sem a presença de um catalisador biológico, devido a limitações cinéticas, são facilitadas pela ação de microrganismos, que através de enzimas conseguem reduzir a energia de ativação, que precisa ser superada para que a reação aconteça (HAN & GU 2010).

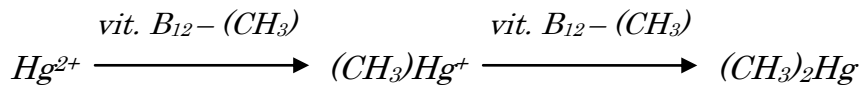
Os microrganismos, em geral, têm a capacidade de acumular ou biotransformar metais. A utilização de enzimas nesses processos é requerida, pois os metais precisam receber elétrons para que ocorra a redução do composto tóxico. As enzimas nessas reações tem a função de acelerar o transporte de elétrons para a redução dos íons tóxicos, como por exemplo, cromo hexavalente, arsênio trivalente e mercúrio monovalente, no qual os elétrons serão oriundos de substâncias produzidas por microrganismos, como NADH, NADPH e entre outras (GARCIA & BEVILAQUA, 2008).

A interação dos organismos com metais desempenha um importante papel na remediação de locais contaminados, e a volatilização, precipitação extracelular, adsorção e bioacumulação intracelular são os principais mecanismos utilizados pelos microrganismos para a bioacumulação ou biotransformação dos metais (HAN & GU, 2010).

#### 2.3.2.1 Volatilização

A volatilização de metais tóxicos consiste na metilação de cátions metálicos tóxicos ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) ou de metaloides (As, Se, Te), por microrganismos tornando esses compostos voláteis. Um dos exemplos mais comum desse tipo de mecanismo é o processo microbiano da metilação do mercúrio, no qual pode ocorrer por uma rota não enzimática, através da produção e excreção de metilcobalamina (vitamina  $\text{B}_{12}$  metilada), de acordo com a seguinte reação (GARCIA & BEVILAQUA, 2008). A seguir a Figura 2 demonstra a o mecanismo de metilação do mercúrio pela metilcobalamina.

Figura 2 – Mecanismo de metilação do mercúrio pela metilcobalamina



Inúmeros microrganismos realizam esse tipo de mecanismo, dos quais podemos relatar: *C. cochlearium*, *A. niger*, *S. brevicaulis* e *S. cerevisiae* (GARCIA & BEVILAQUA, 2008).

### 2.3.2.2 Precipitação extracelular

Os metais podem ser acumulados e imobilizados em diversos ambientes, como solo e sedimentos devido à sua ligação com produtos originários do metabolismo microbiano. Os microrganismos em geral excretam compostos orgânicos que podem complexar os metais e formar uma estrutura organometálica; dessa forma ocorre a imobilização do metal pelo microrganismo. Além da síntese de substâncias orgânicas os microrganismos liberam compostos inorgânicos, os quais poderão se ligar com os cátions metálicos do meio externo, imobilizando-os (HAN & GU, 2010).

### 2.3.2.3 Adsorção

A ligação dos metais à superfície celular dos microrganismos é denominada de biossorção. Consiste num fenômeno de adsorção que ocorre por interações eletrostáticas, entre o íon metálico e a superfície carregada com carga negativa da célula microbiana. Dessa forma, o potencial de adsorver metais vai depender unicamente das dos íons presentes de cada espécie (GARCIA & BEVILAQUA, 2008).

A quantidade de íons metálicos ligados à superfície celular é muito mais elevada, do que a prevista pela estequiometria de ligação com os sítios reativos da superfície. Essa afirmação pode ser argumentada por dois mecanismos básicos. Num primeiro estágio, somente a quantidade estequiométrica do metal liga-se aos sítios ativos da superfície celular. Após essa ligação estequiométrica, os cátions, então, atuam como sítios de nucleação para a deposição de mais íons metálicos,

determinando, dessa forma, o aparecimento de agregados de metais denominados cristalóides (HAN & GU, 2010).

#### 2.3.2.4 Bioacumulação intracelular

A bioacumulação intracelular de metais pode ser compreendida como uma segunda etapa do processo de absorção dos metais por microrganismos vivos, decorrendo de um mecanismo celular ativo, que ocorre numa primeira fase, com gasto de energia (HAN & GU, 2010).

A bioacumulação no meio intracelular, geralmente, requer sistemas específicos de transporte, a qual vai depender do grau de tolerância da célula perante o metal. Os cátions atingem o interior da célula através do sistema de transporte de micronutrientes, os quais são essenciais ao metabolismo celular (GARCIA & BEVILAQUA, 2008).

#### 2.3.2.5 Biotransformação do cromo

Muitos gêneros de bactérias são comumente empregados na redução de cromo hexavalente para cromo trivalente. A enzima responsável por essa redução pertence ao grupo das enzimas oxidases e é denominada genericamente de cromato-redutase. A presença de oxigênio permite que a redução ocorra em duas ou três etapas, sendo o processo de redução iniciado com um intermediário de vida curta. O íon hexavalente é transformado em cromo pentavalente e/ou cromo tetravalente antes de formar o íon trivalente. Contudo, a redução desses íons poderá ser espontânea ou mediante o uso de enzimas para o transporte de elétrons (HAN & GU, 2010).

A enzima cromato-redutase transfere um elétron de um possível doador de elétrons no sistema, como por exemplo: NADH, NADPH ou elétrons de reservas endógenas, para o íon hexavalente, gerando conseqüentemente o intermediário pentavalente. Posteriormente, mais dois elétrons são transferidos para esse intermediário, até a formação da estrutura mais estável trivalente (HAN & GU, 2010).

Vários microrganismos apresentam enzimas capazes de realizar a redução de cromo hexavalente para trivalente, como *Thermus scotoductus* (OPPERMAN *et al.*, 2008), *Streptomyces* sp. (POLTI *et al.*, 2010), *Pseudomonas putida* (ACKERLEY, *et*

*al.*, 2004; PARK, *et al.*, 2000; ISHIBASHI *et al.*, 1990), *Escherichia coli* (ACKERLEY, *et al.*, 2004; BAE, *et al.*, 2005), *Bacillus* sp. ES29 (CONCEIÇÃO, 2006) e outros gêneros.

## **2.4 Técnicas de análise do experimento**

### **2.4.1 Eletroforese em gel**

A eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato das moléculas também influi, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel. A eletroforese normalmente é utilizada para separar proteínas e moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) (WESTERMEIER, 2005).

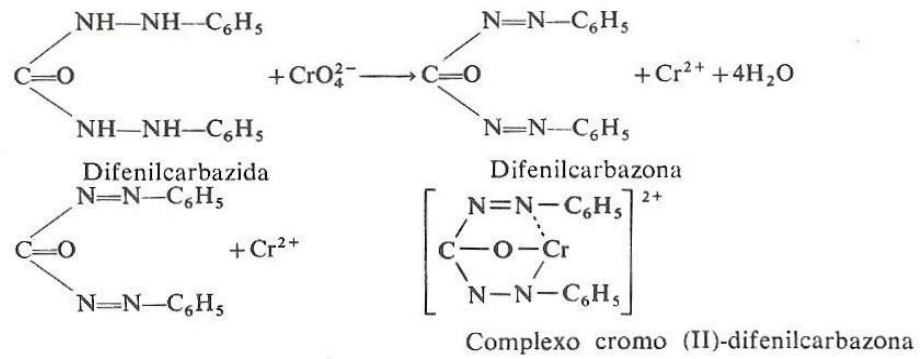
Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) carregado negativamente, que supera à carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma voltagem é aplicada. As proteínas do mesmo tamanho tendem a migrar através do gel com velocidades similares, pois sua estrutura nativa será completamente desdobrada pelo SDS, de maneira a que elas se liguem a uma mesma quantidade de SDS tendo, portanto, a mesma quantidade de cargas negativas. As proteínas maiores, com mais carga, são submetidas a forças elétricas maiores e também a um retardamento maior. Livres em solução, os dois efeitos seriam anulados, mas nas malhas do gel poliacrilamida, que agem como uma peneira molecular, as proteínas maiores são retardadas muito mais do que as menores. Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular. As proteínas majoritárias são facilmente detectadas corando-se as proteínas do gel com um corante como o azul Coomassie, e mesmo as proteínas menos abundantes são visualizadas em géis tratados com coloração de prata ou ouro (com o qual pequenas quantidades, como 10 ng de proteína, podem ser detectadas em uma banda) (WESTERMEIER, 2005).

#### 2.4.2 Espectrofotometria de absorção molecular na região do visível para determinação de cromo hexavalente

A espectrofotometria de absorção molecular na região do visível é uma das técnicas analíticas mais usadas nas determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, exemplo, na identificação de íons de metais pesados em corpos hídricos. A região visível do espectro é geralmente considerada entre o intervalo da faixa de 400 a 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 72 a 36 k.cal.mol<sup>-1</sup>. Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas (SILVERSTEIN *et al.*, 1997).

O cromo hexavalente é determinado com limite de quantificação de 17,5 µg L<sup>-1</sup> pelo método 1,5-difenilcarbazida, através da espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, com comprimento de onda de máxima absorção de 540 nm, sendo aplicado na quantificação de amostras com baixas concentrações de cromo (WRÓBEL *et al.*, 1997). O método colorimétrico para determinação e quantificação de cromo hexavalente baseia-se na reação do composto 1,5-difenilcarbazida em meio ácido com Cr<sup>6+</sup>, produzindo uma coloração violeta. A coloração desta técnica deriva-se de um complexo de Cr<sup>3+</sup> e difenilcarbazona que é responsável pela coloração nas amostras, onde esta coloração é produzida a partir da reação de oxidação da difenilcarbazida com o cromo hexavalente, nos quais são complexados, podendo assim absorver na região do visível em 540 nm (VOGEL, 1981; PFLAUM, 1956). A Figura 3 demonstra a reação para obtenção da coloração na técnica de determinação de cromo, pelo reagente 1,5-difenilcarbazida.

Figura 3 - Reação entre a 1,5-difenilcarbazida e íons  $\text{CrO}_4^{2-}$



Fonte: Adaptado de Vogel, 1981

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo avaliar o comportamento da linhagem bacteriana de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em soluções contendo o íon cromo hexavalente.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a cinética de crescimento e a capacidade de sobrevivência da linhagem bacteriana cultivada em meio contendo íon cromo hexavalente.
- b) Quantificar a concentração final de íon cromo hexavalente nos inóculos, após o tempo de incubação.
- c) Determinar a capacidade de produção da enzima cromato-redutase no meio extracelular, produzida pela linhagem bacteriana de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32.

## 4 METODOLOGIA

Inicialmente foi preparado um efluente sintético a partir do composto dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) na concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de íon cromo hexavalente, visando concentração de cromo acima das utilizadas normalmente em efluentes industriais, podendo assim verificar sua condição no ambiente.

### 4.1 Reagentes e equipamentos

Na tabela 1 são apresentados os equipamentos que foram utilizados em cada etapa do experimento, com suas marcas e as etapas em que foram empregadas durante o trabalho.

Tabela 1 - Relação de equipamentos, marcas, modelos e função utilizada em cada etapa do experimento

| Equipamento   | Marca / Modelo    | Função   |
|---|-------------------|--|
| Estufa  | NOVA ÉTICA        | Controle de temperatura  |
| pHmetro   | DIGIMED / DM – 22 | Medidas de pH  |
| Espectrofotômetro UV-VIS com percurso ótico de 1 cm | BEL / 1105        | Leitura das absorbâncias das soluções de Cromo                     |
| Chapa de aquecimento                                | TECNAL / TE - 038 | Digestão das amostras  |
| Balança analítica                                   | SHIMADZU / AY 220 | Pesagem  |
| Centrífuga  | NEOFUGE 1600R     | Centrifugação para a precipitação da biomassa de <i>K. oxytoca</i> |
| Bloco térmico                                       | AXYGEN            | Preparação da amostra para corrida no gel de poliacrilamida        |
| Fonte de eletroforese                               | FISHER BIOTECH    | Separação das bandas proteicas através de corrente elétrica        |

Fonte: Autoria própria

Na tabela 2 são descritos os reagentes utilizados durante o experimento.



Tabela 2 – Relação de reagentes utilizados nos procedimentos

| Reagente                   | Fórmula                 | Marca     | Utilização                                |
|----------------------------|-------------------------|-----------|---|
| Dicromato de Potássio      | $K_2Cr_2O_7$            | NUCLEAR   | Preparo das soluções sintéticas de Cromo  |
| Brain Heart Infusion Broth | BHI                     | OXOID     | Meio de Cultura                           |
| 1,5 Difenilcarbazida       | $C_{13}H_{14}N_4O$      | VETEC     | Solução de Difenilcarbazida               |
| Acetona PA                 | $C_3H_6O$               | NUCLEAR   | Diluição da 1,5-Difenilcarbazida          |
| Azida Sódica               | $NaN_3$                 | SYNTH     | Consumo do excesso de $KMnO_4$ da amostra |
| Ácido Sulfúrico PA         | $H_2SO_4$               | NUCLEAR   | Acidificação da solução                   |
| Permanganato de Potássio   | $KMnO_4$                | NUCLEAR   | Oxidação do Cr para $Cr^{6+}$             |
| Tris-HCl                   | $C_4H_{12}ClNO_3$       | KASVI     | Tampão de amostra                         |
| Glicerol                   | $C_3H_8O_3$             | KASVI     | Tampão de amostra                         |
| Solução de SDS             | $C_{12}H_{25}SO_4Na$    | HIMEDIA   | Tampão de amostra                         |
| 2-mercaptoetanol           | $C_2H_6OS$              | INTERBIOL | Tampão de amostra                         |
| Azul de Bromofenol         | $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$  | SERVA     | Tampão de amostra                         |
| Coomassie Brilliant Blue   | $C_{47}H_{50}N_3O_7S_2$ | BIO-RAD   | Corante                                   |
| Metanol                    | $CH_4O$                 | SYNTH     | Solução corante                           |
| Ácido acético              | $C_2H_4O_2$             | SYNTH     | Solução corante                           |

Fonte: Autoria própria

O experimento foi planejado com efluente sintético de  $300\text{mg. L}^{-1}$  e os fatores utilizados nas etapas foram:

Temperatura de incubação utilizada para o microrganismo foi de  $32^\circ\text{C}$ ;

Tempo de incubação das amostras foi de sete dias;

A bactéria utilizada foi uma linhagem padrão de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32;

Efluente sintético com concentração de  $300\text{ mg L}^{-1}$  de íon cromo hexavalente..

## 4.2 Preparo do pré-inóculo

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE.

Meio de cultura consiste da associação qualitativa e quantitativa de compostos químicos que fornecem nutrientes necessários para o desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural (UFBA, 2014). Para o preparo do pré-inóculo foi pesado 3,7g de Caldo Brain Heart Infusion (BHI), em um Erlenmeyer de 250 mL ao qual foi adicionado 100 mL de água deionizada. O Erlenmeyer foi tampando com uma camada de papel alumínio e uma de papel pardo para evitar contaminações externas, e esterelizado em autoclave à 120°C durante 10 minutos, garantindo a total descontaminação do meio de cultura.

Uma pequena fração das colônias isoladas de *K. oxytoca* CIP 79.32, que se encontrava em placas de petri foi transferida para o Erlenmeyer de 250 mL que continha o caldo BHI em capela de fluxo laminar, e o mesmo foi encaminhado para estufa numa temperatura constante de 32°C, ficando em incubação pelo período de 24 horas. A Figura 4 apresenta a transferência das colônias isoladas em placa para o meio de cultura.

Figura 4 – Preparo do pré-inóculo da *K. oxytoca* CIP 79.32



Fonte: Autoria Própria, 2014.

### 4.3 Preparo das amostras contendo íon cromo hexavalente

O efluente sintético para 1 litro de água deionizada foi acrescido de caldo BHI na quantidade de 37 g, juntamente com  $K_2Cr_2O_7$  na proporção de 0,8484 g para termos a concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo hexavalente.

Para o preparo das amostras foi transferido 100 mL desta solução para Erlenmeyers de 250 mL e em outros erlenmeyers não foi acrescido o contaminante, sendo utilizada água deionizada no volume de 100 mL, os quais foram tampados com papel alumínio juntamente com papel pardo para evitar a possível contaminação externa, e foi seguido de esterelização em autoclave à  $120^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Ao total, foram preparados onze frascos, utilizados para análise espectrofotométrica da densidade óptica (D.O.), quantificação do metal e análise da atividade enzimática, e foram inoculados conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Composição das amostras utilizadas no experimento e sua finalidade

| Frascos | BHI    | $K_2Cr_2O_7$ | <i>K. oxytoca</i> | Finalidade                      |
|---------|--------|--------------|-------------------|---------------------------------|
| 1       | Contem | Não contem   | Contem            | Branco bacteriano (D.O.)        |
| 2       | Contem | Não Contem   | Não contem        | Branco BHI (D.O.)               |
| 3       | Contem | Contem       | Contem            | Cromo bacteriano (D.O.)         |
| 4       | Contem | Contem       | Não Contem        | Cromo BHI (D.O.)                |
| 5       | Contem | Contem       | Contem            | 1° via amostra de efluente      |
| 6       | Contem | Contem       | Contem            | 2° via amostra de efluente      |
| 7       | Contem | Contem       | Contem            | 3° via amostra de efluente      |
| 8       | Contem | Contem       | Contem            | 4° via amostra de efluente      |
| 9       | Contem | Contem       | Contem            | Análise da atividade enzimática |
| 10      | Contem | Contem       | Contem            | Análise da atividade enzimática |
| 11      | Contem | Contem       | Contem            | Análise da atividade enzimática |

Fonte: Autoria Própria

A Figura 5 mostra as amostras utilizadas para análise do bioprocessamento de *K. oxytoca* CIP 79.32 em efluente sintético de cromo.

Figura 5 – Amostras contaminadas com íon cromo hexavalente utilizadas no bioprocesso pela linhagem de *K. oxytoca* CIP 79.32



Fonte: Autoria Própria, 2014.

#### 4.4 Inoculação das amostras com a bactéria

Em seis frascos de 100 mL de efluente (amostras 1, 3, 5, 6, 7 e 8) foram adicionados 5 mL da linhagem bacteriana, para o estudo do bioprocesso, tanto no crescimento microbiano, quanto na capacidade do microrganismo em reduzir o íon cromo hexavalente.

A Figura 6 apresenta a inoculação das amostras dos efluentes de cromo com a bactéria estudada.

Figura 6 - Inoculação da bactéria nos efluentes para verificação do comportamento microbiano



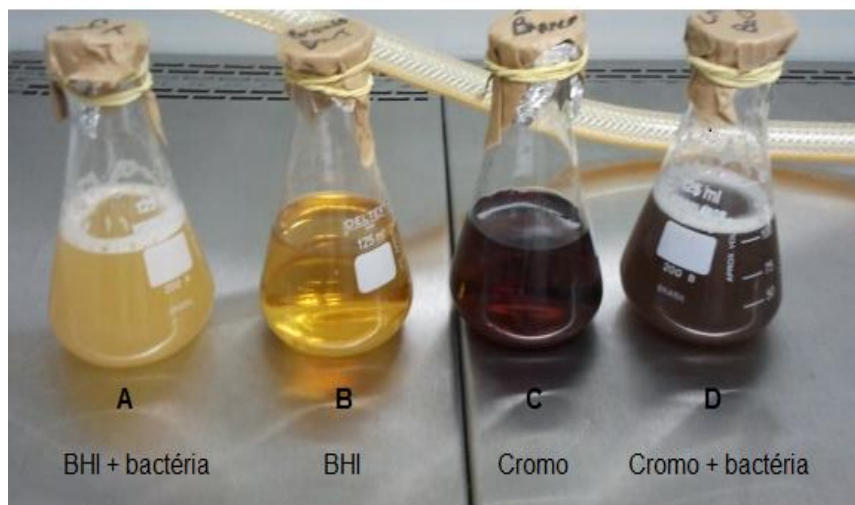
Fonte: Autoria Própria, 2014.

As amostras foram cultivadas em estufa com uma temperatura de 32° C por um período de sete dias.

#### 4.5 Análise do crescimento microbiano

Para avaliar o crescimento microbiano na presença e na ausência de  $\text{Cr}^{6+}$  foram realizadas análises espectrofotométricas da densidade óptica (D.O.) da cultura microbiana de *K. oxytoca* CIP 79.32 em solução. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de absorção molecular com comprimento de onda de 620 nm, através da medida direta de absorbância, por intervalos de 24 horas entre as leituras, e a partir desses dados foram construídas curvas de crescimento para o desenvolvimento microbiano. A Figura 7 apresenta as amostras de cromo e as da bactéria utilizadas para análise de D.O.

Figura 7 - Amostras utilizadas para análise da curva de crescimento microbiano



Fonte: Autoria Própria, 2014

Para análise de D.O. foi utilizado o frasco B como branco do espectrofotômetro para a leitura do frasco A, que corresponde ao comportamento microbiano sem a presença do íon metálico em questão. O frasco D foi utilizado como branco na leitura do equipamento a fim de se obter a leitura do frasco C, que possuía a bactéria juntamente com o cromo.

#### 4.6 Medição do pH

Foi realizada a verificação do pH das amostras utilizadas para a averiguação do crescimento bacteriano. As medidas foram feitas antes da inoculação do microrganismo e após o período de incubação de sete dias.

#### 4.7 Método colorimétrico para determinação de cromo hexavalente

Para a análise do efluente sintético, a metodologia utilizada para o preparo das soluções sintéticas de cromo hexavalente, seguida da leitura das concentrações, foi obtida a partir do *Standard Methods*, nas seções 3500-Cr B (APHA, 2005).

Este procedimento somente determina cromo hexavalente não detectando outras formas dos íons de cromo, assim sendo, para a determinação de cromo total converte-se todo o cromo presente na amostra, para o estado hexavalente através da oxidação com permanganato de potássio.

#### 4.8 Curva de calibração do íon cromo hexavalente

A curva de calibração foi realizada de acordo com o *Standard Methods*, nas seções 3500-Cr B (APHA, 2005). Padrões de cromo para a curva de calibração foram tratados da mesma forma que as amostras, sendo pipetados volumes da solução padrão variando de 1,00 a 10,0 mL, fornecendo assim os padrões das amostras.

Foram utilizadas amostras de 1, 2, 5 e 10 mL da solução padrão de cromo em Erlenmeyers de 250 mL, sendo adicionadas 5 gotas do indicador metilorange, até o aparecimento de uma coloração amarelada. Para que a solução possuísse um pH maior que 4,4, foi adicionado gota a gota  $H_2SO_4$  1:1, até que a amostra apresentasse valor de pH ácido, no qual mais 1 mL em excesso de ácido foi acrescentado para que tivéssemos um pH menor que 3,1 (VOGEL, 1981). Ajustou-se o volume a 100 mL com água destilada, colocando pérolas de vidro para aquecimento, até a redução do volume da amostra em 40 mL, e foram adicionadas 5 gotas de solução de  $KMnO_4$  aquecido até a fervura, deixando aquecer por mais 2 minutos. Após a permanência de uma tonalidade avermelhada na solução, ainda em

aquecimento foi adicionado 1mL de solução de azida sódica, responsável pelo consumo do excesso de permanganato na solução. Para a eliminação do excesso de azida, a fervura foi mantida por mais um minuto e depois a solução resultante foi resfriada a temperatura ambiente, ficando totalmente sem coloração.

O desenvolvimento da coloração nas amostras se deu com a adição de 2 mL do reagente difenilcarbazida, e foi aguardado de 5 a 10 minutos para aparecimento das tonalidades características das amostras. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro, dotado de uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm, e leitura de absorbância em 540 nm. Corrigiram-se as leituras de absorbância dos padrões por subtração da absorbância de um branco (água destilada), conduzido juntamente com as amostras, assim construindo uma curva de calibração a partir dos valores de absorbância destas amostras padrões.

#### 4.9 Tratamento das amostras

As amostras 5, 6, 7 e 8 foram centrifugadas, após transcorrido os sete dias do bioprocessamento, a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado da biomassa (precipitado), e foram retiradas alíquotas para posterior realização das análises. A Figura 8 apresenta as amostras 5, 6, 7 e 8 após o período de centrifugação.

Figura 8 - Amostras de cromo centrifugadas após o bioprocessamento



Fonte: Autoria própria, 2014.

#### 4.10 Quantificação de cromo hexavalente

A quantificação de cromo hexavalente foi realizada no Instituto de Química do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE. Foram utilizadas quatro amostras (5, 6, 7 e 8) para averiguar a redução de cromo no meio, no qual foram realizadas análises em triplicatas, totalizando doze análises. As amostras foram diluídas com água destilada numa proporção de 1/100 mL. Para a análise de cromo foi utilizado o método colorimétrico da difenilcarbazida, como descrito na curva de calibração.

#### 4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Departamento de Ciência de Alimentos (ICTA) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob coordenação do Prof. Dr. Adriano Brandelli e orientação da Mestra Jamile Queiroz Pereira.

A técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para averiguar a possível produção da enzima cromato-redutase, pela linhagem bacteriana de *K. oxytoca* CIP 79.32 no meio extracelular.

Foram preparadas três soluções de dicromato de potássio com concentrações de 75, 150 e 300 mg L<sup>-1</sup> de cromo hexavalente (amostras 9, 10 e 11), juntamente com caldo BHI e a linhagem de *K. oxytoca*, e uma sem a presença do contaminante. As amostras foram incubadas em estufa por 48 horas à 32°C. Após transcorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C.

Após a centrifugação, 500 µL dos sobrenadantes obtidos foram ressuspensos em 500 µL de tampão de amostra (1 mL de Tris-HCl 500 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de solução de SDS, 0,4 mL de 2-mercaptoetanol; 0,4 mL de solução de azul de bromofenol e 3,8 mL de água destilada), e as misturas foram aquecidas por 5 minutos em bloco térmico, numa temperatura de 100°C. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12 %, contendo 0,1% de SDS 10%.

A separação das proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (150 V, 25 mA, por 1 hora e 30 minutos) e a visualização das bandas foi possível através da coloração do gel com corante *Blue Comassie* (*Blue Comassie* 1%,



metanol 40%, ácido acético 10%, água destilada 50%). Transcorrido o tempo da técnica, o gel foi descorado usando uma solução descorante (metanol 40%, ácido acético 10%, água destilada 50%).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Curva de crescimento

Primeiramente foram realizadas leituras do crescimento bacteriano, pelo método da Espectrometria de Densidade Óptica, para a averiguação do comportamento bacteriano frente ao metal e sem a presença do mesmo. Foram realizadas seis leituras relativas ao crescimento microbiano, e entre as medições foi de, no mínimo 24 horas. Os resultados encontram-se na tabela 5.

Tabela 4 – Medidas da densidade óptica para avaliação do crescimento de *K. oxytoca* CIP 79.32 em presença e ausência de cromo hexavalente

| <b>Tempo</b>  | <b>Branco D.O</b> | <b>Cr<sup>6+</sup> D.O</b> |
|---------------|-------------------|----------------------------|
| <b>0º dia</b> | 0,203             | 0,169                      |
| <b>1º dia</b> | 1,346             | 1,346                      |
| <b>2º dia</b> | 1,827             | 1,827                      |
| <b>3º dia</b> | 1,951             | 1,951                      |
| <b>4º dia</b> | 2,009             | 2,051                      |
| <b>5º dia</b> | 1,967             | 1,793                      |

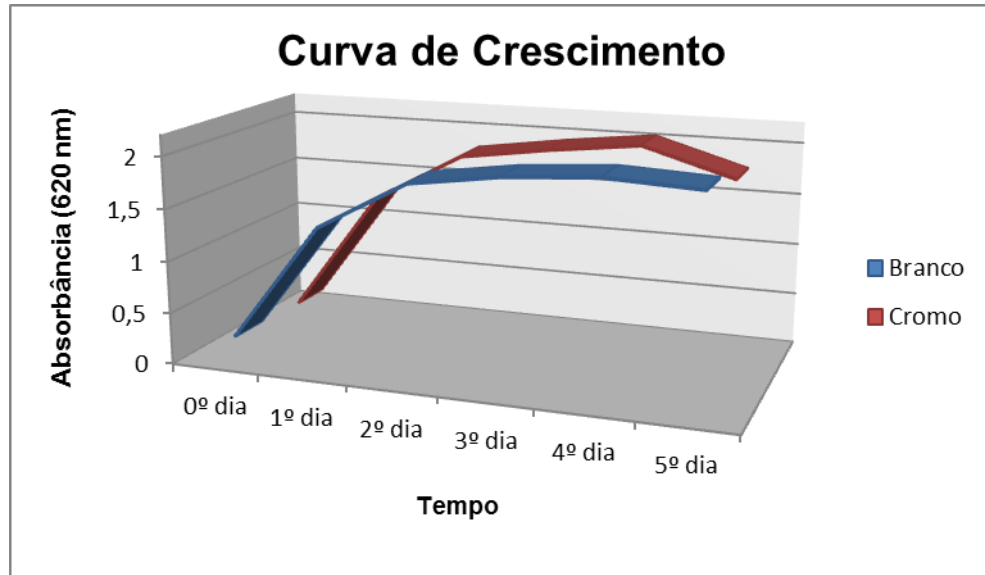
Fonte: Autoria própria

Tempo: 24 horas entre cada leitura

$\lambda$ : 620 nm

A Figura 9 representa o gráfico que relaciona o crescimento da *K. oxytoca* CIP 79.32 durante o tempo de incubação com a densidade óptica das amostras contaminadas com cromo hexavalente e um branco.

Figura 9 – Gráfico que relaciona o crescimento de *K. oxytoca* CIP 79.32 em presença e ausência de íon cromo hexavalente



Fonte: Autoria Própria, 2014

O comportamento bacteriano durante o tempo de crescimento proposto foi equiparado, tanto na presença como na ausência de cromo, este fato deve-se à presença de fontes de nutrientes, temperatura, pH, pressão osmótica, e ao fato da bactéria em estudo possuir uma determinada rota de neutralização do íon contaminante, para diminuir a possível interferência do mesmo nas suas atividades metabólicas e conseqüentemente uma inibição na reprodução celular e aumento da população microbiana no meio.

Na fase *lag* (tempo inicial de divisão celular) o microrganismo em questão mostrou a capacidade de se reproduzir de forma rápida, mesmo na presença de um íon tóxico, como é o caso do cromo hexavalente. A fase *lag* no experimento foi observada nos tempo correspondente as medições do 0 e 1º dias, com uma duração total de aproximadamente 24 horas de adaptação ao meio de cultivo. Esse fato revela que a bactéria consegue realizar, desde o início do processo de divisão celular, um mecanismo de imobilização ou neutralização desse composto, de forma que não interfira em seu metabolismo.

A fase estacionária foi verificada entre os intervalos do 2º e 4º dias, por apresentar uma equiparidade entre as leituras de absorbância e criando uma linearidade no gráfico entre os espaços de tempo. Na fase estacionária ocorre o

esgotamento de nutrientes do meio e a taxa de morte e crescimento celular são equiparadas. Nessa fase ocorre a possível utilização de contaminantes ambientais como fonte de nutrientes, visto que, a quantidade de carbono e nitrogênio iniciais adicionados através do meio de cultura, já não está mais presente, e uma alternativa para a continuação do desenvolvimento microbiano no processo será utilizar uma de fonte nutricional alternativa. Muitos compostos tóxicos para as diversas espécies, tais como: hidrocarbonetos, metais pesados, pesticidas e entre outros, podem servir como nutrientes para o metabolismo bacteriano.

A fase de morte celular foi verificada no intervalo do 5º dia, com o decaimento da absorvância e, conseqüentemente, a diminuição da concentração de células bacterianas no meio. Na fase de lise celular ocorre a ruptura da parede celular ocasionando a liberação do conteúdo intracelular e posteriormente a morte da célula. Esse fenômeno ocorre porque o microrganismo não possui mais nenhuma fonte de nutrição e, sucessivamente, acumulo de água no meio interno da célula bacteriana, causando um inchaço na estrutura e o seu rompimento (MADIGAN *et al.*, 2010).

Conceição (2006) descreve o crescimento ótimo de vinte isolados bacterianos de solo na presença de cromo hexavalente, num intervalo de 96 horas, no qual todas as linhagens apresentaram aumento nos valores de absorvância e, conseqüentemente, os isolados bacterianos apresentaram redução da concentração inicial de cromo, porém cada microrganismo tende a possuir um mecanismo para a redução do íon metálico.

O pH durante o crescimento bacteriano foi medido nas amostras utilizadas para o acompanhamento da cinética de crescimento com a presença de cromo e na ausência do contaminante, obtendo-se os valores demonstrados na tabela 6.

Tabela 5 – Valores de pH no início e final do bioprocesso

| <b>Etapa</b>          | <b>Cromo</b> | <b>Branco</b> |
|-----------------------|--------------|---------------|
| Antes do bioprocesso  | 7,96         | 7,54          |
| Depois do bioprocesso | 8,21         | 7,85          |

Fonte: Autoria própria.

Os valores do pH tanto na presença do contaminante, como na ausência do mesmo, não apresentou uma grande variação, permanecendo na região próxima da neutralidade. Essa baixa variação no valor do pH por parte da linhagem bacteriana em estudo é esperada, visto que a mesma é um microrganismo neutrófilo, ou seja, com crescimento numa faixa de pH ótimo entre 6,0-9,0.

## 5.2 Curva de calibração do íon cromo hexavalente

A tabela 6 demonstra os valores obtidos de absorvância na determinação da curva de calibração.

Tabela 6 - Valores de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) x Absorvância utilizados para a curva de calibração

|                | <b>Concentração<br/>(<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b> | <b>Absorvância</b> |
|----------------|---|--------------------|
| P <sub>0</sub> | 0,000   | 0,000              |
| P <sub>1</sub> | 1,000   | 0,032              |
| P <sub>2</sub> | 2,000   | 0,059              |
| P <sub>3</sub> | 5,000   | 0,166              |
| P <sub>4</sub> | 10,000  | 0,342              |

Fonte: Autoria Própria

Sendo o coeficiente de correlação obtido de  $R^2 = 0,9933$ , caracterizando uma curva de calibração adequada para a realização das análises do íon cromo hexavalente.

## 5.3 Determinação da redução de cromo hexavalente

Para averiguar a capacidade de redução de cromo hexavalente no ambiente pela ação do microrganismo em estudo foram utilizadas quatro amostras em triplicata, totalizando doze análises, pelo método da 1,5-difenilcarbazida, por um período de sete dias.

Os resultados das análises da redução das concentrações de cromo ao longo do experimento pela ação bacteriana a partir de uma concentração inicial de 300 mg L<sup>-1</sup> do íon cromo hexavalente encontra se na tabela 6, a seguir com a média dos valores e a incerteza tipo A.

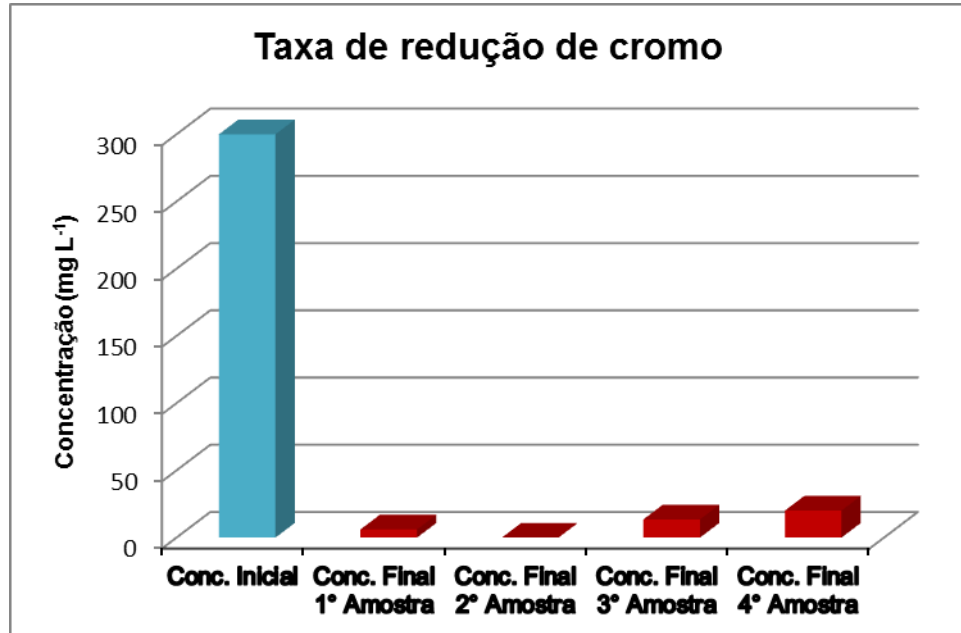
Tabela 7 – Média da redução da concentração de íon cromo hexavalente no bioprocesso

| <b>Amostras</b> | <b>Média da concentração final de cromo hexavalente e a incerteza tipo A (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Porcentagem de redução (%)</b> |
|-----------------|--|-----------------------------------|
| 1º amostra      | 6,009 ± 0,939  | 98                                |
| 2º amostra      | 0,000 ± 0,000  | 100                               |
| 3º amostra      | 13,52 ± 0,81   | 95,5                              |
| 4º amostra      | 20,09 ± 1,24   | 93,3                              |

Fonte: Autoria própria.

A Figura 10 mostra a taxa de redução de cromo em relação ao valor inicial utilizado do contaminante.

Figura 10 – Gráfico da relação inicial e final da concentração de cromo hexavalente no bioprocesso realizado pela bactéria *K. oxytoca* CIP 79.32



Fonte: Autoria própria, 2014.

Considerando os dados apresentados na tabela e a variação entre o valor inicial e final demonstrado no gráfico, pode-se verificar a grande ação na redução da concentração do contaminante por parte da linhagem de *K. oxytoca* CIP 79.32 em estudo. O microrganismo em questão promoveu redução acima dos 93% da concentração inicial de cromo hexavalente, no que confere um microrganismo com alta capacidade de utilizar um doador de elétrons, para proporcionar a redução do íon, conseqüentemente diminuindo a toxicidade do ambiente em questão. Esse desempenho por parte da bactéria pode ser demonstrado pela alta toxicidade do metal na sua forma hexavalente, e conseqüentemente a mesma precisa criar alguma rota de minimizar o efeito tóxico do cromo na célula bacteriana. Por esse motivo, os microrganismos tendem a ter uma alta taxa de redução de metais tóxicos, em contrapartida, metais considerados pelo microrganismo como não prejudiciais ou um nutriente, tendem a não ser metabolizados completamente.

Os fatores escolhidos para o procedimento, como fonte de carbono, temperatura e pH favoreceram o potencial de redução por parte do microrganismo, visto que todas as condições ideais para o desenvolvimento foram proporcionadas à cepa em estudo. Esses fatores proporcionaram que a bactéria tivesse um

desenvolvimento acelerado e ideal, entretanto, se tivesse sido utilizado um meio sintético somente na presença de cromo hexavalente, dificilmente haveria o desenvolvimento e redução do íon metálico.

A capacidade de reduzir cromo hexavalente foi evidenciada por Conceição (2006), cujas linhagens utilizadas para averiguação da redução do metal no experimento tiveram uma maior redução do valor inicial de cromo no período entre 24 a 48 horas do processo, no qual os valores médios de redução de todos isolados foram em torno de 35% do inicial, devido ao fato dos isolados realizarem o mecanismo desde o início da inoculação. As linhagens que demonstraram a capacidade de redução pertenceram aos gêneros *Aeromonas*, *Xanthobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus* e *Aureobacterium*, sendo esses microrganismos provenientes do solo e possuir relação com outros organismos, podendo ter adquirido a capacidade de redução através da transferência de material genético de outros microrganismos.

Brito (2013) demonstra para a mesma linhagem de *K. oxytoca* CIP 79.32 a preferência do microrganismo o qual, nas condições de estudo, o microrganismo reduziu em 85% a concentração de cromo hexavalente. Entretanto, o mesmo organismo para a remediação de zinco bivalente apresentou uma redução da concentração inicial de apenas 38%. Esse trabalho relatou a possível seletividade que a cepa de *K. oxytoca* CIP 79.32, possa ter em reduzir compostos prejudiciais ou não ao seu metabolismo. Por esse motivo, estudos devem ser realizados para averiguar a relação entre o microrganismo e o contaminante, e a melhor forma de ação para implementar um processo de biorremediação.

A capacidade dos microrganismos em reduzir o íon cromo hexavalente para trivalente tem por característica a minimização da toxicidade do composto perante a bactéria. Ilhan *et al.* (2004) já evidenciou a redução de cromo hexavalente por linhagens bacterianas, como demonstrou a viabilidade da utilização de uma linhagem de *Staphylococcus saprophyticus* na biossorção do metal na sua parede celular, através da interação do contaminante metálico com a mureína (peptideoglicano). Essa interação ocorre através da interação entre cargas, visto que a mureína possui carga negativa e o metal carga positiva. Entretanto, outros microrganismos possuem mecanismos diferentes para agir perante um contaminante, como relata Conceição (2009), através do estudo com *Bacillus* sp ES29 em meio contendo cromo hexavalente. Nesse caso o mecanismo de redução



do metal por parte da bactéria se dá pela rota enzimática, com a produção de uma enzima, denominada cromato-redutase. Esta serve como um transportador de elétron para o microrganismo transferir elétrons de um doador para o íon hexavalente, e conseqüentemente, diminuir a toxicidade do metal perante a célula bacteriana.

Wieliczko (2012) demonstrou a capacidade de *Pseudomonas aeruginosa*, em um intervalo de 10 dias, reduzir do meio 51,9% (m/m) de cromo hexavalente. Entretanto, a rota de biorremediação por parte do gênero *Pseudomonas* é muito discutível, pois esse grupo de bactérias tem uma grande importância na síntese de biossurfactantes, que são importantes na precipitação extracelular, com a produção de uma substância pelo microrganismo e a agregação do metal na estrutura do composto. Contudo, esse gênero também tem por mecanismo a bioacumulação intracelular, com a produção de grupos de enzimas responsáveis pela redução do metal.

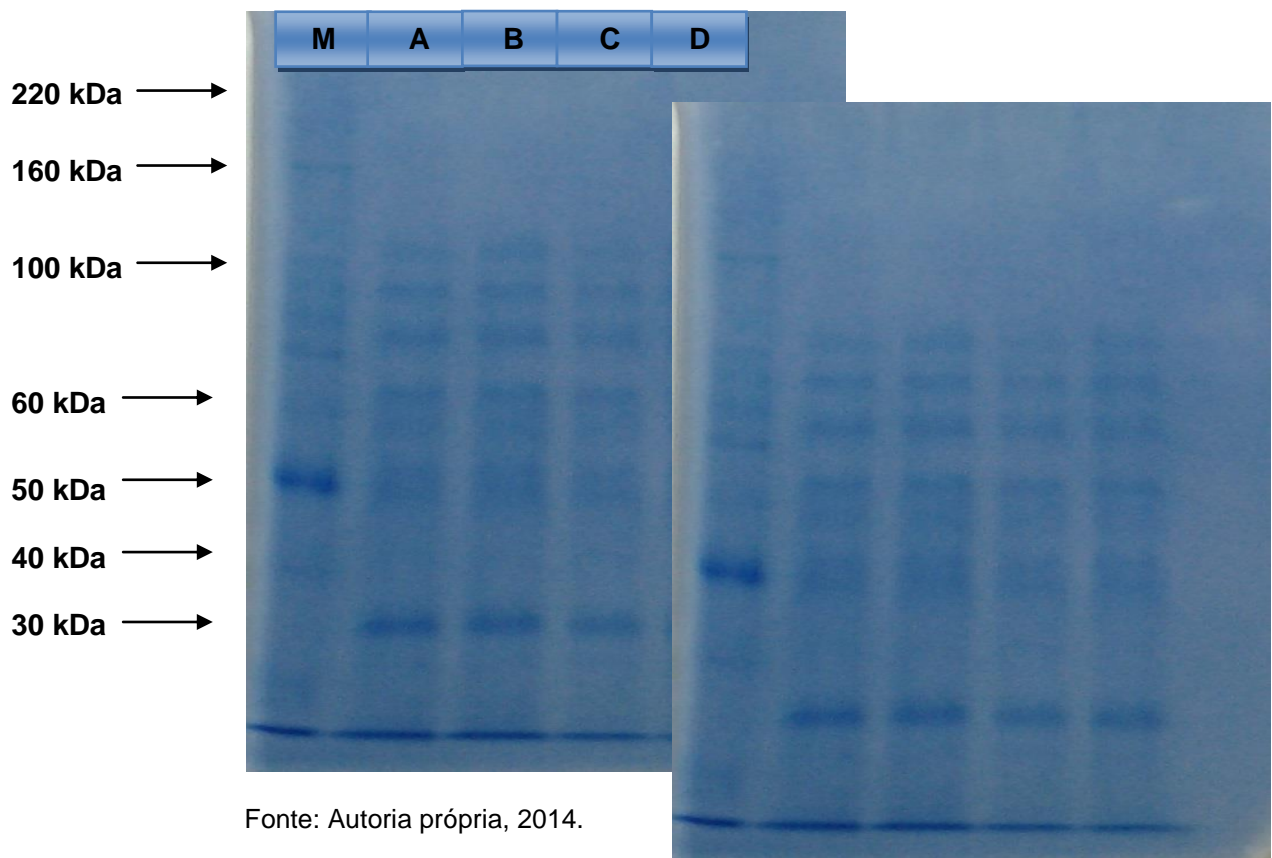
Um fator importante que afeta o desempenho na taxa de biorremediação e o meio de cultivo selecionado para o desenvolvimento do microrganismo, como relatam Spagiari (2011) para as bactérias *P. aeruginosa*, *B.subtilis* e *S. marcescens* e Wieliczko (2012) para *P. aeruginosa*, no qual a utilização de um meio de cultura sem nenhuma fonte de carbono, e somente a utilização de sais inorgânicos, não proporciona uma taxa de desenvolvimento celular adequado, e conseqüentemente, a não redução do metal pelas linhagens bacterianas.

#### **5.4 Determinação da atividade enzimática no meio extracelular**

A redução do cromo hexavalente pela linhagem de *K. oxytoca* CIP 79.32 foi comprovada pelo experimento anterior, entretanto, uma verificação da rota metabólica é requerida, para o planejamento da melhor estratégia na implementação de um bioprocessos.

Para a determinação da possível atividade enzimática no meio extracelular foram utilizadas 4 amostras, no qual uma é o Branco, que não consta o contaminante, e três com concentrações diferentes de cromo, para verificar a provável interferência da concentração na síntese da enzima. A Figura 11 demonstra o gel resultante da eletroforese em gel de poliacrilamida.

Figura 11 – Análise da eletroforese em gel de poliacrilamida



Fonte: Autoria própria, 2014.

M: Marcador de peso molecular

A: Bactéria na ausência de cromo

B: Bactéria na concentração de  $75 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo hexavalente

C: Bactéria na concentração de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo hexavalente

D: Bactéria na concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo hexavalente

Pela análise do gel resultante da eletroforese podemos verificar a não ocorrência de uma enzima no meio extracelular. Percebe-se isto quando não se evidencia bandas diferentes no gel, ou seja, todas as amostras tiveram exatamente as mesmas bandas na análise, evidenciando a síntese das mesmas enzimas e compostos em todas as concentrações de cromo e no branco.

A enzima cromato-redutase no meio intracelular é evidenciada por vários autores, dentre eles Opperman *et al.* (2008), Polti *et al.* (2010), Ackerley *et al.* (2004); Park *et al.* (2000); Ishibashi *et al.* (1990), Bae, *et al.* (2005), e Conceição

(2006), no qual relatam que as enzimas do grupo das cromato-redutases são encontradas no citoplasma bacteriano, pelos microrganismos que utilizam a rota enzimática para realizar a redução do contaminante.

Segundo Conceição (2006) o mecanismo mais provável para a redução do íon cromo é a ação intracelular, no qual o cromo hexavalente é transportado pelos canais de porina, que são proteínas transmembranas que facilitam a entrada de substâncias no meio intracelular, e conseqüentemente o íon é reduzido pela enzima no citoplasma.

Mejía *et al* (2006) relata que após a redução e formação do íon cromo trivalente, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* através da enzima ChrA característica desse microrganismo, tende a retirar do citoplasma grande quantidade de cromo, pois o microrganismo não tolera altas concentrações de íon cromo no seu meio intracelular, visto que, o metal é muito tóxico para essa bactéria.

Opperman *et al* (2008) demonstrou a capacidade de reduzir cromo hexavalente pela ação de uma cromato-redutase do microrganismo *Thermus scotoductus* AS-01 isolado de uma mina de ouro na África do Sul. A enzima possuía uma massa molecular de aproximadamente 36 kDa e os doadores de elétrons para o cromo hexavalente foram NADH e NADPH. A competência do microrganismo em utilizar o meio intracelular para a redução de contaminantes é potencializada, por o meio apresentar uma estrutura fisiológica adequada para que ocorra a biotransformação, cujo a rota de bioacumulação é a preferencial para esse tipo de metal. Entretanto, outros microrganismos tendem a possuir compostos diferentes na biotransformação do cromo, como é o caso relatado por BAE *et al* (2004) no estudo referente a *Escherichia coli* ATCC 33456, cujo resultados sugerem a ação de uma estrutura dimérica, com massas de 42 e 84 kDa em SDS-PAGE, em temperatura ótima de 37°C e pH 7,0. Outra bactéria com aptidão para a síntese de enzima cromato-redutase é o *Bacillus sp.* ES29 estudado por Conceição (2009), cujas condições ótimas para a formação da enzima pelo microrganismo são: temperatura de 25 a 30°C e pH 6,0 a 8,0.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho comprovou que a bactéria dependendo do ambiente, e dos fatores a que é submetida reage de forma específica em relação ao contaminante presente.

A partir do estudo realizado pode-se afirmar que a linhagem de *K. oxytoca* CIP 79.32 apresentou crescimento no efluente sintético contaminado com o íon cromo hexavalente e de acordo com os valores obtidos, a concentração de cromo hexavalente apresentou redução, acima de 90% de diminuição da concentração inicial. Assim, esta espécie bacteriana, mostra-se extremamente promissora, quanto a possibilidade de utilização em processos de biorremediação.

Pela análise enzimática realizada no experimento, demonstra que a possível rota de neutralização do contaminante, pelo microrganismo em estudo, seria através da adsorção dos íons cromo hexavalente na membrana celular, fato que poderia estar relacionado com a interação entre as cargas e/ou com a bioacumulação no meio intracelular bacteriano, sendo o mecanismo realizado pela enzima cromato-reductase.

O objetivo inicial deste estudo foi avaliar a linhagem de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em efluente sintético contaminado com cromo, o qual foi alcançado, sendo comprovada a eficiência da redução do cromo hexavalente no efluente sintético. Entretanto não foi possível a determinação de uma enzima com característica de reduzir o metal no meio extracelular.

## 7 SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

Para estudos futuros é necessária a realização de novas pesquisas que visem à utilização de substratos alternativos, para que o processo tenha um custo menor, e conseqüentemente seja utilizado em escala industrial.

Analisar a resistência da *K. oxytoca* CIP 79.32 frente a este metal ao longo do bioprocessamento, determinando sua citotoxicidade e dose letal para o microrganismo.

Determinar a rota metabólica bacteriana e a possível assimilação desse metal imobilização pela bactéria. A partir deste conhecimento seriam possíveis análises específicas para a determinação e a localização intra e extracelular deste íon por microscopia eletrônica.

Isolar a enzima responsável pela redução do contaminante, juntamente com a determinação da sua massa molar e estrutura química, e conseqüentemente a possível utilização da mesma em processos industriais.

Aperfeiçoar uma metodologia visando a biorredução desse e de outros metais, bem como, a utilização de outras espécies microbianas, com possibilidade de serem utilizadas em sistemas fechados, para aumentar a redução sem danos ao meio ambiente.

Finalmente, novos estudos visando à aplicabilidade em escala industrial, mostrando a realidade dos custos, vantagens e desvantagens da sua adaptação em plantas reductoras indústrias existentes.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. Z. M. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.
- ABREU, I. M. O.; JUNQUEIRA, A. M. R.; PEIXOTO, J. R.; OLIVEIRA, S. A. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 108-118, 2010.
- ACKERLEY, D.F.; GONZALEZ, C.F.; PARK, C.H.; BLAKE II, R.; KEYHAN, M.; MATIN, A. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 2, p. 873-882, 2004.
- ALMEIDA, M. C. L. de. **Sepse de origem hospitalar por *Klebsiella spp.* em unidades neonatais: evolução clínica**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- APHA, AWWA and WEF. **Standard Methods for the examination of water & wastewater, 3500-Cr B**. Colorimetric Method, 21<sup>st</sup> edition, Washington, D.C, p.3-66, 2005.
- BAE, W. C.; LEE, H.K.; CHOE, Y.C.; JAHNG, D.J.; LEE, S.H.; KIM, S.J.; LEE, J.H.; JEONG, B.C. Purification and Characterization of NADPH-Dependent Cr(VI) Reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 1, p.21-27, 2005.
- BEHAR, P. R. P. **Influência da seleção do grupo controle na análise de fatores de risco para infecções hospitalares por *Klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido**. 2004. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Medicina (pneumologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 65-68, 2003.

BRITO, M. B. **Determinação colorimétrica de capacidade redutora de íons cromo e zinco por linhagem de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32**. 2013. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, 2013.

CARNEIRO, D. de A., GARIGLIO, L. P. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. **Revista Tecer**, Belo Horizonte. v. 3, n. 4, p.82-95, 2010.

CASTILHOS, D. D. **Alterações químicas e biológicas devidas à adição de resíduos de curtume e de cromo hexavalente ao solo**. 1998. 197 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 1998.

CONCEIÇÃO, D. P. **Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp. ES29**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre. 2006.

CONCEIÇÃO, D. P.; PASSOS, C. T.; JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; SIMONETTI, A. B.; CAMARGO, F. A. O. A novel chromate reductase from *Bacillus* sp. ES29: Characterization and partial purification. **Rev. Ciênc. Exat. e Natur.**, v. 11, n. 2, p. 238-256, 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução 430 de maio de 2011**. Disponível em: <[www.mma.gov.br/port/conama](http://www.mma.gov.br/port/conama)>. Acessado em: 25 de jan. 2014.

FERREIRA, A. O impacto do cromo nos sistemas biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.572-578, 2002.

FREITAS, G. D. de. **Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus spp.* e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta.** 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada á Zoonoses, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GARCIA Jr, O., BEVILAQUA, D. Microrganismos, Minerais e Metais. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental.** Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 2008, p. 50-81.

GAYLARDE, C.C., BELLINASSO, M.L., MANFIO, G.P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** n. 34, 2005.

HAN, X., GU, J-D. Sorption and transformation of toxic metals by microorganisms. In: MITCHELL, R., GU, J-D. **Environmental Microbiology.** New Jersey, USA: Wiley-Blackwell, 2010, p. 153-176.

HAYASHI, A. M. **Remoção de cromo hexavalente através de processos de bioissorção em algas marinhas.** 2001. 232 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008

ISHIBASHI, Y.; CERVANTES, C.; SILVER, S. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. **Appl. Environ. Microbiol.**,v. 56, n. 7, p. 2268-2270, 1990.

LOPES, F. M. **Isolamento e identificação de *Klebsiella* de solo de cerrado e o uso de suas enzimas para modificação química de fungicidas.** 2008. 127 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock.** 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.



MATOS, W. O.; NÓBREGA, J. A.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A. Especificação redox de cromo em solo acidentalmente contaminado com solução sulfocrômica. **Quím Nova**. v. 31, n. 6, p. 1450-1454, 2008.

MEJÍA, R. J., GARCIA, J. C. CERVANTES, C. Membrana topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Lett.** v.262, n. 2, p. 178-184, 2006.

MITCHELL, R., GU, J-D. **Environment Microbiology**. New Jersey, USA: Wiley-Blackwell, 2010, 363 p.

NOURBAKHS, M. N., KILIÇARSLANA, A. S., IİHANC, S., OZDAGB, H. Biosorption of  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions in industrial wastewater on *Bacillus sp.* **Chemical Engineering Journal**. v. 85, n.(2-3), p. 351-355, 2002.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). **Report on Carcinogens 2011**. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/>>. Acessado em: 16 de jan. 2014.

OPPERMAN, D. J.; PIATER, L.A.; HEERDEN, E. A novel chromate reductase from *Thermus scodoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. **J. Bacteriol.**, n. 8, v. 190, p. 3076-3082, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Elementos Traço na Nutrição e Saúde Humanas**. São Paulo: Roca, 1998. 297 p.

PARK, C.H.; KEYHAN, M.; WIELINGA, B.; FENDORF, S.; MATIN, A. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n.5, p. 1788-1795, 2000.

PERCI, R. D. Plasmídeos bacterianos. **Revista de Ciências Humanas da Unipar**, Cascavel, p.23-28, 1994.

PERES, A.; FIEGENBAUM, M.; TASCA, T. **Manual de consulta rápida em microbiologia**. Porto Alegre: Sulina, 2007. 151 p.

PFLAUM, R. T. & HOWICK, L. C. The chromium-diphenylcarbazide reaction. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 19, n. 78, p. 4862-4866, 1956.

POLTI, M.A.; AMOROSO, M.J.; ABATE, C.M. Chromate reductase activity in *Streptomyces* sp. MC1. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 56, p. 11-18, 2010.

RAMÍREZ-DÍAZ, M. I. et al. Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismos y aplicaciones. **Revista de Educación Bioquímica**, Distrito Federal, v. 28, n. 3, p.73-79, 2009.

SANTOS, R. M; RIZZO, A. C. L; SOBRAL, L. G. S. **Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – escala piloto**. Campinas: Centro de tecnologia mineral - CETEM, 2007.

SILVEIRA, A.; SPAREMBERGER, R. F. L. **A relação homem e meio ambiente e a reparação do dano ambiental: reflexões sobre a crise ambiental e a teoria do risco na sociedade**. Universidade de Caxias do Sul - UCS, Caxias do Sul, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 1994.

SPAGIARI, M. S. **Avaliação da cinética de crescimento e capacidade de sobrevivência de microrganismos cultivados em meios contendo contaminantes orgânicos e inorgânicos**. 2011. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, 2011.

TEIXEIRA, A. M. S.; GARRIDO, F. M. S.; MEDEIROS, M. E. Caracterização e classificação quanto ao risco ambiental do estéril da mina de cromita do município de Andorinha, Bahia. **Quím. Nova**. v. 35, n. 9, p. 1794-1799, 2012.

UFBA. *Disponível em:*

<[www.microbiologia.ufba.br/aulas/MEIOS%20DE%20CULTURA.doc](http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/MEIOS%20DE%20CULTURA.doc)>. Acessado em: 12 de abr 2014.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Mestre Jou, 1981.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**. Weinheim: Wiley-vch, 2005. 399 p.

WIELICZKO, D. **avaliação da redução do cromo em águas utilizando o microrganismo *pseudomonas aeruginosa* como biorremediador**. 2012. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, 2012.

WRÓBEL, K, LÓPEZ-DE-ALBA, P. L. & LÓPEZ MARTÍNEZ, L. Enhanced spectrophotometric determination of chromium (VI) with diphenylcarbazide using internal standard and derivative spectrophotometry. **Talanta**, v. 11, n. 44, p. 2129-2136, 1997.

**ANEXO A – MEIOS DE CULTURA**

## Caldo BHI

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Infusão Sólida de Cérebro..... | 12,0g |
| Infusão Sólida de Coração..... | 5,0g  |
| Peptona.....                   | 10,0g |
| Glucose.....                   | 2,0g  |
| Cloreto de sódio.....          | 5,0g  |
| Fosfato dissódico.....         | 2,5g  |

pH 7,4 ± 0,2 à 25°C

Dissolver 37 g em 1 litro de água destilada. Misturar bem e distribuir em frascos.  
Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos.

## ANEXO B – CERTIFICADO DA LINHAGEM BACTERIANA



Coleção de Culturas Tropical  
www.oct.org.br

Fundação André Tosello  
www.fat.org.br  
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral  
CEP 13067-010 Campinas SP  
Fone/Fax: (19) 3242-7022  
Fax: (19) 3242-7827  
CNPJ 46.126.322/0001-82

Campinas, 10/Abr/2013

**Prof. Delmar Bizani/ Matheus Spagiari**  
Unilasalle  
Av. Victor Barreto, 2288 Centro  
Canoas-RS  
92010-000  
Fone: (051) 99619827/(051) 3476 8469  
E-mail: delmib@terra.com.br/ souzasp@hotmaill.com

Ref: Distr\_IP - OS 130164

Prezado Sr.,

Estamos enviando uma ampola com cultura liofilizada de cada um dos microrganismos abaixo:

| CCT  | Microrganismo             | Referência | Lote  | Quant | Meio | T(°C) |
|------|---------------------------|------------|-------|-------|------|-------|
| 0182 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | CIP 79.32  | 09.10 | 1     | NA   | 37    |

Anexo seguem a metodologia de abertura das ampolas e reativação das linhagens, bem como a formulação dos seus respectivos meios de crescimento/manutenção, temperaturas de incubação e as informações disponíveis em nosso banco de dados.

O valor desta remessa é de R\$ 300,00 (Trezentos reais), cuja fatura e boleto bancário, emitidos pelo setor de contabilidade da FAT, acompanham o material.

Agradecemos a solicitação de nossos serviços e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Atenciosamente,

  
**Josiane Conti**  
Coleção de Culturas CCT/FAT  
E-mail: josi@fat.org.br