



SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES À CROMO HEXAVALENTE EM ÁGUA E SEDIMENTOS PROVENIENTES DO RIO CACHOEIRA - JOINVILLE-SC

Matheus F. R. F. BELO¹; André. L. F. SOUZA².

¹ Bolsista Edital 22/2016 PIBIC-EM/CNPq/IFC; ² Orientador IFC-Campus Araquari

RESUMO

Dentre os vários resíduos poluentes, tem-se compostos orgânicos e metais pesados como o cromo, despejados por atividades geológicas (intemperismo) ou antropogênica. Assim, há microrganismos biorremediadores capazes de converter o cromo hexavalente – Cr(VI) em formas menos tóxicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias resistentes a Cr(VI) a partir do rio Cachoeira – Joinville-SC. A bactéria isolada foi caracterizada como sendo um estreptococo Gram negativo, catalase-positivo e resistente a penicilina. Em testes de crescimento foi observado que o isolado foi capaz de crescer até uma concentração máxima de 450 mg/l, sendo capaz de crescer na presença e na ausência de oxigênio, sendo que o crescimento e a capacidade de tolerar o Cr(VI) são maiores em condições aeróbicas.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ordenamento hidrográfico do município de Joinville-SC é constituído por sete unidades de planejamento e gestão dos recursos hídricos (bacias hidrográficas). Ela drena uma área de 83,12 km², que representa 7,3% da área do município. Ao longo do seu curso, de 14,9 km de extensão tem como afluentes principais cerca de 20 rios e riachos. No entanto, a maior parte do seu curso, o canal principal, situa-se entre 5 e 15 metros de altitude. A foz encontra-se numa região estuarina sob influência das marés, onde se encontram remanescentes de manguezais (IPPUJ, 2011).

O processo de ocupação da cidade se deu ao longo do rio Cachoeira e seus afluentes, e hoje comporta 49% da população do município e uma intensa atividade industrial, principalmente têxtil e metalúrgica (IPPUJ, 2011).

Áreas naturais contaminadas com metais pesados podem ser ambientes propícios para o desenvolvimento de espécies de microrganismos capazes de resistir à pressão seletiva exercida pelos níveis constantes desses contaminantes. Assim, o isolamento de microrganismos resistentes à Cr(VI) de áreas do Rio Cachoeira pode representar uma boa alternativa para a seleção de microrganismos capazes de reduzir este metal a uma forma que não seja tão prejudicial para o



ambiente e para a própria saúde humana. Assim Optou-se por coletar amostra de água em um ponto da região norte da cidade por ser a região de localização do distrito industrial de Joinville e pelas áreas centrais terem um alto nível de poluição e oxigênio dissolvido muito próximo de zero e a região leste sofrer forte influência das marés, com variação de salinidade.

METODOLOGIA

As amostras de água e sedimentos foram obtidas em pontos da área urbana central do Rio Cachoeira, no município de Joinville/SC. Para o isolamento dos microrganismos foi utilizada a técnica de isolamento direto, onde uma amostra de água e sedimento foi agitada por alguns minutos, seguido de repouso para decantação dos sólidos em suspensão. Na sequência, um volume de 1 mL da fase líquida foi semeada em ágar nutritivo (peptona bacteriológica 5g/l, extrato de carne 3 g/l e ágar 15 g/l), suplementado com 500 mg/l de Cr(VI), adicionado na forma de solução de $K_2Cr_2O_7$. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 horas.

Após este período as colônias crescidas foram transferidas para uma novas placas contendo meio nutriente suplementado com 750 e 1000 mg/l de Cr(VI), seguido de incubação nas mesmas condições descritas. Após o isolamento descrito, as colônias selecionadas foram armazenadas em tubos inclinados contendo ágar nutritivo suplementado com 500 mg/L de Cr(VI) em temperatura ambiente. Alternativamente, a colônia foi estocada em glicerol 50% (v/v) a -15 °C.

Caracterização da bactéria isolada

A caracterização dos microrganismos isolados foi realizada por meio de coloração de Gram, da produção de catalase e da capacidade de crescimento na presença e ausência de oxigênio.

Para determinação da resistência a antibióticos, um volume de 2 ml de cultura bacteriana foi semeado uniformemente em placa contendo o meio Ágar Müller Hinton e os discos de antibióticos (ampicilina, tetraciclina, gentamicina, estreptomicina, neomicina e penicilina) posicionados em pontos equidistantes da placa. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

Curva de Crescimento

Foi preparado um pré-inóculo da bactéria isolada em meio nutriente líquido suplementado com 250 mg/l de Cr(VI). Na sequência foram preparados inóculos em



meio nutriente líquido com uma densidade óptica inicial (660 nm) de 0,01. Os inóculos foram incubados nas seguintes condições: i) sem agitação em estufa; ii) sem agitação e em anaerobiose em estufa; iii) com agitação em agitador rotatório, todos incubados a uma temperatura de 30°C. Para as condições anaeróbicas, os inóculos foram mantidos em jarros de anaerobiose após o esgotamento de todo oxigênio interno do jarro.

Foram tomadas amostras a cada quatro horas por 48 horas e a densidade óptica determinada em comprimento de onda de 660 nm.

Técnica de Microgotas para Contagem de Células Viáveis

Para a execução da técnica, primeiramente foi preparada uma suspensão bacteriana em meio nutriente líquido suplementado com Cr(VI) 250 mg/l. Na sequência a suspensão bacteriana foi diluída em solução salina (NaCl 0,85% (p/v) contendo Tween 0,4% (v/v)): 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} .

Para a inoculação das suspensões bacterianas diluídas, foram preparadas placas contendo meio nutriente sólido contendo Cr(VI) 150, 250, 350, 450, 550, 650, 750 e 850 mg/l e microgotas (10 µL) referentes a cada diluição foram depositadas sobre o meio e submetidas a movimentos circulares suaves. Após a secagem completa das microgotas as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas.

As microgotas foram examinadas em binocular esterestocópica ou no menor aumento do microscópio óptico, onde foi possível observar pequenas colônias e efetuar a contagem.

Teste da Influência do Oxigênio para o Crescimento na Presença de Cr(VI)

Foram inoculadas microgotas (10 µL) de suspensão bacteriana (sem diluição), crescida como descrito no item anterior, em placas contendo meio nutriente sólido suplementado com Cr(VI) 150 - 850 mg/l. As placas foram então incubadas em estufa a 30°C diretamente ou em jarro de anaerobiose. Após 24 horas de incubação as microgotas foram avaliadas visualmente quanto ao crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Isolamento de Microrganismos Resistentes a Cr(VI)

A amostra de água/sedimento coletada foi homogeneizada, decantada e semeada em meio nutriente contendo 500 mg/l de Cr(VI). Após este período foram



selecionadas 36 colônias que foram transferidas para novas placas contendo 750 e 1000 mg/l de Cr(VI), resultando no crescimento de apenas uma colônia na concentração de 750 mg/l, a qual foi utilizada nos demais experimentos.

Caracterização da Bactéria Isolada

A bactéria isolada foi caracterizada como um estreptococo Gram negativo, catalase-positivo e resistente apenas à penicilina.

Curva de Crescimento

O crescimento da bactéria isolada foi avaliado na presença de oxigênio (agitação a 150 rpm), em condições de baixas pressões de oxigênio (sem agitação) e em condições anaeróbicas (jarro de anaerobiose).

A análise do perfil de crescimento revelou que em condições aeróbicas e microaeróbicas a fase estacionária é atingida aproximadamente em 24 horas de crescimento, porém em condições aeróbicas foi atingida uma massa celular aproximadamente 40% maior. Quando cultivada em condições anaeróbicas, a cultura não atingiu a fase estacionária durante o tempo de experimentação. Com relação a massa celular, em 48 horas de cultivo a massa celular foi a mesma para as condições microaeróbica e anaeróbica.

Teste da Microgota

No teste da microgota foram observadas colônias nas concentrações de 150 e 250 mg/l após 24 horas de incubação. Nas demais concentrações não foi observado o desenvolvimento de colônias mesmo em tempos superiores de incubação. Também foi observado que na presença de oxigênio houve crescimento aparente até a concentração de 450 mg/l de Cr(VI), enquanto que na ausência de oxigênio foi observado crescimento até 350 mg/l.

Os resultados mostraram que a bactéria isolada foi capaz de crescer em diferentes condições de aeração, porém na presença de oxigênio a capacidade de resistir a presença de Cr(VI) foi maior.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria isolada do rio Cachoeira – Joinville/SC foi caracterizada como sendo um estreptococo Gram negativo, catalase-positivo e resistente a penicilina. Em testes de crescimento o isolado foi capaz de crescer até uma concentração





máxima de 450 mg/l. A bactéria também foi capaz de crescer na presença e na ausência de oxigênio, sendo que o crescimento e a capacidade de tolerar o Cr(VI) são maiores em condições aeróbicas.

Ensaio adicionais como o sequenciamento do gene que codifica para o rRNA 16S e provas bioquímicas são necessários para caracterizar a espécie bacteriana isolada.

REFERÊNCIAS

BISPO, M. S. et al. Estudo prospectivo da casca de maracujá aplicada como meio filtrante no tratamento de água produzida. **Blucher Chemical Engineering Proceedings** [S.l.] v. 2, nº 1, p. 1206-1210, 2015.

CONCEIÇÃO, Daniele, et al. **Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo.** *Ciência Rural*, 2007, 37.6.

DHAL, B., et al. **Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review.** *Journal of hazardous materials*, 2013, 250: 272-291.

HUSSEIN, H.; FARAG, S.; MOAWAD, H. **Isolation and characterization of Pseudomonas resistant to heavy metals contaminants.** *Arab journal of Biotechnology*, 2003, 7: 13-22.

RAICEVIC, Raicevi, et al. **Isolation of chromium resistant bacteria from a former bauxite mine area and their capacity for Cr (VI) reduction.** *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9.40: 6727-6731.

SOUZA, T. C. et al. Avaliação do uso de biomassa como adsorvente para a separação de contaminantes orgânicos em efluentes líquidos. In: **Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.** 2005. p. 1-6.

DA SILVA DALONSO, Yoná; Lourenço, júlia Maria Brandão Barbosa. **A influência dos planos territoriais no desenvolvimento turístico: o caso do plano diretor de Joinville.** *Tourism & management studies*, 2011, 2: 1159-1161.