

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

**BIORREMEDIAÇÃO POR ESCHERICHIA COLI COMO ALTERNATIVA DE  
REDUÇÃO DO CROMO HEXAVALENTE<sup>1</sup>  
BIOREMEDIATION BY ESCHERICHIA COLI AS AN ALTERNATIVE FOR  
REDUCTION OF HEXAVALENT CHROMIUM**

**Adriano Bittencourt Da Silva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado

<sup>2</sup> Egresso do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UNIJUI

**Resumo**

Com o progresso industrial e o surgimento de inúmeros bens de consumo, as atividades da indústria passaram a ser indispensáveis dentro da sociedade contemporânea, trazendo como consequência o fenômeno de impacto ambiental através da poluição do meio ambiente. O cromo é um metal utilizado em atividades industriais sob a forma de cromo hexavalente (Cr+6), gerando resíduos tóxicos e mutagênicos nocivos, que além de agredirem o meio ambiente, oferecem risco à saúde humana. Este trabalho aborda a biorremediação do cromo hexavalente utilizando bactérias do gênero *Escherichia* em duas amostras de diferentes níveis de concentração de cromo, acondicionadas em temperatura ambiente e temperatura controlada em incubadora, observadas em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas. Foi verificada a ação bacteriana, onde as reduções percentuais variaram de 18 a 70%, demonstrando a capacidade de reação da bactéria com o cromo em meio aquoso, com a ação de redução do estado de oxidação deste metal. As amostras com o menor nível de concentração de Cr+6 e maior concentração de bactérias, foram as que apresentaram percentual maior de redução no período de observação proposto. Os experimentos demonstraram êxito na redução do cromo hexavalente em todas as amostras analisadas, nas diferentes concentrações, num espaço de tempo não superior à 72h.

**Palavras-chave:** Cromo hexavalente; resíduos tóxicos; impacto ambiental; biorremediação; *Escherichia*.

**Abstract**

With industrial progress and the emergence of countless consumer goods, industry activities became indispensable within contemporary society, bringing as a consequence the phenomenon of environmental impact through pollution of the environment. Chromium is a metal used in industrial activities in the form of hexavalent chromium (Cr + 6), generating harmful toxic and mutagenic waste, which in addition to attacking the environment, pose a risk to human health This work deals with the bioremediation of hexavalent chromium using *Escherichia* bacteria in two samples of different concentration levels of chromium, conditioned at room temperature and temperature controlled in incubator, observed at time intervals of 24, 48 and 72 hours. It was verified the bacterial action, where the percentage reductions varied from 18 to 70%,

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

demonstrating the reaction capacity of the bacterium with the chromium in aqueous medium, with the action of reducing the oxidation state of this metal. The samples with the lowest concentration of Cr + 6 and higher concentration of bacteria were the ones with the highest reduction percentage in the proposed observation period. The experiments were successful in reducing hexavalent chromium in all samples analyzed at different concentrations in a time interval of no more than 72 hours.

**Keywords:** Hexavalent chromium; Toxic waste; environmental impact; Bioremediation; Escherichia.

### Introdução

Com o progresso industrial e o surgimento de inúmeros bens de consumo, as atividades industriais passaram a ser indispensáveis dentro da sociedade contemporânea, trazendo como consequência o fenômeno de impacto ambiental através da poluição do meio ambiente, seja através do acúmulo de matéria prima e insumos, causando situação de riscos de contaminação no transporte e disposição inadequada destes, ou ineficiência dos processos de reconversão os quais originam resíduos. Mesmo que exista uma preocupação universal de evitar a contaminação através destes resíduos, ela continua ocorrendo através de décadas com a produção de rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao meio ambiente (FREIRE et al., 2000).

Além das indústrias, as universidades e centros de pesquisa também geram resíduos, que, embora em pequenas quantidades, podem causar problemas devido à diversidade com que são gerados (GIOVANNINI et al., 2008).

O cromo é um metal acinzentado muito resistente à corrosão. O cromo possui diferentes estados de oxidação: A forma trivalente (III) e hexavalente (VI) são mais estáveis e aparecem na forma de óxidos, sulfatos, cromatos e dicromatos. A forma metálica não é encontrada livre na natureza, mas obtida após o processamento industrial do minério de cromo. A forma trivalente do metal é um nutriente essencial para o ser humano, atuando na manutenção do metabolismo da glicose, lipídios e proteínas, e a deficiência do cátion acarreta prejuízo na ação da insulina (CETESB, 2016).

O cromo é usado na fabricação de ligas metálicas e estruturas da construção civil, pois confere resistência à oxidação, ao desgaste e ao atrito. Os compostos de cromo possuem diversos usos industriais, como tratamento de couro (curtume), fabricação de tintas e pigmentos e preservante de madeira e galvanoplastia. A toxicidade do cromo depende de seu estado de oxidação, sendo o cromo (VI) mais tóxico que o cromo (III). O cromo oriundo dos efluentes que são lançados nos rios pode atingir os oceanos e depositar nos sedimentos (CETESB, 2012).

A presença de certos íons metálicos dos efluentes finais das indústrias de mineração, metalurgia, eletrônica, galvanoplastia e acabamento de metais, são extremamente indesejáveis e são prejudiciais para o organismo, pois podem se acumular em níveis tóxicos e causar danos

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

ecológicos (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

No Brasil, existem na legislação ambiental, A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e condições e padrões de lançamento de efluentes, complementada e alterada pela Resolução CONAMA 430/2011; A Resolução CONAMA nº 452/2012, que versa sobre os procedimentos de controle da importação de resíduos; A Resolução CONAMA 420/2013, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas, esta última, alterada pela Resolução CONAMA nº 460/2013. O limite da concentração máxima permitida para o lançamento de qualquer fonte poluidora que contenha o cromo é de  $0,1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cr (VI)}$  e  $1,0 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cr (III)}$  (CONAMA,2011).

No Estado do Rio Grande do Sul, existe a Resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente - CONSEMA, nº128/2006, que dispõe sobre a fixação de padrões de emissão de efluentes líquidos, para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul, e em seu artigo 10 determina valores máximos permitidos para cromo hexavalente  $0,1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cr (VI)}$  e Cromo Total  $0,5 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cr}$  (CONSEMA,2006).

A população geral pode estar exposta ao cromo por alimentação ou contato com produtos fabricados com o metal, a ingestão diária por alimentos varia de país para país, ficando entre 50 e 200  $\mu\text{g}/\text{dia}$  (CETESB, 2016).

A exposição ocupacional ocorre principalmente em atividades de mineração, soldagem, galvanização e fabricação de cimento. Podem causar dermatites de contato, ulcerações crônicas na pele e perfurações no septo nasal. A ingestão acidental de altas doses pode causar falência renal aguda caracterizada por perda de proteínas e sangue na urina. (HSDB, 2017).

Biorremediação é o processo tecnológico que se utiliza de bactérias do próprio ambiente, bem como de culturas geneticamente modificadas para um uso específico na descontaminação, assimilação e remoção de poluentes tóxicos do ambiente terrestre e aquático, com grande importância ambiental, econômica e social (CARNEIRO E GARIGLIO, 2010). Em geral, a biorremediação se apresenta como alternativa de grande interesse, os métodos biotecnológicos para biorredução são menos onerosos que as tecnologias convencionais (SCHENBERG, 2010).

As estratégias de biorremediação incluem a utilização de bactérias autóctones, ou seja, do próprio local (PEREIRA et al., 2012).

A remoção do cromo hexavalente, foi verificada em ensaios com cepas de Escherichia coli, onde estas foram desenvolvidas em diferentes substratos de areia e plástico, evidenciando a tolerância e adaptação desta bactéria para concentrações de até  $200 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cr}+6$ , e o desenvolvimento de mecanismos na biorredução do metal pesado (PANIGATTI et al, 2011).

As bactérias anaeróbias facultativas são menos abundantes que as anaeróbias obrigatórias, porém, são mais fáceis de serem isoladas e estudadas em laboratório (BURTON et al., 2005).

A Escherichia coli é uma bactéria anaeróbia facultativa que é eliminada no ambiente em grandes

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

quantidades pelas fezes do homem e animais de sangue quente, se multiplica com relativa facilidade em águas poluídas, sendo de fácil identificação laboratorial através de métodos simples que permitem uma quantificação rápida (SILVA et al., 2005).

Considerando a perspectiva do impacto ambiental produzido pelo cromo gerado na atividade antropogênica, a produção de resíduos eliminados no ambiente em elevadas concentrações nocivas para os seres vivos e o fato de existirem poucos estudos específicos sobre este metal nos processos de biorremediação, este trabalho busca avaliar o efeito da biorremediação através de bactérias do gênero *Escherichia* cultivadas em soluções aquosas com diferentes concentrações de cromo hexavalente, para demonstrar a capacidade desta bactéria em efetuar a redução deste metal.

#### Metodologia

##### Ensaio microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Central Analítica da Unijuí - Laboratório de Análises Ambientais da Unijuí, campus Ijuí/RS.

Para a avaliação do processo de biorredução foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* obtida através do Laboratório de Microbiologia Veterinária da Unijuí (LAMIVET), campus Ijuí/RS.

Esta cepa foi isolada a partir de uma amostra de leite bovino, e submetida a uma semeadura em meio Ágar Nutriente para desenvolvimento inicial de colônias típicas, que posteriormente foram submetidas aos testes de confirmação bioquímica que identificaram o isolado como de *Escherichia coli*.

Prevendo uma eventual necessidade de utilização de novas cepas em mais de um experimento neste trabalho, desta cepa original isolada, foram retirados inóculos e cultivados em meio de cultura Ágar Nutriente em estufa de incubação a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  para produção de novas cepas, que uma vez desenvolvidas, foram armazenadas e conservadas em geladeira.

##### Preparo da suspensão bacteriana para utilização no experimento

Foram preparadas duas suspensões bacterianas para cada grupo de amostras, em uma solução com água destilada esterilizada com pH 6,8 e determinada a estimativa populacional das bactérias através da técnica de tubos múltiplos (APHA,1995).

##### Preparo da solução padrão de cromo

Inicialmente, foi preparada uma solução padrão de cromo utilizando-se uma massa de 2,000 g de Dicromato de Potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) previamente seca em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por 24h, a pesagem foi efetuada em balança eletrônica marca Shimadzu ATY 224. Esta solução foi avolumada a 1L com água bideionizada em balão volumétrico, armazenada e conservada sob refrigeração.

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

#### Quantificação do íon cromo

As determinações de cromo hexavalente foram realizadas através do método da difenilcarbazida conforme o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22th edition (APHA, 2012), por espectroscopia de absorção molecular, medidas em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 540 nm, com aparelho modelo Shimadzu UV-1800 onde as curvas analíticas e concentrações das amostras foram lidas e arquivadas no programa UV-PROBE®.

As curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição da solução padrão de cromo.

Foram preparadas oito soluções analíticas em cada nível de concentração, sendo a curva analítica média construída através do programa Excel, plotando-se os valores médios das absorbâncias (ordenadas) em função das concentrações (abscissas), obtendo-se a equação de regressão linear.

#### Preparo das amostras

A primeira amostra, denominada 0401, foi preparada em oito balões volumétricos de 100 mL. Nestes balões foram adicionados solução padrão de cromo (Cr+6) em concentrações de 20, 50, 100 e 200 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente, e acrescentados 10 mL de suspensão bacteriana com concentração de  $1,6 \cdot 10^6$  NMP/100 mL, completando-se o volume final a 100 mL com água destilada esterilizada e os balões tampados com algodão. Quatro destes balões foram incubados a 35°C  $\pm$  0,5°C em estufa de incubação microbiológica e os quatro restantes, acondicionados em temperatura ambiente, em mesa agitadora marca Tecnal® a 90Hz

O preparo das soluções com Cr+6 e bactérias da segunda amostra, denominada amostra 0801, foi efetuado seguindo-se os mesmos procedimentos, porém com as concentrações bacterianas de  $1,6 \cdot 10^8$  NMP 100 mL, e o nível de concentração inicial foi reduzido para 5, 10, 20 e 50 mgL<sup>-1</sup>Cr+6, respectivamente.

A redução do Cr+6 nos dois experimentos (amostras 0401 e 0801) foi observada em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

#### Resultados

A suspensão bacteriana da amostra 0401 continha concentração de  $1,6 \cdot 10^6$  /100 mL de número mais provável de bactérias (NMP), e a suspensão bacteriana da amostra 0801 continha concentração (C\*) de  $1,6 \cdot 10^8$  /100 mL de número mais provável de bactérias (NMP).

As leituras das absorbâncias de cada uma das amostras foram utilizadas na equação da curva analítica média e serviram para fornecer as concentrações registradas nos intervalos de tempo. Nesta curva média, obteve-se as respectivas concentrações de 0,05mgL<sup>-1</sup>; 0,1mgL<sup>-1</sup>; 0,2mgL<sup>-1</sup>; 0,3mgL<sup>-1</sup>; 0,4mgL<sup>-1</sup> e 0,5mgL<sup>-1</sup>.

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

Resultado obtido nas soluções da amostra 0401, que foram acondicionadas em temperatura ambiente sob agitação.

Comportamento observado na amostra 0401 Ambiente

Temperatura	C* Inicial	24h	48h	72h
		(mgL <sup>-1</sup> / % Redução)		
Ambiente	20 mgL-1	16,40 / 18,0	13,70 / 31,5	3,40 / 33,0
Ambiente	50 mgL-1	21,05 / 57,0	22,50 / 55,0	22,90 / 54,2
Ambiente	100 mgL-1	46,40 / 53,6	49,60 / 50,4	50,60 / 49,4
Ambiente	200 mgL-1	101,30 / 49,4	93,3 / 53,4	90,2 / 54,9

A média das temperaturas máximas e mínimas do ambiente, registradas durante o experimento com esta amostra foi de 28°C e 30°C, respectivamente.

Resultados das soluções da amostra 0401 acondicionadas em estufa de incubação microbiológica, com temperatura controlada de 35,0 ± 0,5 °C.

Comportamento observado na amostra 0401 Incubada

Temperatura	C*Inicial	24h	48h	72h
		(mgL <sup>-1</sup> / % Redução)		
35 ±0,5 °C	20 mgL-1	12,70 / 36,5	13,90 / 30,5	14,00 / 30,0
36 ±0,5 °C	50 mgL-1	23,00 / 54,0	22,50 / 55,0	22,70 / 54,6
37 ±0,5 °C	100 mgL-1	68,70 / 31,3	48,50 / 51,5	51,40 / 48,6
38 ±0,5 °C	200 mgL-1	100,20 / 49,9	96,50 / 51,8	97,00 / 51,5

Resultado obtido nas soluções da amostra 0801, que foram acondicionadas em temperatura ambiente sob agitação.

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

Comportamento observado na amostra 0801 Ambiente

Temperatura	C* Inicial	24h	48h	72h
		(mgL <sup>-1</sup> / % Redução)		
Ambiente	5 mgL-1	1,90 / 62,0	2,00 / 60,0	2,10 / 58,0
Ambiente	10 mgL-1	4,00 / 60,0	3,50 / 65,0	3,50 / 65,0
Ambiente	20 mgL-1	6,40 / 68,0	6,90 / 65,5	6,30 / 68,5
Ambiente	50 mgL-1	15,10 / 69,8	16,10 / 67,8	16,50 / 67,0

A média das temperaturas máximas e mínimas do ambiente, registradas durante o experimento com esta amostra foi de 29°C e 30°C, respectivamente.

Resultados das soluções da amostra 0801 acondicionadas em estufa de incubação microbiológica, com temperatura controlada de 35,0 ± 0,5 °C.

Comportamento observado na amostra 0801 Incubada

Temperatura	C* Inicial	24h	48h	72h
		(mgL <sup>-1</sup> / % Redução)		
35 ± 0,5 °C	5 mgL-1	2,30 / 54,0	2,20 / 56,0	2,30 / 54,0
36 ± 0,5 °C	10 mgL-1	3,70 / 63,0	3,70 / 63,0	3,90 / 68,2
37 ± 0,5 °C	20 mgL-1	6,00 / 70,0	5,80 / 71,0	6,00 / 70,0
38 ± 0,5 °C	50 mgL-1	16,00 / 68,0	16,80 / 66,4	15,90 / 68,2

Discussão

No experimento deste trabalho com as amostras 0401 e 0801 se utilizou como substrato o meio aquoso, submetendo a *Escherichia coli* de uma suspensão bacteriana inicial, a diferentes níveis de concentração de cromo (VI).

Observando o comportamento das bactérias inseridas neste estudo de biorremediação em relação ao Cr+6, constataram-se reduções percentuais que variaram de 18 a 70%, demonstrando a sua

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

capacidade de reagir com este metal e reduzir sua forma oxidativa para outra conformação que possibilite sua assimilação no meio ambiente de maneira efetiva.

Os ambientes líquidos com população bacteriana, cuja água apresente elementos dissolvidos com possibilidade de serem deletérios, são passíveis de ocasionar limitação de crescimento. Logo, as alterações no metabolismo enzimático seriam uma forma de compensar o gasto energético, obrigando o organismo a utilizar uma via degradativa para obter energia, com o uso do metal de cromo presente (BIZANI et al, 2016).

As soluções da amostra 0401 (primeiro grupo de experimentação), apresentaram uma redução percentual entre 18 a 36,5 % para a concentração inicial de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Cr+6, e apresentaram percentual entre 31,3 a 69,8% de redução nas concentrações mais elevadas (50, 100 e  $200 \text{ mgL}^{-1}$  de Cr+6).

Este comportamento foi evidenciado em ambos os sistemas de acondicionamento (Ambiente e Incubado), no intervalo de tempo de 24, 48 e 72 horas.

Nas soluções da amostra 0801 (segundo grupo de experimentação) registra-se uma redução maior que a do experimento anterior, nos três intervalos de tempo estudados de 24, 48 e 72 horas, pois evidencia a predominância de um aumento percentual de redução que variou entre 54 a 71%, para todos os níveis de concentração aplicados.

Nos estudos de Panigatti et al (2011) foi registrada uma redução total de Cr+6 num período de três dias na amostra que continha  $20 \text{ mgL}^{-1}$  acondicionada em substrato arenoso, sob agitação constante, aeração mecânica contínua, e em temperatura ambiente. Estes autores, também verificaram reduções de 92,6%, 49,8% e 30%, nas amostras com 50, 100 e  $200 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente, num período de cinco dias. E ao utilizarem substrato plástico nas amostras contendo 30 e  $50 \text{ mgL}^{-1}$ , obtiveram reduções de 78% e 47%, respectivamente em seis dias.

#### Considerações Finais

As amostras com o menor nível de concentração de Cr+6 e maior concentração de bactérias, foram as que apresentaram percentual maior de redução tanto em temperatura controlada, como também na temperatura ambiente, no período de observação proposto.

Pode se afirmar que para ambos os sistemas de temperatura (Ambiente e Incubada), o percentual de redução foi aproximado, não registrando diferenças significativas entre as amostras 0401 e 0801.

Verificou-se que as concentrações entre 5 a  $200 \text{ mgL}^{-1}$  de cromo hexavalente neste meio a que as bactérias foram submetidas, mostraram um padrão crescente de redução no intervalo de tempo proposto para estudo.

Nestas condições, os experimentos demonstraram a efetiva ação biorredutora da bactéria *Escherichia coli*.

Obteve-se êxito na redução do cromo hexavalente em todas as amostras analisadas, nas diferentes concentrações, e num espaço de tempo não superior à 72h.

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** XXIII Jornada de Pesquisa

#### Referências bibliográficas

- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater: part 9000: microbiological examination. 19th ed. Washington, 1995. p. 9-51.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater: part 3500: Chromium. 22th ed. Washington, 2012. p. 65-68.
- BIZANI, Delmar; Spagiari M. S.; Avaliação da cinética de comportamento e capacidade de redução de cromo por linhagens bacterianas padrão. *Ciência e Natura, Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria* v.38 n.2, 2016, Mai.- Ago. p. 648 - 655.
- BRASIL. ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Secretaria do Meio Ambiente, Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA), Resolução nº 128, de 07 de Dezembro de 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 430, de 13 de Maio de 2011. Complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).
- BRASIL. Ministério do meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 452, de 02 de Julho de 2012.
- BURTON, Gwendolyn R. W.; Paul G. Engelkirk; *Microbiologia para as ciências da saúde*, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2005.
- CARNEIRO, Danielle de A; GARIGLIO, Lucas P.; A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Revista Tecer. Belo Horizonte*, vol.3, nº4, p.82-92, 2010.
- CETESB, Ficha de Identificação toxicológica, Cromo e seus compostos. Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental, São Paulo (Janeiro), 2012, atualização 2016.
- FREIRE, R. S. ..et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, São Paulo, v.23, n.4, p.504-511, 2000.
- GIOVANNINI, J. G. ..et al. Avaliação das técnicas de precipitação química e encapsulamento no tratamento e destinação conjunta de resíduos líquidos contendo cromo e vidrarias de laboratório. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p.676-679, 2008.