

Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo

Reduction of hexavalent chromium by isolated bacteria of contaminated soils with chromium

Daniele Conceição^I Rodrigo Jacques^{III} Fatima Bento^{II} Amauri Simonetti^{II}
Pedro Selbach^{III} Flavio Camargo^{III}

RESUMO

A redução do Cr(VI) para Cr(III) diminui a toxicidade deste metal no ambiente, uma vez que o Cr(III) é insolúvel às membranas biológicas. Assim, a redução microbiana do Cr(VI) é uma alternativa para reduzir os impactos ambientais causados por este metal, utilizado em diversos processos industriais. O objetivo deste trabalho foi selecionar microrganismos a partir de solo contaminado com cromo e caracterizar sua capacidade de redução do Cr(VI) durante o crescimento celular. A atividade de redução do Cr(VI) pelos isolados foi quantificada com o reagente de *s*-difênilcarbazida. No isolamento, foram obtidas 20 bactérias resistentes a cromo(VI); seis destas foram capazes de reduzir acima de 100mg L⁻¹ Cr(VI) em 24 horas. As bactérias selecionadas foram eficientes na redução do Cr(VI) e apresentam potencial para outros estudos, visando à aplicação em processos de biorremediação.

Palavras-chave: biorremediação, cromo hexavalente, bactérias resistentes a cromo.

ABSTRACT

The reduction of Cr(VI) to Cr(III) decrease the toxic effect of this metal in the environment, because Cr(III) is insoluble to the biological membranes. The microbial reduction of Cr(VI) it is an alternative to reduce the environmental impacts caused by this metal used in several industrial processes. The objective of this research was to select microorganisms from chromium contaminated soil and to characterize their ability to reduce Cr(VI). The activity of reduction of Cr(VI) for the isolated was quantified with *s*-diphenylcarbazine. A group of 20 chromium resistant bacteria were isolated; six of these were able to reduce 100mg L⁻¹ Cr(VI) in 24 hours. The isolated bacteria, from contaminated soil can remediate chromate and presented potential for other studies seeking their application in bioremediation processes.

Key words: bioremediation, hexavalente chromium, chromium-resistant bacteria.

INTRODUÇÃO

O estágio atual de desenvolvimento da sociedade tem contribuído grandemente para a geração de resíduos agrícolas e industriais com grande potencial de contaminação de ambientes, como o solo e a água (TEDESCO et al., 1995). É necessário o desenvolvimento de tecnologias para a remediação destes ambientes, em que a biorremediação, utilizando microrganismos nativos ou modificados geneticamente, pode ser uma alternativa eficiente e ao mesmo tempo de baixo custo.

No Rio Grande do Sul, destaca-se a poluição causada pelos resíduos da indústria coureiro-calçadista. No curtimento de peles ocorre a geração de lodos nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) com elevado potencial poluidor, principalmente de cromo, que é o mais utilizado no processamento. O cromo na forma hexavalente é um potente agente mutagênico e pode causar carcinomas, entre outras patologias (CHIRWA & WANG, 2000). Para a eliminação do cromo na forma oxidada, tem sido proposta a redução do Cr(VI) a Cr(III), pois o cromo na forma trivalente é mais estável e de baixa toxicidade (CODD et al., 2001). A redução do cromo nos sistemas de tratamento convencionais tem sido realizada através de processos

^ICurso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: daniele.conceicao@gmail.com.

^{II}Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{III}Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

químicos e físico-químicos de elevado custo de implantação e de baixa eficiência no ambiente. Atualmente, para a remediação de ambientes contaminados com Cr(VI), tem sido proposta a utilização de microrganismos (CERVANTES et al., 2001). Destaca-se entre os produtos a adição de enzimas redutoras de cromato, produzidas a partir de microrganismos nativos do solo ou melhorados geneticamente (DICK & TABATABAI, 1992). Alguns mecanismos de resistência têm sido propostos para microrganismos, como a sorção, o acúmulo, a precipitação, o efluxo e a redução de Cr(VI) a Cr(III) através de enzimas que transferem elétrons e reduzem o metal. Entre estes mecanismos, a redução parece ter grande potencial biotecnológico para a biorremediação (KEYHAN et al., 2003).

O presente trabalho tem como objetivo selecionar microrganismos resistentes ao cromo hexavalente, a partir de um solo agrícola com histórico de contaminação por este metal, e caracterizá-los quanto a sua capacidade de biorremediação do cromo(VI).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo foram retiradas em 12 pontos (na profundidade de 0 a 30cm) de uma área agrícola do município de Roca Sales-RS contaminada com cromo proveniente de descarte de lodo de curtume. As amostras foram analisadas quanto à concentração do cromo total, conforme metodologia descrita por TEDESCO et al. (1995). Para o isolamento, foram selecionadas amostras de solo com concentrações baixas, 344 e 355mg L⁻¹ (amostras 1 e 2), e altas, 466, 510 e 835mg L⁻¹ (amostras 3, 4 e 5) de cromo total.

Para a seleção de microrganismos resistentes, amostras de um grama de solo foram adicionadas a 200ml de caldo nutritivo com 500mg L⁻¹ de K₂Cr₂O₇ e incubadas por 24 horas, a 150rpm e a 30°C. Após este período, 200µL foram transferidos para outro erlenmeyer com o mesmo meio e incubado nas mesmas condições (sendo este processo repetido três vezes), sendo então retirados 100µL para o plaqueamento em ágar nutritivo contendo 500mg L⁻¹ de Cr(VI), realizando-se então o isolamento de colônias puras.

Os isolados obtidos foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em caldo nutritivo contendo K₂Cr₂O₇. As colônias puras foram inoculadas em frascos de erlenmeyer contendo 30ml de caldo nutritivo com 250 e 500mg L⁻¹ de Cr(VI) e incubadas por 24 horas, a 150rpm e 30°C, sendo o inóculo padronizado a uma absorbância de 0,3, em

espectrofotômetro a 600nm. Após incubação por 24 horas, a 150rpm e 30°C, foram determinadas a densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 600nm e a concentração final do Cr(VI) no caldo nutritivo, com o reagente de s-difenilcarbazida em espectrofotômetro a 540nm (GRANER, 1972).

Para avaliar o efeito do pH e da temperatura na redução do cromo e para a caracterização da atividade ótima para cada isolado, estes foram crescidos separadamente, padronizados como descrito e inoculados em caldo nutritivo contendo 50mg L⁻¹ de Cr(VI). O pH do meio foi ajustado para 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 e temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C. As determinações de DO e a concentração do Cr(VI) foram realizadas após 12 horas de incubação, a 150rpm e 30°C.

A atividade enzimática de redução do Cr(VI) foi determinada com o extrato celular dos isolados, através de sonicação das células em banho de gelo com três pulsos de 20 segundos, a 35W e centrifugadas a 10.000rpm, por 45 minutos, para a retirada de restos celulares. Em seguida, as células foram ressuspensas em 10mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0), sendo quantificada a concentração de proteína no sobrenadante, conforme descrito por BRADFORD (1976).

Para avaliar o efeito de diferentes íons na atividade da enzima redutora de cromo, preparou-se a reação de NADH (0,2mM), tampão fosfato (50mM, pH 7,0) com Cr(VI) (1mg L⁻¹) e o íon a ser testado. O volume final da reação foi de 1,5ml, sendo incubado a 30°C por 15 minutos. Após este período, a solução de s-difenilcarbazida era adicionada, procedendo-se à análise em espectrofotômetro 540nm. O teste foi realizado com a mesma concentração de proteína presente no extrato celular, para todos os isolados. Neste teste, os isolados foram comparados com o *Bacillus* sp. ES29, uma bactéria comprovadamente redutora de Cr(VI), isolada por CAMARGO et al. (2003). Como inibidores, foram testados íons, adicionados à mistura de reação na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês e sulfato de sódio, todos na concentração de 1mM.

Para a identificação de gênero dos isolados que mais eficientemente reduziram o Cr(VI) foram realizados os testes segundo MACFADDIN (1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cinco amostras de solo, foram isoladas 20 colônias de bactérias morfológicamente distintas. A técnica de enriquecimento mostrou-se eficiente para o isolamento de microrganismos resistentes a cromo, em

solos com histórico de contaminação. No presente trabalho, foi obtido um número significativo de bactérias resistentes a partir das amostras, tendo em vista que apenas 10% das bactérias presentes no solo são culturáveis (AMANN et al., 1994). Nas amostras com maior concentração de cromo total (CT), verificou-se um número maior de isolados, indicando que a presença de altas concentrações de cromo pode ter exercido pressão para selecionar os organismos resistentes a este metal que foi adicionado ao solo.

Para selecionar as bactérias mais eficientes na redução do Cr(VI), os 20 isolados foram crescidos em caldo LB com 250mg L⁻¹ de K₂Cr₂O₇ (Tabela 1). Entre os isolados, apenas três apresentaram redução do cromo abaixo de 10% do inicial, onze isolados apresentaram redução acima de 15% e seis reduziram acima de 50% do Cr(VI), ou seja, reduziram acima de 125mg L⁻¹ em 24 horas. As maiores percentagens de redução do Cr(VI) foram as dos isolados que apresentaram DO elevada. As bactérias mais eficientes na redução (capazes de reduzir acima de 50% do cromo) foram os isolados 6, 11, 12, 16, 18 e 20. Este último isolado foi o mais eficiente na redução, transformando 64% do Cr(VI) a Cr(III) e foi obtido da amostra de solo com maior concentração de cromo total.

Entre os mecanismos de resistência a elevadas concentrações de cromo, pode-se citar o acúmulo intracelular, a baixa absorção e a produção de metalotioneína (BLINDAUER et al., 2001). Dessa forma,

observa-se que muitos microrganismos são resistentes a baixas concentrações de Cr(VI), porém há necessidade de avaliar o potencial de redução do metal em maiores concentrações, para a identificação dos microrganismos mais eficientes.

Os seis isolados mais eficientes foram testados para avaliar sua resistência à concentração de 500mg L⁻¹ de Cr(VI), assim como o tempo de redução (Figura 1). O crescimento celular não foi inibido pela presença de 500mg L⁻¹ de Cr(VI). A maior DO e redução foi novamente obtida com o isolado 20, seguido dos isolados 6 e 12, que também apresentaram grande atividade de redução do cromo nesta concentração. O mecanismo de redução enzimática do Cr(VI) a Cr(III) tem sido observado em bactérias, sendo associado à presença de enzimas cromato redutases (CAMARGO et al., 2003; DERMOU et al., 2005). Apenas três isolados (6, 12 e 20) foram capazes de crescer em caldo nutritivo contendo 750mg L⁻¹ de Cr(VI), sendo então esta concentração limitante para o crescimento dos outros isolados. O isolado 20 foi novamente o que apresentou maior capacidade de redução, porém ela foi de apenas 40% da concentração inicial (dados não apresentados).

De modo geral, os pH que favoreceram maior redução foram 7,0 e 8,0, sendo que, os isolados cresceram e reduziram o cromo na faixa de pH de 5,0 a 9,0, (Figura 2), demonstrando capacidade de adaptação, às variações ambientais. Para esta adaptação o microrganismo deve ser capaz de manter o pH

Tabela 1 - Redução do cromo pelas bactérias isoladas após 24 horas de crescimento em caldo contendo 250mg L⁻¹ de Cr(VI) (K₂CrO₇).

Isolados	Amostra de solo	Concentração restante de Cr(VI) (mg L ⁻¹)	Redução (%)	Densidade ótica (A _{600nm})
1	1	195,8	22	0,980
2	1	164,5	34	0,838
3	1	194,4	22	0,835
4	2	229,6	8	0,540
5	2	174,6	34	0,835
6	3	114,6	54	1,730
7	3	240,2	4	0,440
8	3	176,4	29	0,762
9	3	166,7	33	0,808
10	3	210,2	16	0,619
11	4	104,5	58	1,115
12	4	96,1	62	1,980
13	5	210,8	16	0,427
14	5	194,7	22	0,819
15	5	198,2	21	0,721
16	5	100,9	60	1,440
17	5	188,5	25	0,460
18	5	102,4	59	1,350
19	5	238,4	5	0,422
20	5	90,9	64	1,840
Sem inóculo	-	249,6	-	-

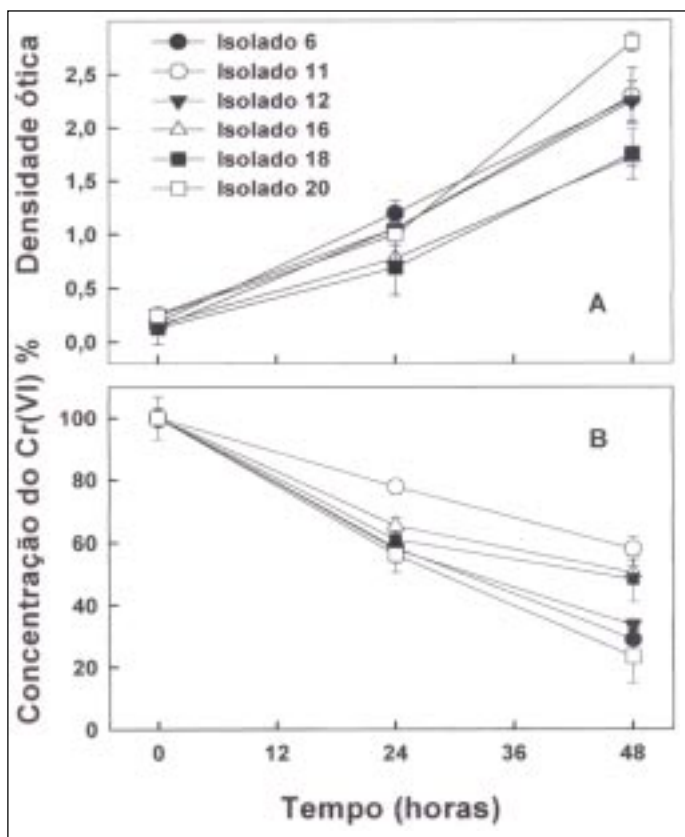


Figura 1 - Crescimento (A) e redução do Cr(VI) (B) pelos isolados em caldo nutritivo com 500mg L⁻¹ de Cr(VI) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

intracelular em torno de 7,5, não importando o pH do caldo de crescimento. Isto ocorre pela extrusão ou absorção de prótons pela célula microbiana. Foi observado, neste trabalho e no de CAMARGO et al. (2003), que, para a maioria dos isolados, o pH ótimo de crescimento está relacionado com o pH de maior redução do cromo. Isto talvez possa ser associado com o número de células responsáveis pela redução, ou que somente após a redução do Cr(VI) no pH ideal há diminuição da concentração deste metal, favorecendo o crescimento dos microrganismos. Outro fator a ser considerado é que se a redução é mediada por enzimas, podem ser altamente vulneráveis a fatores ambientais, sendo sua atividade inibida ou até destruída por calor excessivo ou variações no pH, sendo esta sensibilidade variável para cada enzima.

A capacidade de redução de 100% do Cr(VI) presente no caldo nutritivo pelo isolado 20 foi observada no pH de 5,0 a 9,0, sendo inibida sua atividade de redução apenas em pH 10,0 (Figura 2). A atividade ótima de redução do Cr(VI) deste isolado ocorreu em pH 7,0, 8,0 e 9,0 e nas temperaturas de 25 a 35°C (Figura 3), demonstrando grande adaptação a

esses dois fatores ambientais, o que o torna promissor para futuros estudos de biorremediação.

Para avaliar o efeito da temperatura no crescimento e na redução do Cr(VI), foram testadas variações de 25, 30, 35 e 40°C (Figura 3). Na temperatura de 35°C, houve inibição do crescimento de três isolados e esta inibição se estendeu para todos os isolados a 40°C. O isolado 20 apresentou maior DO em todas as temperaturas avaliadas. Em 30°C, foram obtidas as maiores DO para todos os isolados, porém não as melhores reduções.

Os isolados apresentaram características diferentes quanto à redução do Cr(VI) na presença de íons. Foi verificada a dependência de NADH, como doador de elétrons para a redução de Cr(VI) por todos os isolados. Segundo SUZUKI et al. (1992), o NADH atua como doador de elétrons para atividade enzimática, formando o intermediário Cr(V), que aceita mais dois elétrons de outras duas moléculas da mesma coenzima para formar Cr(III).

Na figura 4, são apresentados os efeitos causados na atividade enzimática dos isolados pela adição de cátion divalentes. A presença de sulfato de cobre estimulou a atividade de redução da maioria dos isolados, sendo esta 60% maior que o controle para o isolado 20. Este estímulo foi observado com adição de cloreto de cobre por CAMARGO et al. (2003) e KEYHAN et al. (2003), segundo os quais a atividade de redução do Cr(VI) pelo microrganismo avaliado foi estimulada pela adição de sulfato e cloreto de cobre. A atividade de redução do Cr(VI) pelos isolados 6 e 12 praticamente não foi estimulada pela presença de íons cobre. Este fato também foi observado por PARK et al. (2000), para quem a adição de 5 a 25mM deste íon não afetava atividade de redução do Cr(VI) pelos seus isolados. As maiores inibições ocorreram pelo mercúrio e magnésio (72%), seguidas por sódio e molibdênio.

A atividade do isolado 11 não foi estimulada pela presença de nenhum íon testado. Pelo contrário, sua atividade foi inibida pelos íons, sendo praticamente suprimida pelo Mn e Na. Por outro lado, este isolado apresentou baixa inibição da atividade na presença de Hg e Mg. Estes resultados confirmam a idéia da existência de diferentes tipos de enzimas com capacidade de redução do Cr(VI).

A atividade enzimática dos isolados 16 e 18 foi similar. Houve estímulo pela presença de cobre e inibição pelo mercúrio, sendo que, para o isolado 16, a

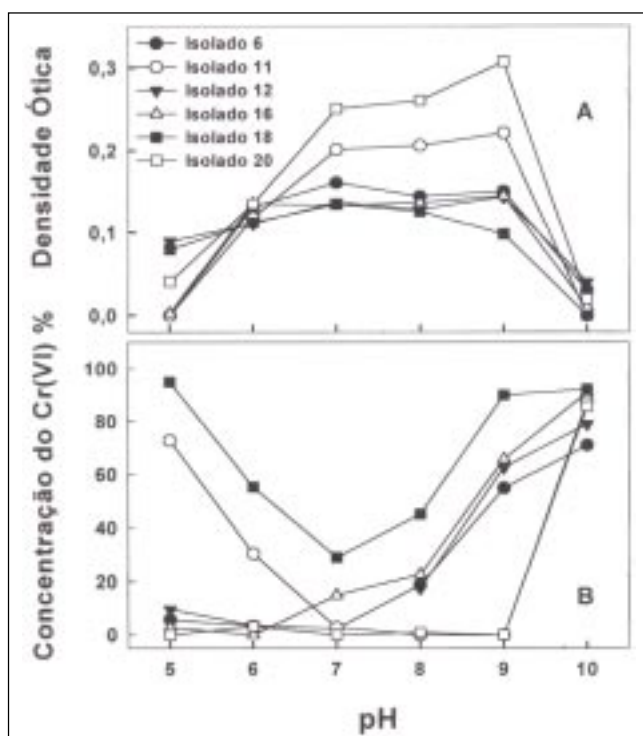


Figura 2 - Influência do pH no crescimento celular (A) e na redução do cromo(VI) (B) presente no caldo nutritivo (50mg L^{-1}) após 12 horas de incubação (dados são médias de duas repetições).

presença deste íon suprimiu a atividade enzimática. Porém, a inibição para o isolado 18 foi menor por Hg do que a causada pelo Mg. A forte inibição causada pelo Hg era esperada para todos os isolados por este íon ter forte atração por grupamentos SH, o que resulta na inativação da proteína (CLARKSON, 1997).

O isolado 20 apresenta grande capacidade de resistência e de redução do Cr(VI). Verifica-se que esta atividade foi levemente inibida pela presença da maioria dos íons; porém, a inibição por Mg e Mn foi maior que a observada para o *Bacillus* sp. ES29. Entre os isolados testados, o 20 foi o que apresentou maior atividade enzimática pela presença de Cu superando a do controle em quase 80%. O mecanismo pelo qual este íon estimula a ação enzimática ainda não é clara, porém o cobre é um metal de transição, que compõe o grupo prostético de muitas enzimas redutase. São propostas algumas formas de atuação deste metal, como proteção durante o transporte de elétrons, e, em alguns casos, transporte de elétrons entre subunidades da proteína (ABE et al., 2001).

A redução do cromo pelas células eucarióticas ocorre principalmente por ação de redutores não-enzimáticos como o ácido ascórbico.

As células procarióticas normalmente não produzem este ácido, sendo a glutatona seu principal redutor não-enzimático (STANDEVEN & WETTERHAHN, 1992). Porém, esta redução é ínfima se comparada à redução enzimática realizada por organismos resistentes. A enzima redutora de cromo é de grande importância para os organismos que a produzem, pois realiza a rápida redução do Cr(VI) a Cr(III), sendo este rapidamente eliminado para o meio externo, antes de interagir com as macromoléculas, como DNA e proteínas, o que poderia acarretar danos à célula.

O isolado 6 foi identificado como pertencente ao gênero *Aeromonas*. LOUKIDOU et al. (2004) testaram a retirada de Cr(VI) de um efluente utilizando um sistema de biorreator com *Aeromonas caviae* através da sorção deste metal às células bacterianas. O isolado 11 pertence ao gênero *Aureobacterium*, que também já foi relatado com resistência e atividade de redução do Cr(VI) por FRANCISCO et al. (2002), sendo por eles isolada uma *Aureobacterium esteroaromaticum* de lodo ativado, utilizado para tratamento de esgoto, contendo metais

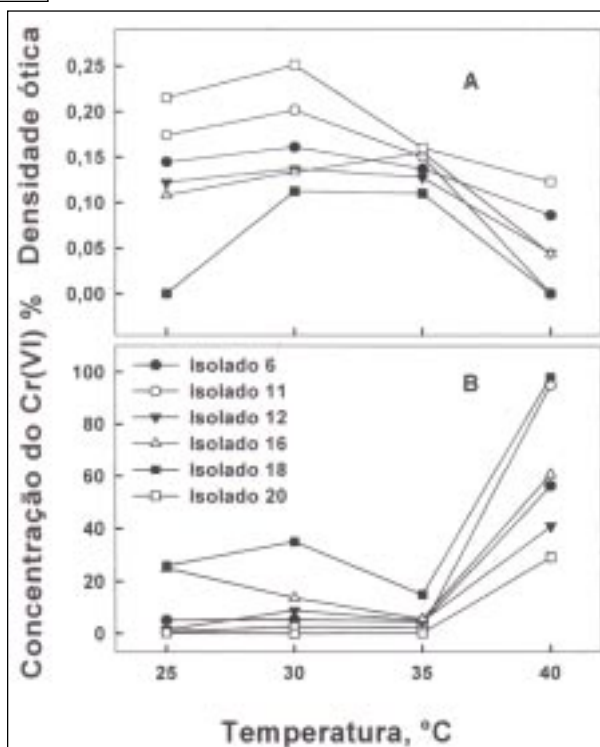
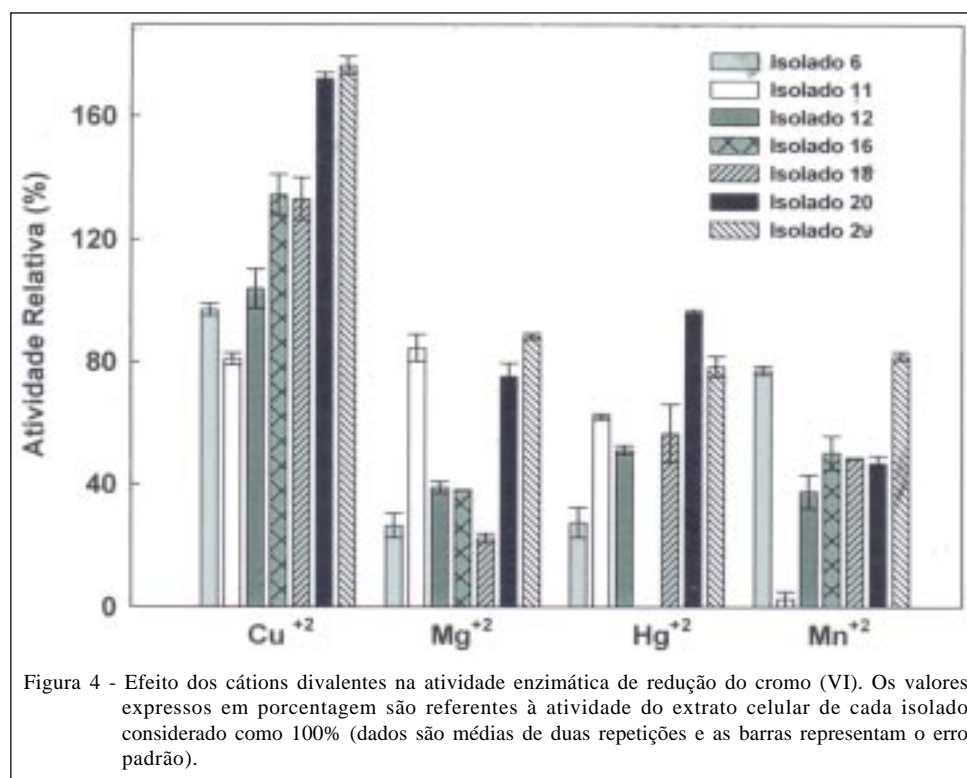


Figura 3 - Influência da temperatura no crescimento celular (A) e na redução do cromo(VI) (B) presente no caldo nutritivo (50mg L^{-1}) após 12 horas de incubação (dados são médias de duas repetições).



pesados. Não há relato na literatura de bactérias redutoras do cromo(VI) pertencentes ao gênero *Xanthobacter*, que refere-se ao isolado 12. Dois isolados, 16 e 18, são pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, este gênero é conhecido por apresentar alguns microrganismos patogênicos, causando infecções de raízes. O isolado 20, mais eficiente na redução do Cr(VI), foi identificado como pertencente ao gênero *Bacillus*. Muitos microrganismos deste gênero têm sido isolados com atividade de redução do cromo.

CONCLUSÕES

Entre as 20 bactérias obtidas, as que apresentam maior capacidade na redução do Cr(VI) foram os isolados 6, 11, 12, 16, 18 e 20. Todos estes isolados são capazes de crescer em caldo nutritivo com 500 mg L⁻¹ de Cr(VI), porém apenas os isolados 6, 12 e 20 são resistentes à concentração de 750mg L⁻¹ de Cr(VI). Com exceção dos isolados 11 e 18, os demais apresentaram capacidade de redução do Cr(VI) no caldo nutritivo com pH de 5,0 a 9,0 e temperatura de 25 a 35°C, demonstrando capacidade de adaptação às variações ambientais. Desta forma, esses organismos apresentam potencial para outros estudos, visando à aplicação em processos de biorremediação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. et al. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News*, Washington, v.60, p.360-365, 1994.
- ABE, F. et al. Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the induction of superoxide desmutase activity by Cu²⁺. *Biotechnology Letters*, London, v.25, n.23, p.2027-2034, 2001.
- BLINDAUER, C.A. et al. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *National Academic Society*, Washington, v.98, n.17, p.9593-9598, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- CAMARGO F.A. et al. Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v.32, n.4, p.1228-1233, 2003.

- CERVANTES, J.C. et al. Interaction of chromium with microorganisms and plant. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam v.25, n.7, p.335-347, 2001.
- CODD, R. et al. Studies on the Genotoxicity of Chromium: from the test tube to the cell. **Coordination Chemistry Reviews**, v.4, n.216, p.537, 2001.
- CHIRWA, E.N.; WANG, Y.T. Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria. **Water Research**, Oxford, v.34, n.8, p.2376, 2000.
- CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v.34, p.369, 1997.
- DERMOU, E. et al. Biological chromium(VI) reduction using a trickling filter. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.126, n.1-3, p.78-85, 2005.
- DICK, W.A.; TABATABAI, M.A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING, F.B. (Eds.). **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.95-127.
- FRANCISCO, R. et al. Diversity of chromium-resistant and reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. **Journal of Applied Microbiology**, Bradford, v.4, n.92, p.837-843, 2002.
- GRANER, C.A.F. **Determinação do cromo pelo método colorimétrico da difenilcarbazida**. 1972. 112f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- KEYHAN, M. et al. Target of improvement in bacterial chromate bioremediation. **Battelle Press**, Columbus, v.1, n.6, p.146-150, 2003.
- LOUKIDOU, M.X. et al. Equilibrium and kinetic modeling of chromium(V) biosorption by *Aeromonas caviae*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.242, n.1-3, p.93-104, 2004.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980. 928p.
- PARK, C.H. et al. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p.1788-1795, 2000.
- STANDEVEN, A.M.; WETTERHAHN, K.E. Ascorbate is the principal reductant of chromium(VI) in rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium-DNA binding *in vitro*. **Carcinogenesis**, Amsterdam, v.13, n.8, p.1319-1324, 1992.
- SUZUKI, T. et al. NADPH dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(VI) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.174, n.16, p.5340-5345, 1992.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.