

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A CROMO
HEXAVALENTE E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA
REDUTORA DE CROMO DO *Bacillus* sp. ES29**

Daniele Priscila da Conceição
Bacharel em Biologia (PUC/PR)

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS), Brasil
Março, 2006

Folha de Homologação

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Nilton e Rita, que tanto se esforçaram para oferecer a mim e a meus irmãos a oportunidade de estudo que não tiveram.
- Ao professor Flavio pela orientação, a professora Fátima pelo exemplo e incentivo;
- À CAPES pela concessão da bolsa;
- Às amigas do PPG, Melissa, Ana Paula e Cíntia pela ajuda e ótima companhia;
- Aos colegas de laboratório Rodrigo, Kelly, Patrícia, Clarissa, Aline, Alessandro, Ana Lu, Regilene e Valdir, pelas horas de trabalho e diversão;
- Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Fabio e Izabel;
- À minha grande amiga, Nanra pela compreensão, companheirismo e amizade;
- Ao meu amor, Joaquim por toda ajuda, carinho e extrema paciência;
- Agradeço a Deus, por todas as oportunidades e pessoas que tem colocado no meio caminho.

Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima cromo redutase do *Bacillus* sp. ES29¹

Autor: Daniele P. da Conceição
Orientador: Flavio A.O. Camargo
Co-orientador: Amauri B. Simonetti

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, caracterizar sua capacidade de redução do Cr(VI) durante o crescimento celular e purificar parcialmente a enzima cromo redutase do *Bacillus* sp. ES29, através da precipitação com sulfato de amônio (45-75%), cromatografia de gel filtração (Sephadex G-25) e cromatografia de interação hidrofóbica (Octyl Sepharose). A atividade de redução do Cr(VI) pelos isolados foi quantificada com o reagente de s-difenilcarbazida. No isolamento, foram obtidas 20 bactérias resistentes a cromo(VI). Seis destas foram capazes de reduzir 100 mg L⁻¹ Cr(VI) em 24 horas. Um dos isolados foi identificado, através de testes bioquímicos, como pertencete ao gênero *Bacillus*, sendo tolerante a 750 mg L⁻¹ Cr(VI) e reduzindo mais de 40% do Cr(VI) durante o crescimento celular. Na purificação parcial da enzima foi obtido um fator de purificação de 11,2, aumentando a atividade específica da enzima acima de 11 vezes, porém se faz necessário mais passos de purificações para obtenção desta enzima pura. As bactérias selecionadas e a enzima parcialmente purificada, foram eficientes na redução do Cr(VI) e apresentam potencial para outros estudos, visando a aplicação em processos de biorremediação.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (95p.). Fevereiro 2006.

Isolation of resistant bacteria to chrome hexavalente and partial purification of the enzyme chromate reductase from *Bacillus* sp. ES29.¹

Author: Daniele P. da Conceição

Adivisor: Flavio A.O. Camargo

Co-adivisor: Amauri B. Simonetti

Abstract

The reduction of Cr(VI) in Cr(III) decrease the toxic effect of this metal in the environment, because Cr(III) is insoluble to the biological membranes. Like this 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 work were to select microorganisms of soil contaminated with chromium were examined their ability in reduction Cr(VI), and the partial purification of chromate reductase from *Bacillus* sp. ES29, using ammonium sulfate precipitation (45-75%), gel filtration chromatography (Sephadex G-25) and hydrophobic interaction chromatography (Octyl Sepharose). The activity of reduction of Cr(VI) for the isolated was quantified with the s-diphenylcarbazide. A group of 20 chromium resistant bacteria were isolated, six of these were capable to reduce 100 mg L⁻¹ Cr(VI) in 24 hours. One of the isolates was identified, by biochemical tests, as belonging to the genus *Bacillus* and it was tolerant to 750 mg L⁻¹ Cr(VI) and reduced more than 40% during growth. Was obtained a 11,2 fold purification with protein partially purification from *Bacillus* sp. ES29, increasing the specific activity of the enzyme above 11 times, however it is being necessary more purifications steps to obtain this pure enzyme. The isolated bacteria, from soil contaminated, and the enzyme partially purified can remediate chromate and presented potential for other studies seeking their application in bioremediation processes.

¹ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (95p.). March 2006.

LISTA DE ABREVIATURAS

Asc: Ácido ascórbico

Cr(III): Cromo trivalente

Cr(VI): Cromo hexavalente

Cr(OH₃): Hidróxido de cromo

Cys: Cisteína

DNA: Ácido desoxirribonucléico

FeCr₂O₄: Cromita

GSH: Glutathiona

HCl: Ácido clorídrico

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

K₂CrO₇: Dicromato de potássio

LB: Luria Bertani

µg L⁻¹: Microgramas por litro

mg Kg⁻¹: Miligramas por quilograma

mg L⁻¹: Miligramas por litro

MTs: Metalotioneínas

RNA: Ácido ribonucléico

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

UFC: Unidades formadoras de colônia

W: Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Compostos contendo cromo.....	4
2.2 Toxicidade do cromo.....	5
2.3 Interação do cromo com DNA.....	6
2.4 Cromo no ambiente.....	7
2.5 Interações do cromo com microrganismos e plantas.....	10
2.6 Mecanismos de resistência.....	11
2.7 Biorremediação do cromo(VI).....	13
2.8 Enzimas redutoras de cromo(VI).....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Coleta de amostras de solo contaminado.....	21
3.2 Isolamento dos microrganismos resistentes a cromo(VI).....	22
3.3 Caracterização morfológica dos isolados.....	23
3.4 Verificação da atividade redutora de cromo(VI) pelos isolados.....	23
3.5 Determinação das condições ótimas para redução do cromo(VI).....	23
3.6 Atividade da enzima redutora de cromo.....	24
3.8 Identificação de gênero dos isolados mais eficientes.....	25
3.9 Curva de crescimento do <i>Bacillus</i> sp. ES29.....	26
3.10 Determinação das condições ótimas para obtenção da enzima.....	27
3.11 Purificação da enzima redutora de cromo do <i>Bacillus</i> sp. ES29.....	28
3.11.1 Análise cromatográfica.....	29
3.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	31
3.13.4 Determinação da temperatura e pH ótimos de atividade enzimática....	32
3.14 Técnicas analíticas.....	32
3.14.1 Determinação do cromo hexavalente.....	32
3.14.2 Determinação de proteína.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Comparação de metodologias para isolamento de microrganismos resistentes.....	34
4.2 Caracterização morfológica dos isolados.....	36
4.3 Crescimento e atividade redutora do Cr(VI) pelos isolados.....	37
4.4 Avaliação das condições ótimas para a redução do cromo(VI).....	40
4.5 Efeito de íons e doadores de elétrons sobre a atividade enzimática dos isolados.....	55
4.6 Identificação de gênero dos isolados mais eficientes.....	62
4.7 Crescimento e redução do cromo(VI) pelo <i>Bacillus</i> sp. ES29.....	64
4.8 Condições ótimas para obtenção da enzima.....	69
4.9 Purificação da enzima redutora de cromo do <i>Bacillus</i> sp. ES29.....	71
4.9.1 Cromatografia de gel filtração.....	76
3.9.1 Cromatografia de interação hidrofóbica.....	77
4.9.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	81
5 CONCLUSÕES.....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
VITA.....	97

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Crescimento e redução do Cr(VI) pelos isolados em caldo nutritivo com 2 mg L ⁻¹ de Cr(VI).....	42
FIGURA 2: Crescimento e redução do Cr(VI) pelos isolados em caldo nutritivo com 100 mg L ⁻¹ de Cr(VI).....	43
FIGURA 3: Crescimento e redução do Cr(VI) pelos isolados em caldo nutritivo com 250 mg L ⁻¹ de Cr(VI).....	45
FIGURA 4: Crescimento e redução do Cr(VI) pelos isolados em caldo nutritivo com 500 mg L ⁻¹ de r(VI).....	47
FIGURA 5: Crescimento e redução do Cr(VI) pelos isolados em caldo com 750 mg L ⁻¹ de Cr(VI).....	49
FIGURA 6: Influência do pH no crescimento celular e na redução do cromo(VI) presente no caldo nutritivo (50 mg L ⁻¹) após 12 horas de incubação.....	51
FIGURA 7: Influência da temperatura no crescimento celular e na redução do cromo(VI) presente no caldo de nutritivo (50 mg L ⁻¹) após 12 horas de incubação.....	54
FIGURA 8: Efeito dos doadores de elétrons e do cátion monovalente na atividade enzimática de redução do cromo (VI).....	58
FIGURA 9: Efeito dos cátions divalentes na atividade enzimática de redução do cromo (VI).....	59
FIGURA 10: Crescimento e redução do cromo (VI) presente no caldo LB na concentração de 50 mg L ⁻¹ (A) e 100 mg L ⁻¹ (B) pelo <i>Bacillus</i> sp. ES29.....	66
FIGURA 11: Produção da enzima redutora de cromo durante o crescimento celular com 2 mg L ⁻¹ de Cr(VI) ou na ausência do cromo.....	68
FIGURA 12: Atividade de redução do Cr(VI) e conteúdo de proteínas no extrato celular do <i>Bacillus</i> sp. ES29 obtido após diferentes tempos de sonicação	70
FIGURA 13: Atividade de redução do Cr(VI) em diferentes concentrações de tampão de lise e na mistura de reação para determinar a atividade enzimática de redução do Cr(VI) pelo <i>Bacillus</i> sp. ES29	71
FIGURA 14: Quantificação da atividade enzimática e de proteína solúvel em cada etapa da precipitação fracionada com sulfato de amônia.....	73
FIGURA 15: Efeito do pH na atividade redutora de cromo presente na enzima precipitada com sulfato de amônia, e na redução não biológica. Foram testados pH 5,0 a 7,0 em tampão fosfato e 7,0 a 10,0 em tampão Tris-HCl.....	74
FIGURA 16: Efeito da temperatura na atividade redutora de cromo presente na enzima precipitada com sulfato de amônia, e na redução não biológica.....	76
FIGURA 17: Valores de atividade enzimática e absorbância de cada fração obtida na cromatografia de gel filtração das amostras precipitadas com sulfato de amônio.....	77
FIGURA 18: Valores de atividade enzimática e absorbância de cada fração obtida na cromatografia de interação hidrofóbica das frações com atividade na gel filtração.....	78

FIGURA 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações com atividade de redução do Cr(VI), sendo na canaleta 1 o marcador de peso molecular e as etapas de purificação obtidas da precipitação com sulfato de amônio (2), gel filtração (3), interação hidrofóbica (4)..... 90

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Concentração de cromo total nas amostras de solo e a quantidade de bactérias resistentes a 500 mg L ⁻¹ de Cr(VI) isoladas em cada amostra.....	36
TABELA 2: Características morfológicas das colônias das bactérias resistentes a 500 mg L ⁻¹ de Cr(VI) isolados de solo contaminado com cromo.....	37
TABELA 3: Redução do cromo pelas bactérias isoladas após 48 horas de crescimento em caldo contendo 250 mg L ⁻¹ de Cr(VI).....	39
TABELA 4: Redução de 50 mg L ⁻¹ de Cr(VI) nas condições ótimas de crescimento.....	55
TABELA 5: Testes morfológicos e bioquímicos para identificação de gênero dos isolados.....	63
TABELA 6: Identificação de gênero para os isolados por testes bioquímicos.....	64
TABELA 7: Teores da enzima e fatores de recuperação e purificação em cada etapa do sistema de purificação da enzima redutora de cromo.....	80

1. INTRODUÇÃO

O modelo de desenvolvimento da sociedade atual tem contribuído grandemente para a geração de resíduos agrícolas e industriais com grande potencial de contaminação de ambientes, como o solo e a água. Nos países em desenvolvimento, grande parte dessa contaminação ainda não está relatada devido à deficiência de metodologias apropriadas para a detecção de sítios contaminados e a falta de uma política ambiental de fiscalização eficiente, por parte das agencias ambientais ao setor industrial. O cromo apresenta grande importância na indústria, por ser utilizado como anticorrosivo, em metalúrgicas, na cromagem, em ligas metálicas, em catalisadores, em corantes, em preservantes e principalmente no curtimento de peles. Todas estas aplicações geram grandes quantidades de efluentes e resíduos cromados. Como situação específica no Rio Grande do Sul, há ocorrência comprovada de solos contaminados com cromo, resultantes da poluição causada pelos resíduos gerados pelas indústrias do setor coureiro-calçadista. Este Estado participa com 39% das exportações de couros e peles do Brasil (segundo maior exportador mundial de peles), sendo o setor responsável por

4,6% da balança comercial gaúcha. Como resultado do curtimento de peles e couros ocorre a geração de lodos nas estações de tratamento de efluentes industriais (ETEs) com elevado potencial poluidor, devido a presença de grandes concentrações de cromo.

O cromo é encontrado na natureza na forma de cromo hexavalente [Cr(VI)] e trivalente [Cr(III)]. O Cr(III) é considerado a forma mais estável, de baixa solubilidade e menos tóxica do metal. Já o Cr(VI) é altamente solúvel, podendo penetrar na célula através de transportadores de fosfato ou sulfato. No citosol celular é rapidamente reduzido, não enzimaticamente, a seus intermediários Cr(IV), (V) e (III), reagem com proteínas e com a molécula de DNA, causando monoadição e adição ternária. Estas interações causam erro de pareamento, de replicação e quebra da molécula, resultando em mutações, carcinomas e danos a celular.

Apesar do Cr(VI) ser tóxico tanto para as células eucarióticas quanto para as procarióticas, mecanismos de resistência tem sido identificados na comunidade microbiana, provavelmente pela seleção natural em locais contaminados. Esta resistência é atribuída a baixa absorção ou a redução biológica, através de enzimas que transformam rapidamente o Cr(VI) em Cr(III), mais estável e de menor toxicidade. A produção de enzimas, com atividade de redução do cromo, seria responsável pela rápida redução do cromo no citosol celular e seu efluxo, sendo precipitado no meio externo provavelmente como hidróxido de cromo.

Com base nessas considerações, esta pesquisa teve como objetivos selecionar microrganismos resistentes ao cromo hexavalente, a partir de um

solo agrícola com histórico de contaminação por este metal. Caracterizar estes isolados quanto sua capacidade de biorremediação do cromo(VI) assim como, realizar a purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp. ES29.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos contendo cromo

O cromo é um metal pesado, obtido através do minério cromita (FeCr_2O_4). Na tabela periódica está localizado no grupo VI-B, onde no estado fundamental os elétrons ocupam os níveis mais baixos. Pode ser encontrado em alguns estados de oxidação, sendo os estados mais importantes o Cr(II) (reduzidor), Cr(III) (mais estável) e o Cr(VI) (oxidante) (Barcelo et al., 1985).

O Cr_2O_3 (trivalente) é um sólido verde, obtido por queima do metal no ar ou por aquecimento do CrO_3 (hexavalente). De grande importância industrial, é utilizado em pigmentos para tintas, em borrachas, no cimento, em catalisadores entre outros usos (Baral & Engelken, 2002). O CrO_3 é um sólido de cor laranja, pode ser obtido através da adição de H_2SO_4 ao dicromato de sódio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). É tóxico, dissolve-se facilmente em água, sendo um ácido forte e um forte agente oxidante. Dentre suas aplicações industriais destaca-se seu uso em metalúrgicas e no curtimento de peles.

Embora o Cr(III) seja muito estável em meio ácido, é facilmente oxidado a Cr(VI) em soluções alcalinas. Outra característica importante é a inércia deste metal, que é protegido por uma película de óxidos. Devido a este comportamento este metal é amplamente empregado para eletrodeposição sobre ferro e outros metais, para proteção contra a corrosão (Stern, 1982).

No ambiente, pode ocorrer naturalmente como Cr(III) ou Cr(VI) ou pela contaminação produzida por resíduos do curtimento de peles, do refino de petróleo, da indústria metalúrgica e do tratamento da madeira. A forma mais tóxica é a hexavalente [Cr(VI)], geralmente associado ao oxigênio (óxido de cromo (CrO^{2-}_4) ou dicromato [$\text{Cr}_2\text{O}^{2-}_7$]). Devido a sua menor solubilidade, a forma trivalente (Cr(III)) é menos tóxica e pode ser encontrada como óxidos, hidróxidos ou sulfatos (MacGrath & Smith, 1990).

2.2 Toxicidade do cromo

O Cr(VI) exibe pequena atividade biológica, devido à baixa interação com macromoléculas. Porém, em condições fisiológicas é facilmente transportado através das membranas, como resultado da atividade de transportadores inespecíficos de fosfato ou sulfato (Arslam al., 1987; Buttner & Beyersmann, 1985). Dentro da célula sofre rápida redução metabólica (redutores não enzimáticos) por ácido ascórbico (Asc) (Standeven & Wetterhahn, 1992), por grupos tiol de baixo peso molecular como a glutathione (GSH) (um tripeptídeo: glutamina, cisteína e glicina) (Kosower & Arias, 1976; Kortenkamp et al., 1996) e a cisteína (Cys) (Quiévryn et al., 2003). Outros agentes redutores são o citocromo redutase P450 (Mikalsen et al., 1991), a

cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Ryberg & Alexander, 1984), a glutationa redutase (Shi & Dalal, 1989), a aldeído oxidase (Banks & Cooke, 1986), a hidrogênio peroxidase (Kawanishi et al., 1986) e o NADH. Entre todos estes agentes redutores, os que apresentam maior atividade sobre a redução do cromo são os não enzimáticos Asc (vitamina C) e os grupos tiol, sendo mais relevante a Cys e depois o GSH (Quiévryn et al., 2003).

Através dos agentes redutores descritos acima, ocorre a transferência de uma série de elétrons, resultando em intermediários do Cr(VI), e finalmente, o Cr(III) (Stearns et al., 1995), que é uma molécula hexacoordenada (possui seis ligantes), capaz de formar complexos ligantes com aminoácidos, DNA e RNA ou proteínas (Wolf et al., 1989) e induzir mutação (Yang et al., 1992), troca de cromátides (Elias et al., 1983) e aberrações cromossômicas (Bianchi et al., 1980). O cromo hexavalente é conhecido por ser um agente carcinogênico e mutagênico, sendo solúvel e transportado para dentro das células, onde é reduzido a intermediários e a Cr(III), que são os verdadeiros responsáveis pelo dano às células.

2.3 Interação do cromo com DNA

A interação dos intermediários do Cr(VI) com a molécula de DNA tem sido objeto de diversos estudos envolvendo os mecanismos químicos no dano a molécula (Levina et al., 2003; Codd et al., 2001), isto ocorre através da redução do Cr(VI) no interior da célula através da transferência de um ou dois elétrons, a primeira redução pode formar Cr(IV) e Cr(V), que possuem afinidade pelas bases e pelo esqueleto de fosfato da molécula de DNA,

podendo causar monoadoção e adução ternária, que caracteriza-se pela ligação cromo-DNA (ligação do cromo com bases nitrogenadas ou grupamento fosfato), e resulta em erro de pareamento, de replicação e lesões pré-mutagênicas. O Cr(V) pode ainda oxidar diretamente as bases da molécula e as pentoses causando a quebra da estrutura (Yang et al.,1992). Dentro da célula o Cr(III) é a forma reativa e fortemente envolvida na monoadoção. Além de causar os mesmos danos que o Cr(IV e V) pode ainda formar ligação cruzada entre proteínas-cromo-DNA.

A interação do cromo com DNA e grupos fosfatos pode ocorrer através de ligações covalentes ou interação iônica. A ligação geralmente se dá com preferência entre Cr(III)-guanina e ácido polirriboguanilínico [poly(G)], no caso do RNA (Arakawa et al., 2000), causando problemas na síntese de proteínas. Ogawa et al. (1989) observaram que a presença de Cr(VI) levava a inativação da enzima DNA polimerase e conseqüente decréscimo da divisão celular de *Bacillus subtilis*. Estas são as interações relatadas até o momento, porém a utilização de novas técnicas de análise sugere que possa haver outras ligações entre cromo e macromoléculas (Levina & Lay, 2005).

2.4 Cromo no ambiente

A produção mundial de cromo está na ordem de 10 milhões de toneladas por ano, sendo utilizado em vários segmentos industriais (Papp, 1985). Esta grande demanda pode tornar o cromo um sério agente poluidor do ar, do solo e da água. A concentração média deste metal em água doce não poluída é de 0,1 a 0,5 mg L⁻¹ e em oceanos de 0,0016 a 0,05 mg L⁻¹ (De

Fillipps & Pallaghy, 1994), porém efluentes industriais não tratados lançados no ambiente podem conter concentrações muito elevadas de cromo.

O cromo é o sétimo elemento mais abundante na terra, sendo que sua concentração média nos solos varia de 5 a 250 mg kg⁻¹ (Shewry & Peterson, 1976). Por ser um forte agente oxidante da matéria orgânica, o cromo(VI) tem sido considerado um elemento estável em solos ácidos, por ser rapidamente reduzido a Cr(III). Entretanto em amostras de solo coletado e mantido com umidade natural tem se observado que o Cr(III) pode ser oxidado a Cr(IV). Essa oxidação é atribuída à presença de manganês na forma oxidada (Mn⁴⁺), que atua como receptor de elétrons, havendo a transformação do Cr(III) em Cr(IV), o qual permanece neste estado de oxidação por vários meses (Bartlett & James, 1979; Milacic & Stupar, 1995). Estudos em casa de vegetação e a campo realizados no Rio Grande do Sul, utilizando resíduos de curtume demonstraram o poder de neutralização da acidez do solo e capacidade de fornecimento de nitrogênio para as plantas provenientes destes resíduos. Estes trabalhos também evidenciaram a baixa transformação do Cr(III) a Cr(VI) (Selbach et al., 1991; Kray 2001). Entretanto, esta transformação foi observada por Trebien (1994), através da adição de Cr(III) na forma mineral, em solos com alto teor de manganês facilmente reduzível, em condições adequadas de umidade.

O caso mais conhecido por contaminação ambiental ocorreu na Califórnia na cidade de Hinkley em 1987, foi causada por uma grande indústria da região que utilizava o cromo como anticorrosivo, onde foi detectado Cr(VI) na água subterrânea em uma concentração de 580 mg L⁻¹. A população desta

cidade apresentava vários tipos de doenças como no coração, no sistema respiratório, baixa fertilidade e principalmente câncer (no cérebro, de mama, de útero e no sistema gastrintestinal). Neste caso a empresa poluidora foi multada em 300 milhões de dólares, sendo esta a maior indenização ambiental da história.

O Cr(III) é encontrado em muitos suplementos alimentares. É considerado um micronutriente necessário para atividade biológica da insulina (Anderson, 1981) e para o metabolismo de carboidratos em humanos (Anderson, 2000; Chirwa & Wang, 2000). Este assunto tem gerado certa divergência entre médicos, que acreditam não haver indícios da dependência de biomoléculas por Cr(III) (Cood et al., 2003). Milhares de pessoas estão diretamente expostas ao cromo em seus locais de trabalho. A exposição ocupacional ao Cr(III) ou ao Cr(VI) torna-se mais grave quando há risco de inalação. Outras fontes de contaminação não ocupacional são o cigarro, fumaça dos automóveis, emissões vulcânicas, alimentos e água contaminada (Cervantes et al., 2001). 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 nos humanos (Levina & Lay, 2003).

2.5 Interações do cromo com microrganismos e plantas

A entrada do cromo através do sistema de transporte de sulfato foi demonstrada primeiramente em *Salmonella typhimurium* (Dreyfuss, 1964) e

posteriormente em *Escherichia coli* (Sirko et al., 1990). Em fungos, o transporte ocorre através do carreamento não específico de ânions no sistema de permeases (Borst, 1981). Alguns mutantes de *Neuspora crassa* resistentes ao cromo apresentaram forte alteração neste sistema de transporte (Marzluf, 1970). Foi demonstrado por Henderson (1989) que em *Saccharomyces cerevisiae*, o cromo era muito tóxico para as células que cresciam em fontes de carbono não fermentáveis em relação as que cresciam em substratos fermentáveis. Este fato levou o pesquisador a concluir que um dos efeitos do cromo é a inibição da absorção de oxigênio, sendo sugerido que, este metal apresenta afinidade pelas mitocôndrias.

Evidências da utilização de Cr(VI) pelos microrganismos como acceptor de elétrons não são recentes (Romanenko & Koren'Ken, 1977). Entretanto, o volume de pesquisas produzidas atualmente sobre a redução do Cr(VI) demonstram a importância deste processo na eliminação da contaminação de cromo hexavalente (Oh & Choi, 1997; Chirwa & Wang, 2000; Park et al., 2000; Schieman et al., 2000; Shakoori et al., 2000; Shin & Paik, 2000; Smith & Gadd, 2000). Os estudos iniciais demonstravam que anaeróbios facultativos como *Pseudomonas dechromaticans*, *P. chromatophila* e *Aeromonas dechromatica* removiam o Cr(VI) da solução pela formação de precipitados, presumivelmente Cr(OH)₃. Estudos subseqüentes demonstraram uma grande variedade de microrganismos redutores de cromo entre eles o *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus* e *Escherichia coli* (Losi & Frankenberger, 1994b).

A presença de Cr(III) ou Cr(VI) em quantidades prejudiciais para as plantas pode resultar em danos como clorose, redução de crescimento foliar e radicular, e morte (Mertz, 1969). Devido ao alto poder de oxidação do Cr(VI), danos à membrana celular das plantas e de microrganismos tem sido observados (Hunter & Vergnano, 1953; Barcelo et al., 1985; Sharma et al., 1995). Os efeitos tóxicos do Cr(VI) nas plantas são causados por alterações no conteúdo de nutrientes essenciais e decréscimo da taxa de fotossíntese, como consequência do fechamento de estômatos, alteração de cloroplastos e redução do espaço intercelular (Brochiero et al., 1984). Nas plantas o cromo pode ser absorvido tanto na forma (III) como (VI), sendo acumulado preferencialmente pelas raízes e raramente translocado à parte aérea da planta, normalmente ocorre um acréscimo no teor de cromo nas raízes das plantas com o aumento da concentração de cromo no solo (Kray, 2001).

2.6 Mecanismos de resistência

Uma vez que o cromo ocorre naturalmente, os mecanismos de resistência e tolerância têm evoluído nas comunidades microbianas através da seleção natural. Conseqüentemente, a resistência ao cromo pode ser encontrada em um grande número de microrganismos habitando solo, água e sedimentos (Losi et al, 1994c).

Para a obtenção de microrganismos resistentes ao cromo é realizado o isolamento a partir de solos em condições naturais (Pal & Paul, 2004) e solos contaminados (Camargo et al., 2003a). A atividade microbiana está intimamente envolvida na ciclagem dos metais pesados, presentes em

ambientes contaminados. Os organismos respondem de forma diferente aos íons tóxicos, o que muitas vezes confere a tolerância. De forma geral, os eucariotos apresentam maior sensibilidade a metais do que os procariotos. Esta tolerância pode estar relacionada a diversos fatores, entre eles, a produção de metalotioneína (MTs), uma família de proteínas quelantes de metais. Esta proteína produzida por alguns microrganismos apresenta seqüência curta de aproximadamente 60 aminoácidos ricos em cistina, que se liga ao cromo, reduzindo sua concentração intracelular e conseqüentemente, os danos causados pelo metal. Esta resistência a metais parece ser uma adaptação a ambientes ácidos, onde a solubilidade do metal é maior (Blindauer et al., 2001).

Mecanismos de resistência têm sido propostos para microrganismos e plantas, como a sorção, o acúmulo, a precipitação, o efluxo e a redução de Cr(VI) a Cr(III). Entre estes sistemas, a redução parece ter grande potencial biotecnológico para a biorremediação. Alguns microrganismos reduzem Cr(VI) melhor em condições aeróbias do que anaeróbias e a função fisiológica desta redução aeróbia ainda não está bem definida (Lovley, 1993; Losi et al., 1994d). Segundo Lovley & Phillips (1994), *Desulfovibrio vulgaris* reduziu Cr(VI) a Cr(III) via citocromo c_3 . Para *Pseudomonas* sp. foi proposto que a redução do Cr(VI) pode ser resultado da atividade primária e secundária de redutase solúvel, cuja função fisiológica não foi determinada (Oh & Choi, 1997).

A resistência é freqüentemente relacionada à presença de plasmídios. Bopp et al. (1983) isolaram estirpes de *Pseudomonas fluorescens* resistentes ao cromo e verificaram que a resistência era conferida por

plasmídios capazes de transmitir esta resistência. Observaram que a redução de Cr(VI) estava associada com uma enzima constitutiva, presente na membrana, com capacidade de transferir elétrons do NADH para o cromo. Ohtake et al. (1987) verificaram que a resistência a elevadas concentrações de cromo estava relacionada a um plasmídio transportador de sulfato, que realizava o efluxo do cromo em *P. fluorescens*. Este mecanismo foi observado também em outra espécie como *Alcaligenes eutrophus* (Nies et al., 1989). Duncan et al. (1992), relataram que a resistência de *P. aeruginosa* era conferida pelo plasmídio, mas que o mecanismo bioquímico era desconhecido.

Dois plasmídeos foram estudados a nível molecular, pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes et al., 1989) e pMOL28 de *A. eutrophus* (Nies et al., 1989). Estudos com o plasmídio pUM505 demonstraram que este era responsável pela síntese de uma proteína hidrofóbica com 416 resíduos de aminoácidos. A proteína foi denominada de ChrA, sendo responsável pelo rápido efluxo do cromo (Betzabe et al., 2002). O plasmídeo pMOL28 realiza a síntese de uma proteína de 401 resíduos de aminoácidos, sendo atribuída a resistência a Cr(VI). Estudos com microrganismos resistentes e redutores podem ser úteis para utilização destes na biorremediação e no monitoramento da concentração do poluente (biosensores) em efluentes industriais (Peitzsch et al., 1998).

2.7 Biorremediação do cromo(VI)

Devido a sua grande importância econômica e da ampla utilização na indústria o cromo tornou-se um dos principais poluentes do ambiente e

potencial causador de toxicidade ao homem e animais. Para solucionar o problema, as empresas têm tentado utilizar métodos químicos e físicos para retirar o cromo de seus efluentes, através da neutralização ou precipitação, redução eletroquímica, troca iônica, osmose reversa, separação por membranas e extração com solventes (Henze et al., 1995). O método mais utilizado pelas indústrias é a precipitação dos íons metálicos com hidróxidos, em pH ácido. No entanto, esta técnica gera elevadas quantidades de lodo, com grande concentração de Cr(IV), além dos subprodutos tóxicos gerados no processo (Chermicharo & Speling, 1996).

Uma solução alternativa é a biorremediação, que se caracteriza pela utilização de organismos ou produtos metabólicos para retirar a contaminação de ambientes, seja pela degradação, sorção, acúmulo ou precipitação (Dua et al., 2002). Como o metal pesado não pode ser degradado, ou seja, transformado em elemento inerte, como CO₂ e H₂O, como ocorre com compostos orgânicos, algumas estratégias biológicas têm sido investigadas para o tratamento de efluentes industriais.

A sorção e o bioacúmulo do cromo a biomassa, viva ou não, tem sido testada em algas (Wilde & Benemann, 1993) e fungos (Vala et al., 2004). Nesta técnica, o Cr(VI) é removido de efluentes através da ligação do metal a superfície da célula (sorção), transporte para o espaço intracelular e posterior acúmulo. Esta técnica apresenta limitações como o pH, a temperatura e a quantidade de sais presentes no efluente, que interferem diretamente no processo (Dönmez & Koçberber, 2004). Segundo Pillichshammer et al. (1995), a utilização da biomassa de fungos filamentosos pode ser uma alternativa para

o tratamento de água e solo contaminado. Neste trabalho os autores descrevem a interação do metal com a biomassa, que se dá através da ligação o Cr(VI) ou Cr(III) à quitina e à N-acetilglicosamina.

Outro processo que vem sendo aplicado é a fitorremediação, que se baseia na capacidade das plantas de acumular e transformar o contaminante (Cunningham & Ow, 1996). O metal é absorvido pelas raízes e translocado através do sistema transportador de sulfato, sendo esta atividade inibida competitivamente pela presença do sulfato (Kleiman & Cogliatti, 1997). Sendo observado neste sistema que apenas uma pequena quantidade de cromo era efetivamente absorvida havendo o efluxo do metal, presumivelmente devido a seu efeito tóxico.

Entre estes sistemas a redução parece ter um grande potencial biotecnológico para a biorremediação através da transformação do Cr(VI) a Cr(III) e sua precipitação. A redução ocorre diretamente, pela atividade enzimática localizada na membrana celular ou citosol, e indiretamente com a produção de H₂S, que atua como redutor (Smith & Gadd, 2000). A bio-redução direta do Cr(VI) pode ser concebida como um mecanismo de detoxificação ou como resultado da utilização do cromo como acceptor final de elétrons na oxidação da matéria orgânica, quando a relação cromo/oxigênio é favorável (Kortenkamp et al., 1996).

A bio-redução do cromo tem sido testada em relação a fontes de energia, condições ambientais e características da enzima. Entre as fontes de energia avaliadas destacam-se a glicose, acetato, etanol, malato, succinato,

glicerol (Schieman et al., 2000), lactato (Smith & Gadd, 2000) e fenóis (Chirwa & Wang, 2000).

Entre as condições ambientais que influenciam a redução microbiológica destacam-se: pH, temperatura, concentração de Cr(VI), quantidade de inóculo (Shakoori et al., 2000), solo, água de irrigação, quantidade de matéria orgânica e óxidos mangânicos (Losi et al., 1994a; Cifuentes et al., 1996), bem como alguns dados sobre a cinética enzimática das enzimas redutoras de cromo (Ishibashi et al., 1990; Oh & Choi, 1997; Park et al., 2000; Schieman et al., 2000) e a produção destas enzimas (DeLeo Ehrlich, 1994; Park et al., 2000; Schieman et al., 2000).

Camargo et al. (2003a) verificaram a partir de estudo com bactérias isolados obtidos de solo contaminado, que a redução do Cr(VI) presente em caldo de crescimento era fortemente alterada por variações de temperatura e pH, sendo que para cada isolado havia uma condição ótima para a atividade de redução do cromo.

Para a utilização do processo de bio-redução enzimática do cromo na biorremediação, destaca-se o potencial uso destas enzimas na forma imobilizada. A maioria dos processos bioquímicos e técnicas de imobilização usa enzimas solúveis ou monoculturas de células. Se a reação pode ser catalisada por um sistema de enzima única, a imobilização de enzimas torna-se mais eficiente do que a imobilização de células (Dick & Tabatabai, 1992). Um exemplo desta aplicação foi demonstrado por Camargo et al. (2004), que avaliaram a imobilização com diferentes suportes de células e extrato celular do *Bacillus* sp. ES29, foi observado que a imobilização de extrato celular era

mais eficiente na redução de efluente contendo Cr(VI), este sistema mostrou potencial para outros estudos.

2.8 Enzimas redutoras de cromo

O primeiro estudo realizado sobre bactérias capazes de reduzir o cromo foi realizado por Romanenko & Koren'kov (1977), que demonstraram a presença destes organismos no solo e na água, sendo estes responsáveis também pela ciclagem biogeoquímica deste metal.

A atividade redutora já foi relatada na membrana celular (Romanenko & Koren, 1977; Wang et al., 1990) e no citoplasma (Camargo et al., 2003b) de algumas bactérias. A presença de enzimas redutoras em diferentes organismos sugere que estas possam compartilhar características fisiológicas importantes (Wang & Shen, 1996). Michel et al. (2001) realizaram um estudo sobre a redução enzimática do cromo utilizando bactérias redutoras de sulfato. A redução foi associada à atividade do citocromo c de *Desulfomicrobium norvegicum*, que apresentava uma Fe-hidrogenase que realizava a redução do cromo.

A enzima denominada de cromato redutase é uma enzima que catalisa redução da forma tóxica do cromo (VI) a forma inerte (III). Esta enzima tem recebido atenção devido a seu uso potencial na biorremediação e biocatálise. A caracterização desta enzima tem sido estudada, assim como seus padrões de indução e a expressão do gene, para elucidar sua atividade em relação ao cromo (Michel et al., 2001).

Através da clonagem e seqüenciamento de genes *crhA* de resistência a cromo dos plasmídios pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes et al., 1989) e pMOL28 de *A. eutrophus* (Nies et al., 1989) foi possível deduzir que estes eram responsáveis pela síntese de uma proteína de 416 e 401 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Estas proteínas apresentaram 29% de resíduos idênticos e 63% de aminoácidos hidrofóbicos. O mecanismo de resistência conferido por estas proteínas a elevadas concentrações de Cr(VI) ocorre através do rápido efluxo do metal, estando localizada na membrana celular (Betzabe et al., 2002).

Suzuki et al., (1992) foram os primeiros a publicar a purificação de uma enzima solúvel que realizava a conversão do cromo. A enzima foi purificada através de cromatografia com DE32, AF-chelante Toyoperarl 650M, Shephadex G-100, e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A proteína parcialmente purificada apresentava peso molecular de 65 kDa, sendo dependente de NADPH, obtida da bactéria resistente a cromo, *Pseudomonas ambigua* G-1.

Outro grupo de pesquisadores descreveu a enzima cromato redutase do *Bacillus* sp. QC1-2 (Campos et al., 1997). Para a purificação parcial desta enzima realizaram a liofilização do extrato celular, sendo ressuspenso e aplicado em uma coluna troca iônica em HPLC; as frações com atividade foram novamente liofilizadas e aplicadas em uma cromatografia de gel filtração com BioGel P-200. A proteína parcialmente purificada era dependente de NADH e possuía 44 kDa observada através de gel SDS-PAGE, com atividade ótima 37°C e pH 7,0.

Nepple et al., (2000) purificaram a enzima redutase do microorganismo *Rhodobacter sphaeroides*, que reduzia o cromo tanto em aerobiose como em anaerobiose. Esta atividade foi localizada na fração citoplasmática da célula, sendo atribuída a uma enzima solúvel, que foi purificada através de cromatografia de troca aniônica, de afinidade, de interação hidrofóbica e gel filtração. A proteína obtida apresentou peso molecular de 42 kDa, determinado por gel filtração, sendo sua atividade ótima a 30°C e pH 7,0.

Outra enzima redutase tem sido muito estudada por Park et al., (2000). Esta foi a primeira a ser purificada até a homogenidade, através de precipitação das proteínas do extrato celular com sulfato de amônia, sendo as frações de interesse submetidas a cromatografia de troca aniônica (com DEAE Sepharose CL-6B), posteriormente aplicada em um sistema de “polybuffer exchanger”, e finalmente em gel filtração. A enzima foi denominada de ChrR obtida de *Pseudomonas putida*, sendo dependente de NADH ou NADPH e sua atividade ótima ocorreu a 80°C e pH 5,0. Ackerley et al. (2004) estudaram esta enzima purificada e através da análise N-terminal da seqüência de aminoácidos desenharam oligonucleotídeos para a clonagem do gene *chrR*. Foi observado através da comparação desta enzima com um banco de dados (BLAST), que ela apresentava seqüência similar a uma família de flavoproteína presente em muitos grupos de bactérias.

Recentemente Woo et al. (2005) purificaram uma enzima redutora de cromo da *Escherichia coli* ATCC 33456 que apresentava grande redução enzimática do Cr(VI). A proteína foi obtida através de precipitação com sulfato

de amônia e aplicado em cromatografia de troca aniônica (Q-Sepharose FF). As frações foram concentradas com sulfato de amônio e submetidas a uma coluna com Sephacryl S-100 HR, sendo então concentradas em um sistema de membranas do tipo Amicon e aplicadas a uma coluna de Mono-Q HR 5/5. O último passo de purificação utilizou uma cromatografia de gel filtração com Superdex 200 HR, após todos estes passos foi obtida uma enzima pura. Esta apresentou peso molecular de 84 kDa na gel filtração e 24 kDa na eletroforese em gel de poliacrilamida, presumivelmente uma proteína com estrutura dimérica, também dependente de NADPH ou NADH como doadores de elétrons.

Camargo et al. (2003b) isolaram uma bactéria que foi identificada como *Bacillus* sp., através do seqüenciamento do gene *RNA16S*, este microrganismo apresentou alta resistência ao Cr(VI) reduzindo o metal durante seu crescimento. Foi investigada a localização de sua atividade de redução de cromo, estando presente apenas na fração solúvel (citossol). Sua atividade foi dependente de NADH como doador de elétron e estimulada por cobre. Foram imobilizadas em bioreator células do *Bacillus* sp. ES29 e extrato celular resultando em significativa redução do Cr(VI) e grande potencial biotecnológico para novas investigações (Camargo et al., 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras de solo contaminado

As amostras de solo foram obtidas de uma área do município de Roca Sales-RS, em um solo agrícola contaminado com cromo, devido ao descarte inadequado de lodo de curtume. Foram realizadas 12 marcações na área e coletadas amostras de solo na profundidade de 0 a 30 cm, que apresentavam as seguintes características químicas: pH 5,9; SMP 6,2; P 7,7 (mg/L^{-1}); K 77 (mg/L^{-1}); MO 2,6 (%). Estas amostras foram quantificadas quanto a concentração do cromo total e cromo(VI), conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995) e Bartlett & James (1979), respectivamente. Para a realização destes experimentos foram escolhidas as amostras que apresentaram as concentrações mais baixas (344 e 355 mg L^{-1}) e mais altas (466, 510 e 835 mg L^{-1}) de cromo total. Este critério de seleção foi utilizado em vista da possibilidade de que nas amostras mais contaminadas poderia haver um número maior de organismos resistentes ou número reduzido de microrganismos devido à toxidez do cromo.

3.2 Isolamento dos microrganismos resistentes a cromo(VI)

Para a obtenção de microrganismos resistentes foram utilizadas as técnicas de isolamento direto e de enriquecimento. Para a realização do isolamento direto, um grama de cada amostra de solo selecionado foi adicionado a 99 mL de água estéril, e agitada por 15 minutos. Posteriormente estas amostras foram diluídas até 10^{-3} e 10^{-4} , retirando-se 100 μ L para o plaqueamento em agar nutritivo (5 g L⁻¹ de peptona bacteriológica, 3 g L⁻¹ de extrato de carne e 15 g L⁻¹ de agar) suplementado com 500 mg L⁻¹ de cromo(VI) adicionados na forma de solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante uma semana. Após este período foi realizado o isolamento das colônias.

A segunda técnica utilizada foi a do enriquecimento, onde um grama das amostras de solo foram adicionadas a 200 ml de caldo nutritivo com 500 mg L⁻¹ de K₂Cr₂O₇ e incubado por 24 horas, a 150 rpm e a 30 °C. Após este período foi realizada a transferência para outro frasco contendo o mesmo meio e incubado nas mesmas condições. Após 4 transferências, foram retirados 100 μ L para o plaqueamento em agar nutritivo contendo 500 mg L⁻¹ de Cr(VI). As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o aparecimento de colônias. Sendo que as menores diluições, 10^{-1} e 10^{-2} , foram incubadas por 48 horas e as maiores diluições, 10^{-3} e 10^{-4} , por 72 ou 96, horas em estufa a 30°C. Após este período foi realizado o isolamento de colônias, que foram armazenadas em placas com 500 mg L⁻¹ de Cr(VI), a 4°C, e também em solução preservante de leite desnatado e glicerol 1% e armazenado a -15°C.

3.3 Caracterização morfológica dos isolados

Os isolados obtidos foram crescidos em agar nutritivo para a caracterização morfológica, quanto a forma, elevação, bordos, estrutura e cor das colônias.

3.4 Verificação da atividade redutora de cromo(VI) pelos isolados

Os isolados obtidos foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em caldo nutritivo contendo $K_2Cr_2O_7$. As colônias puras foram inoculadas em frascos de erlenmeyers contendo 30 ml de caldo nutritivo com 2 mg L^{-1} de Cr(VI) e incubadas por 24 horas, a 150 rpm e $30\text{ }^\circ\text{C}$, sendo este o pré-inóculo. Após este período de crescimento os isolados foram inoculados em caldo nutritivo com 250 mg L^{-1} de Cr(VI), sendo o inóculo padronizado a uma absorbância de 0,3, em espectrofotômetro a 600 nm. Após incubação por 24 horas, a 150 rpm e $30\text{ }^\circ\text{C}$, foi determinada a densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 600 nm e a concentração final do Cr(VI) no caldo nutritivo, com o reagente de s-difenilcarbazida em espectrofotômetro a $A_{540\text{ nm}}$ (item 3.12.1).

3.5 Determinação das condições ótimas para redução do cromo

Os isolados mais eficientes na redução do cromo, foram testados quanto a capacidade de crescimento em caldo nutritivo contendo 2, 100, 250, 500 e 750 mg L^{-1} de Cr(VI). Os inóculos e as condições de incubação foram às mesmas descritas acima. As determinações da DO e do Cr(VI) presente no

caldo nutritivo foram realizadas após 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de incubação.

Para avaliar o efeito do pH na redução do cromo e para caracterização da atividade ótima para cada isolado estes foram crescidos separadamente, padronizados como descrito e inoculados em caldo nutritivo contendo 50 mg 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. Sendo as determinações de DO e concentração do cromo(VI) realizadas após 12 horas de incubação, a 150 rpm e 30°C.

Para avaliar o efeito da temperatura na redução do cromo, os isolado foram crescidos separadamente, padronizados como descrito e inoculado em caldo nutritivo contendo 50 mg L⁻¹ de Cr(VI). Os isolados foram incubados nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, sendo as análises de DO e concentração do Cr(VI) realizados após 12 horas de incubação a 150 rpm.

3.6 Atividade da enzima redutora de cromo

Para a obtenção do extrato celular os isolados foram inoculados em 500 ml de caldo Luria Bertani (LB) (Merck), suplementado com 2 mg L⁻¹ de Cr(VI) e incubados por 24 horas, a 150 rpm e 30°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 8000 rpm, por 15 minutos, a 4°C e ressuspendidas em água estéril, sendo novamente centrifugadas e ressuspendidas em 10 ml de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). Para a obtenção do extrato celular as células, em tampão fosfato, foram sonicadas em banho de gelo com três pulsos de 20 segundos, a 35 W. Após o rompimento das células, foi realizada a centrifugação a 10000 rpm por 45 minutos, para a retirada de

restos celulares, e a quantificada a concentração de proteína no sobrenadante provenientes do citosol.

Para avaliar o efeito de diferentes íons na atividade da enzima redutora de cromo preparou-se a reação de NADH (0,2 mM), tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) com Cr(VI) (1 mg L^{-1}) e o íon a ser testado. O volume final da reação foi de 1,5 ml, sendo incubado a 30°C, por 15 minutos. Após este período, a solução de s-difenilcarbazida era adicionada, procedendo-se à análise em espectrofotômetro ($A_{540\text{nm}}$). 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 doadores de elétrons foram testados glicose (0,5 mM) e glicerol (1% v/v) e como inibidores, os íons de Cu^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Na^+ e NH_4^+ , adicionados a mistura de reação na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês, sulfato de sódio na concentração de 1 mM e sulfato de amônio na concentração de 10 mM, respectivamente.

3.7 Identificação de gênero dos isolados mais eficientes

Para a identificação de gênero dos isolados que mais eficientemente reduziram o Cr(VI) foram realizados os seguintes testes: coloração de Gram, de esporos, presença de ácido micólico, prova de gelatinase, prova de amido, prova da catalase, produção de H_2S , redução do citrato, prova do indol, prova de motilidade, prova da fenilalanina, prova da esculina, teste de oxidase,

crescimento em agar MacConkey, prova da urease, prova do nitrato e testes para a utilização de diferentes fontes de carbono com glicose, galactose, arabinose, xilose, manitol, frutose e sacarose, segundo Mcfaddin (1980).

3.8 Caracterização da atividade de cromo redutase do *Bacillus* sp. ES29

O *Bacillus* sp. ES29 foi isolado a partir de um solo contaminado com cromo por Camargo et al. (2003a). Para determinar a atividade da enzima redutora de cromo presente no extrato celular e nas frações de proteína purificadas deste microrganismo foi realizada reações com 0,8 ml de tampão fosfato (50 mM pH 7,0) e $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr(VI)}$, sendo a reação iniciada com adição de 0,2 ml do extrato celular ou das frações purificadas e NADH (0,2 mM). Após quinze minutos de incubação a 30°C , adicionou-se s-difenilcarbazona e após dez minutos determinou-se a $A_{540\text{nm}}$. A determinação de proteína foi realizada conforme item 3.12.2.

3.9 Curva de crescimento do *Bacillus* sp. ES29

Para avaliação do crescimento e redução do cromo, pelo *Bacillus* sp. ES29, a bactéria foi crescida em caldo LB contendo 50 e 100 mg L^{-1} de Cr(VI). A incubação ocorreu a 150 rpm e 30°C até a redução total do cromo no caldo nutritivo. Em intervalos de 12 horas era realizada a contagem de células por unidades formadoras de colônia (UFC). Neste intervalo também era realizada a quantificação do Cr(VI) presente no caldo de nutritivo.

Para avaliar se a expressão da enzima é induzida pela presença do cromo, o *Bacillus* sp. ES29 foi inoculado em caldo LB com 2 mg L⁻¹ de Cr(VI), sendo este o pré-inóculo. Com este foram inoculados caldo LB (500 mL) com 1 mg L⁻¹ de Cr(VI) e sem cromo e incubados a 150 rpm e 30°C. Após 8, 16 e 24 horas foram obtidos o extrato celular e quantificado a proteína e a atividade de cromo redutase.

3.10 Determinação das condições ótimas para obtenção da enzima

Para otimizar a obtenção da enzima foram realizados testes para determinar o melhor tempo de sonicação para o rompimento das células uma vez que, este processo gera calor, o que pode desnaturar as proteínas. Este teste foi realizado a partir da inoculação de um litro de caldo LB com o *Bacillus* sp. ES29. Após a obtenção das células por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C, estas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (50 mM pH 7,0) e ressuspendidas em 20 mL do mesmo tampão. Para a sonicação em banho de gelo foi aplicada a potência de 35 W, variando-se o tempo de sonicação de 20, 40, 60 e 100 segundos. A cada vinte segundos de sonicação era realizada uma pausa de um minuto para o resfriamento da sonda. As frações obtidas em cada intervalo foram centrifugadas e o sobrenadante avaliado quanto à atividade de cromo redutase e quantificação de proteína.

Para avaliar o efeito das concentrações de 50 e 100 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na conservação da atividade enzimática durante a sonicação, as células do *Bacillus* sp. ES29 foram removidas do caldo LB por centrifugação

e ressuspensas nas duas concentrações de tampão fosfato. Após a sonicação quantificou-se a atividade de redução do cromo.

Foi verificado também o efeito destas duas concentrações de tampão fosfato na mistura de reação enzimática. Para isso, as células foram rompidas e ressuspensas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). A reação foi feita com 0,8 ml de tampão fosfato (50 e 100 mM pH 7,0) com 1 mg L⁻¹ de Cr(VI), sendo a reação iniciada com adição de 0,2 ml do extrato celular e 0,2 mM de NADH. Após quinze minutos de incubação a 30°C, adicionou-se s-difenilcarbazona e após dez minutos determinou-se a A_{540nm}.

3.11 Purificação da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp.

ES29

O experimento foi realizado em frascos de erlenmeyer de 1,5 litros contendo 500 mL de caldo LB (pH 7,0) e 2 mg L⁻¹ de Cr(VI). O volume total do mostro era de seis litros. O meio de cultivo era inoculado com 1% do pré-inóculo, o que correspondia a A_{600nm} de 0,6 e incubado por 16 horas, a 150 rpm e 30°C.

Após o crescimento, a obtenção do extrato celular para a purificação foi realizada por centrifugação do caldo a 5000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. As células obtidas foram ressuspensas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) lavadas duas vezes no mesmo tampão e então sonicadas em banho de gelo, com dois pulsos de 20 segundos a 35 W. Depois do rompimento celular foi realizada a centrifugação a 10000 rpm por 45 minutos para a retirada de restos celulares. O sobrenadante foi filtrado com membranas filtrantes de 45 µm, pois

segundo Camargo et al. (2003b), a fração de atividade redutora esta presente apenas no citosol celular. Em todos os passos de purificação foram realizadas as avaliações de concentração de proteína e atividade de cromo redutase.

O primeiro passo de purificação foi realizado com a precipitação fracionada com sulfato de amônio, utilizou-se o extrato celular obtido conforme descrito acima. As faixas de saturação utilizadas foram: 45 a 75%, 55 a 75% e 65 a 75%. O experimento foi conduzido sob condições de refrigeração e agitação. As quantidades de sulfato de amônio adicionadas para cada etapa da precipitação foram calculadas com base no volume de extrato celular sujeito a precipitação, segundo Scope (1992).

Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para cada etapa da precipitação fracionada, foi realizada a centrifugação da amostra a 10000 rpm por 45 minutos, a 4°C, e o precipitado ressuspendido em 5 ml de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). Para a retirada dos sais as frações foram dialisadas com membrana de diálise em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), em agitação, a 4°C, por 24 horas. Cada etapa de precipitação dialisada foi avaliada quanto à atividade de cromo redutase e proteína.

3.11.1 Análise cromatográfica

A fração com maior atividade, na etapa de precipitação e diálise foi submetida à cromatografia de gel filtração. Esta técnica separa as moléculas em solução de acordo com seu tamanho através da passagem pela matriz cromatográfica, sendo que as moléculas de maior peso molecular são eluídas mais rapidamente do que as moléculas de baixo peso molecular. A resina

utilizada foi a Sephadex G-25 (Pharmacia), com limite de exclusão de 5 kDa. Sua preparação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e acoplada em uma coluna de 70 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro (Sigma). Para avaliar o tempo de retenção, ou seja, o tempo necessário para que as primeiras proteínas fossem eluídas da coluna, foi colocada na coluna uma solução com *blue dextran* (alto peso molecular). Assim pode-se determinar que o tempo de retenção para esta coluna era de 30 mL.

Para a cromatografia foi adicionado um volume máximo de 7 mL e eluída com tampão fosfato 50 mM e pH 7,0. Após a aplicação da amostra, as primeiras frações eram coletadas após eluído 25 mL (um pouco antes das primeiras proteínas serem eluídas) com um coletor de amostra automático (BioRad Model-110). Um total de 30 frações de 1,8 mL foram coletadas de cada coluna de gel filtração, sendo determinada a atividade enzimática e a quantidade de proteína para cada fração. As frações com atividade enzimática de interesse neste trabalho foram agrupadas e novamente analisadas, como descrito acima, e submetidas ao passo seguinte de purificação.

O conjunto das frações com atividade enzimática na cromatografia de gel filtração foram submetidos à cromatografia de interação hidrofóbica. Este tipo de cromatografia baseia-se nas propriedades hidrofóbicas das proteínas, que devem ser colocadas na presença de elevada concentração de sulfato de amônio, o qual aumenta a entropia da água, aumentando, assim as interações hidrofóbicas, além de estabilizar as proteínas. O isolamento seletivo de biomoléculas ocorre através das propriedades dessas de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos. Na presença de elevadas

concentrações de sal, a matriz da coluna impede a passagem de porções das proteínas hidrofóbicas. Pode-se controlar a separação de diferentes proteínas através de um gradiente.

A matriz utilizada foi a *Octyl Sepharose 4 fast flow* (Amersham), que foi acomodada em uma coluna de 8,5 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato (100 mM pH 7,0). Posteriormente a aplicação da amostra foi realizada um gradiente linear de NH_4SO_2 , formado através da combinação gradual do tampão fosfato com um tampão fosfato com 1M de NH_4SO_2 . Foi também adicionada a amostra uma quantidade suficiente de NH_4SO_2 para que esta ficasse com uma concentração de 1M. Para este experimento foi conectada a coluna uma bomba de vácuo (Pump P-1, Pharmacia), favorecendo a entrada da amostra e do tampão com o gradiente. Foram coletadas 25 frações de 1,5 mL e determinada a $A_{280\text{nm}}$ e atividade de cromo redutase em cada uma destas frações.

3.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise da amostra quanto a pureza e peso molecular foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras da fração precipitada com sulfato de amônio, a fração da cromatografia de gel filtração e a fração da cromatografia de interação hidrofóbica foram precipitadas com ácido tricloro acético 10%, lavadas com acetona P.A. e ressuspendidas em 50 μL de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol 1% de Coomassie). A cada uma das amostras foi adicionado 10% de 2-

mercaptoetanol para romper as ligações de pontes de dissulfeto causando a desnaturação da proteína, e estas colocadas em banho-maria a 100°C, por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 7% e a eletroforese foi realizada em cuba eletroforética com corrente de 20 mA. A coloração foi realizada com a imersão do gel em solução contendo *Blue Coomassie* R-250 a 1%, metanol 40%, ácido acético 10%, água destilada 50%, ficando nesta solução até o aparecimento das bandas. **O marcador de peso molecular é composto de miosina (200 kDa), beta-galactosidase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina (43 kDa) inibidor de tripsina Soybean (20 kDa), lisozima (14 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).**

3.11.3 Determinação da temperatura e pH ótimos de atividade enzimática

Com a fração de maior atividade, na precipitação com sulfato de amônio foi avaliado o efeito da temperatura e do pH na atividade da enzima precipitada. Foram avaliadas as temperaturas de 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C. Para o teste de pH avaliou-se a atividade de cromo redutase no tampão fosfato 50 mM para pH 5,0, 6,0 e 7,0 e no tampão Tris-HCl 50 mM para pH 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0.

3.12 Técnicas analíticas

3.12.1 Determinação do cromo hexavalente

A detecção de cromo(VI) foi realizada por colorimetria a 540 nm com reagente de s-difenilcarbazona, segundo técnica de Bartlett & James (1979).

Nesta técnica a reação do Cr(VI) com o reagente de s-difenilcarbazida produz uma coloração rosa e possui limite de detecção de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Para as quantificações foram realizadas diluições de 1/10, devido ao limite de detecção da técnica.

3.12.2 Determinação de proteína

Para a quantificação de proteína foi utilizado o método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Nas frações de cromatografia a quantificação de proteína foi realizada em espectrofotômetro com $A_{280 \text{ nm}}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comparação de metodologias para isolamento de microrganismos resistentes

As amostras de solo foram submetidas a duas técnicas de isolamento para a obtenção de microrganismos resistentes. Na técnica direta, as amostras de solo foram diluídas em água estéril e plaqueadas em agar nutritivo com $K_2Cr_2O_7$. Nas placas houve grande desenvolvimento de fungos filamentosos, o que dificultou o isolamento de bactérias. Assim esta técnica apresentou baixa eficiência neste estudo, uma vez que o objetivo era isolar bactérias resistentes a Cr(VI). Optou-se então pela utilização de outra forma de isolamento: a técnica de enriquecimento. Nesta, as amostras de solo foram colocadas em caldo nutritivo com $K_2Cr_2O_7$ e realizado quatro transferências antes do plaqueamento. Das cinco amostras de solo, foram isoladas 20 colônias de bactérias morfologicamente distintas (Tabela 1). Esta técnica de isolamento tem se mostrado eficiente para o isolamento de microrganismos resistentes a cromo, em solos com histórico de contaminação (Krishna & Philip,

2005; Bader, et al., 1999, Camargo et al., 2005) e em lodo industrial (Cheung & Gu, 2003). No presente trabalho, foi obtido um número significativo de bactérias resistentes a partir das amostras, tendo em vista que menos de 10% das bactérias presentes no solo são culturáveis.

TABELA 1: Concentração de cromo total nas amostras de solo e quantidade de bactérias resistentes a 500 mg L⁻¹ de Cr(VI) (K₂Cr₂O₇), isoladas em cada amostra.

Amostras de solo	Cromo total (mg L⁻¹)	Bactérias resistentes isoladas
1	344	3
2	355	2
3	835	5
4	466	2
5	510	8

Pouco se sabe sobre as características metabólicas e a atividade enzimática dos organismos resistentes a cromo, assim o isolamento destes microrganismos a partir de solo contaminado é uma possibilidade para o desenvolvimento de estudos que visem esclarecer sua interação com os poluentes, e desta forma aplicá-los em processos de biorremediação. Pal & Paul (2004) descreveram o isolamento de 34 bactérias resistentes a cromo, utilizando metodologia do isolamento direto, com diluição da amostra de solo e plaqueamento em agar, com 200 mg L⁻¹ de K₂Cr₂O₇. A concentração mais baixa de Cr(VI) propiciou o maior desenvolvimento de bactérias, porém estas apresentaram resistência apenas a baixas concentrações de Cr(VI).

A amostra de solo com 510 mg L⁻¹ de cromo total (amostra 5) apresentou o maior número de bactérias resistentes, equivalente a 5 isolados ou 40% dos obtidos. As amostras de solo com maior concentração de cromo total (amostras 5 e 3) apresentaram um número maior de isolados (13 ou 65%)

se comparados com as amostras de concentração mais baixas (amostras 1,2 e 4), onde foram isolados apenas 7 bactérias o equivalente a 35% das obtidas. Isto indica que a presença de altas concentrações de cromo podem ter exercido pressão seletiva no sentido de selecionar os organismos resistentes a este metal que foi adicionado ao solo.

4.2 Caracterização morfológica dos isolados

As características morfológicas das colônias de bactérias obtidas a partir de solo contaminado com cromo são apresentados na Tabela 2. A partir das características morfológicas das colônias de bactérias resistentes foi possível observar diferenças morfológicas entre os isolados indicando se tratar de diferentes gêneros.

TABELA 2: Características morfológicas das colônias das bactérias resistentes a 500 mg L^{-1} de Cr(VI) ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) isolados de solo contaminado com cromo.

Isolados	Forma	Elevação	Bordos	Estrutura	Cor
1	Puntiforme	Achatada	Ondulados	Granulosa	Incolor
2	Circular	Elevada	Lisos	Lisa	Pigmentada
3	Irregular	Ondulada	Ondulados	Rugosa	Pigmentada
4	Irregular	Ondulada	Lobados	Rugosa	Incolor
5	Irregular	Achatada	Ondulados	Lisa	Incolor
6	Irregular	Convexa	Lobados	Rugosa	Pigmentada
7	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Pigmentada
8	Puntiforme	Elevada	Ondulados	Granulosa	Pigmentada
9	Puntiforme	Achatada	Ondulados	Granulosa	Incolor
10	Circular	Convexa	Ondulados	Lisa	Pigmentada
11	Irregular	Achatada	Ondulados	Lisa	Incolor
12	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Pigmentada
13	Irregular	Convexa	Lobados	Rugosa	Incolor
14	Puntiforme	Elevada	Ondulados	Granulosa	Incolor
15	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Pigmentada
16	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Pigmentada
17	Puntiforme	Achatada	Ondulados	Granulosa	Incolor
18	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Pigmentada
19	Circular	Elevada	Lisos	Lisa	Pigmentada
20	Puntiforme	Elevada	Ondulados	Granulosa	Pigmentada

4.3 Crescimento e atividade redutora do Cr(VI) pelos isolados

Para selecionar as bactérias mais eficientes na redução do cromo(VI), os 20 isolados foram crescidos em caldo nutritivo com $K_2Cr_2O_7$ e avaliadas a densidade ótica e a concentração final de Cr(VI) presente no caldo de nutritivo, após 24 horas de crescimento (Tabela 3).

TABELA 3: Redução do cromo pelas bactérias isoladas após 24 horas de crescimento em caldo contendo 250 mg L^{-1} de Cr(VI) (K_2CrO_7).

Isolados	Amostra de solo	Concentração restante de Cr(VI) (mg L^{-1})	Redução (%)	Densidade ótica ($A_{600\text{nm}}$)
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	-	-

Em todos os testes foram utilizados caldos sem a presença de microrganismo (controle), para verificar a ocorrência de redução não biológica,

porém isto não foi observado em nenhum experimento. Para as análises de densidade ótica e concentração de Cr(VI) foram realizadas diluições de 1/10, devido ao limite de detecção da técnica de s-difenilcarbazida.

Entre os isolados, apenas três apresentaram redução do cromo abaixo de 10% do inicial (Tabela 3), onze isolados apresentaram redução acima de 15 % e seis reduziram acima de 50 % do Cr(VI), ou seja, reduziram mais de 125 mg L⁻¹ em 24 horas. Os isolados que apresentaram a maior densidade ótica após 24 horas de crescimento em caldo com K₂Cr₂O₇ foram os isolados 6, 12 e 20, e os que apresentaram menor crescimento foram os isolados 4, 7, 17 e 19. Os outros isolados apresentaram um valor similar de DO. Assim, as maiores percentagens de redução do Cr(VI) foram 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.

É possível observar com este teste que as bactérias foram capazes de tolerar esta concentração de cromo, porém apresentam mecanismos diferentes de tolerância, uma vez que nem todas foram capazes de reduzir o Cr(VI) como observado nos isolados 4, 7 e 19. Entre os mecanismos de resistência a elevadas concentrações de cromo pode-se citar o acúmulo intracelular, que foi observado em muitos fungos filamentosos e bactérias (Dönmez & Koçberber, 2004; Vala et al., 2004) e a baixa absorção (Betzabe et al., 2002). O mecanismo de redução enzimática do Cr(VI) a Cr(III) tem sido observado em

bactérias, sendo associado a presença de enzimas redutases (Camargo et al., 2003b; Dermou et al., 2005). Os isolados 6, 11, 12, 16, 18 e 20 foram os que apresentaram maior capacidade de redução do Cr(VI), sendo selecionados para outros testes.

O isolamento de organismos resistentes a Cr(VI) tem sido relatado por diversos autores. Pal & Paul (2004) isolaram microrganismos resistentes de solo não contaminado com cromo. Porém estes microrganismos foram capazes de crescer somente em meio sólido contendo baixas concentrações de Cr(VI). Os organismos mais tolerantes descritos na literatura possuem a característica de terem sido isolados a partir de locais contaminados com cromo (McLean & Beverige, 2001; Pattanapitpaisal et al., 2001; Camargo et al., 2003a). A forma de redução do Cr(VI) resistência pode ser um mecanismo natural do microrganismo, entretanto em locais contaminados este mecanismo provavelmente seja mais eficiente em vista da pressão de seleção exercida pelo ambiente nas comunidades microbianas ali presentes. Apesar da alta toxicidade do cromo, tem sido observado que alguns microrganismos são tolerantes a este metal. Este fato pode favorecer seu desenvolvimento em um ambiente como o solo em que a microbiota está em constante competição.

4.4 Avaliação das condições ótimas para a redução do cromo(VI)

Os seis isolados mais eficientes na redução do Cr(VI) foram selecionados para avaliar sua resistência a concentrações crescentes de Cr(VI), assim como o tempo de redução. Para avaliar o tempo de redução em

baixas concentração de cromo(VI) as bactérias foram inoculadas em caldo nutritivo contendo 2 mg L^{-1} de Cr(VI). A concentração de Cr(VI) presente e a DO foram determinados nos períodos de 0, 3 e 6 horas, sendo realizadas diluições de 1/10 (Figura 1). Todos os isolados apresentaram entre 3 e 6 horas de incubação um rápido aumento da DO e redução do Cr(VI).

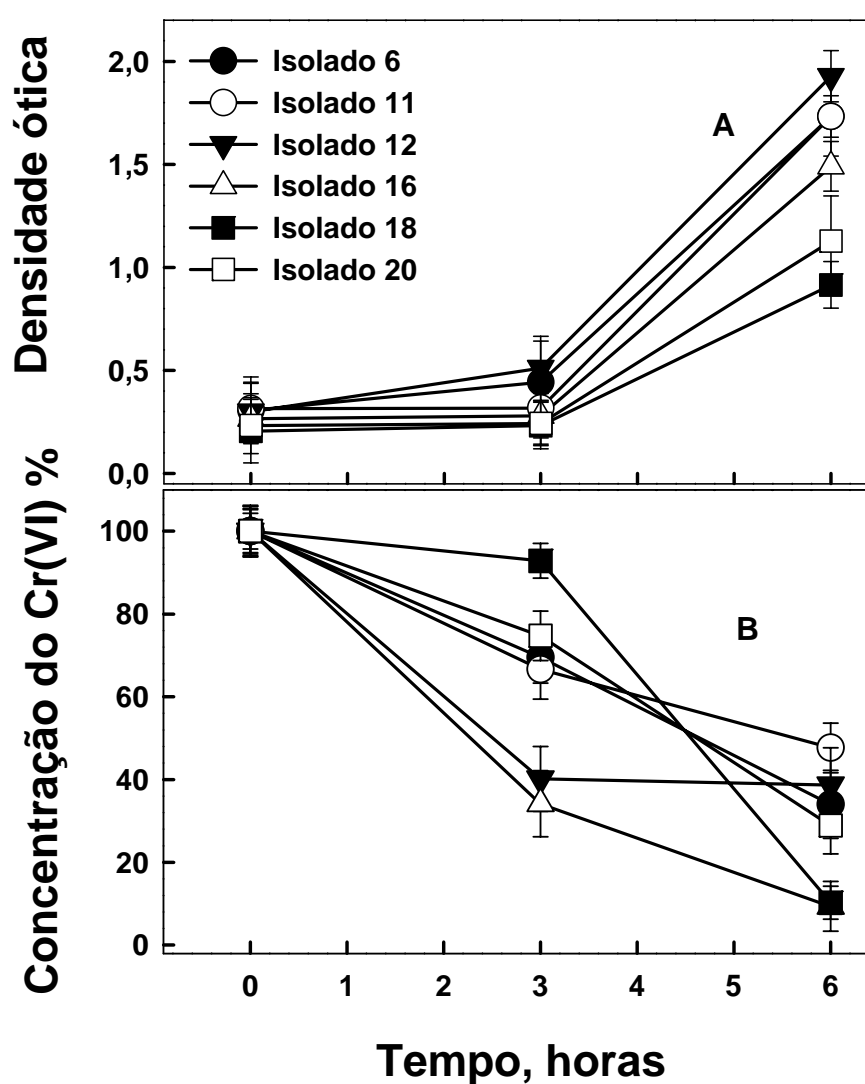


FIGURA 1: Crescimento (A) e redução do Cr(VI) (B) pelos isolados em caldo nutritivo com 2 mg L^{-1} de Cr(VI) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

A curva de crescimento dos isolados foi marcada por uma fase de latência nas primeiras horas de incubação, após este período todos os isolados apresentaram uma fase logarítmica, sendo que os isolados que atingiram a maior e a menor DO foram o 12 e o 18, respectivamente. Após três horas de incubação foi possível verificar que a DO não havia atingido a fase logarítmica, porém houve redução do Cr(VI) por todos os isolados. Os isolados 16 e 18 foram capazes de reduzir praticamente 100% do cromo adicionado ao caldo nutritivo. Sook & Choi, (1997) também verificaram rápida redução do Cr(VI) realizada por *Pseudomonas aeruginosa* HPO14, porém a redução nunca atingiu limites não detectáveis com a técnica de s-difenilcarbazona.

O isolado 18 apresentou a menor DO após 6 horas de incubação. Foi observado por Pattanapitpaisal et al. (2001) em estudo com *Microbacterium* sp. que a diminuição da concentração do cromo nem sempre acompanha o crescimento bacteriano, sendo que este organismo reduzia o cromo presente no meio, mesmo sem haver elevado crescimento celular.

Os microrganismos resistentes a cromo possuem diferentes mecanismos de tolerância e nem sempre os organismos são capazes de realizar a redução do Cr(VI). Outras formas de resistência já foram demonstradas como a baixa absorção, a produção de metalotioneína e o acúmulo intracelular (Blindauer et al., 2001). Estes mecanismos podem fazer com que a concentração de cromo diminua no caldo de nutritivo sem que haja a precipitação do Cr(III) no meio externo. Desta 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.

Na concentração de 100 mg L⁻¹ de Cr(VI), as análises foram realizadas após 0, 12 e 24 horas de incubação. Houve redução do Cr(VI) e crescimento por todos os isolados, sendo este similar entre os isolados. Na fase de crescimento logarítmico ocorreu à redução total do cromo por todos os isolados avaliados (Figura 2).

O isolado 16 apresentou a menor densidade ótica após 24 horas e os isolados 6 e 20 apresentaram maior DO após este período de incubação. Em relação à atividade de redução do Cr(VI) todos apresentaram uma redução muito similar tanto no período de 12 quanto no de 24 horas de incubação, com exceção do isolado 6 que apresentou uma velocidade de redução um pouco menor que os outros isolados em 12 horas de crescimento.

Todos os isolados foram eficientes na redução desta concentração de Cr(VI). Foi observado por Laxman & More, (2002), que o *Actinomyces* por eles estudado, era capaz de crescer em meio contendo de 5 a 60 mg L⁻¹, sendo que quando incubados na concentração de 50 mg L⁻¹ apenas 50% do cromo foi reduzido mesmo após 48 horas de crescimento. Assim, os isolados deste trabalho mostraram-se mais eficientes na redução do Cr(VI), que o citado a cima.

Em concentrações mais elevadas de Cr(VI) foi possível observar que a coloração do meio que inicialmente era laranja, mudou para amarela, isto provavelmente se deve a atividade microbiana na transformação do Cr(VI) a Cr(III), resultando na formação de hidróxido de cromo no meio externo. Esta

observação foi também relatada por Bopp & Ehrlich (1988) e Komori et al. (1990).

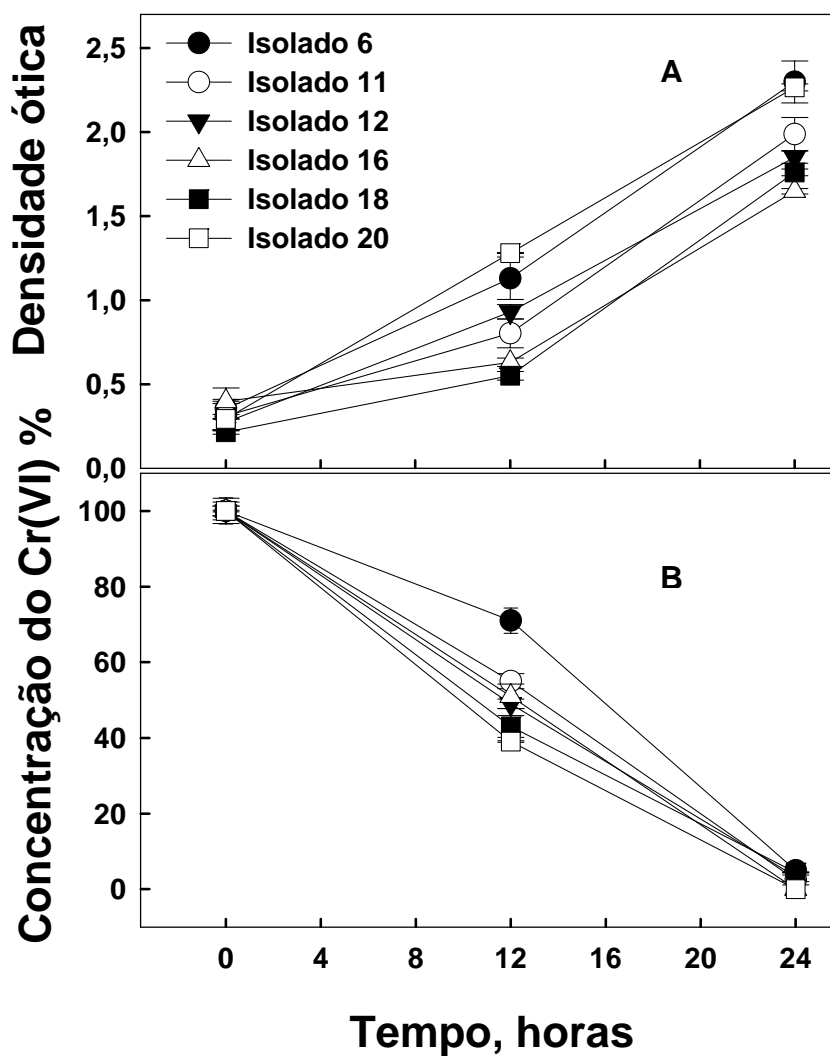


FIGURA 2: Crescimento (A) e redução do Cr(VI) (B) pelos isolados em caldo nutritivo com 100 mg L^{-1} de Cr(VI) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Na concentração de 250 mg L^{-1} de Cr(VI) foi observado crescimento mais lento de todos os isolados provavelmente pela maior concentração do cromo(Figura 3).

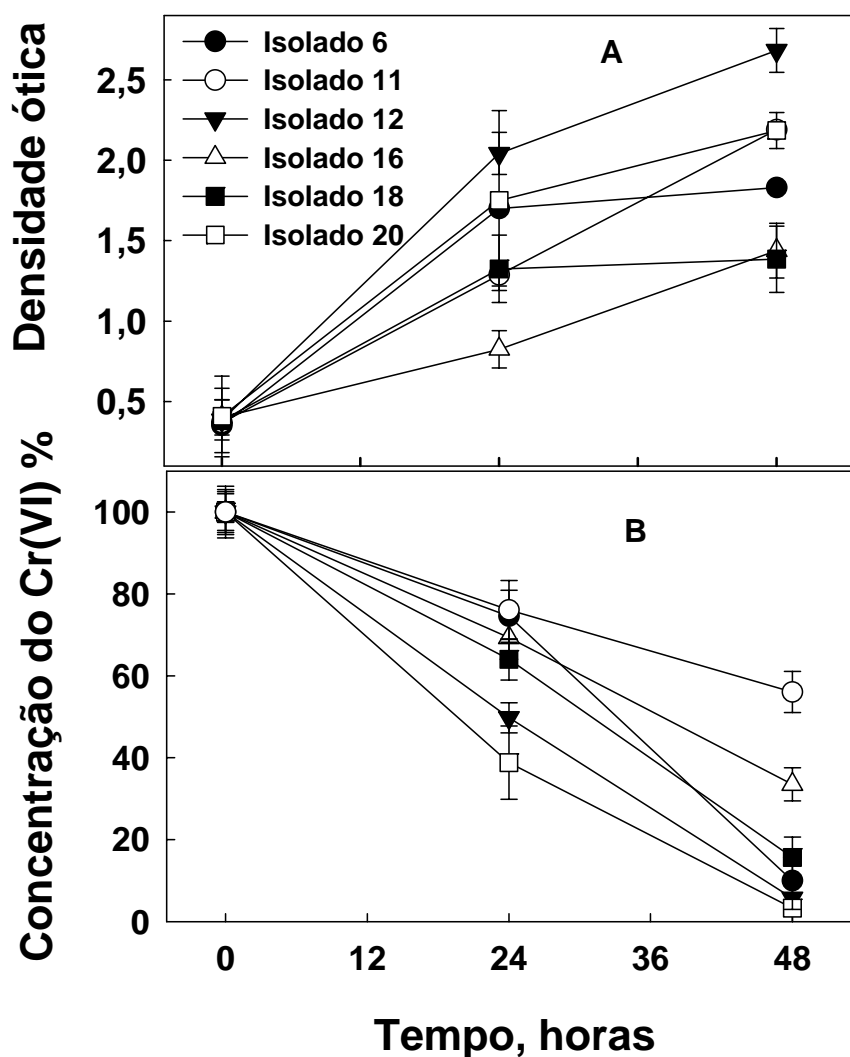


FIGURA 3: Crescimento (A) e redução do Cr(VI) (B) pelos isolados em caldo nutritivo com 250 mg L^{-1} de Cr(VI) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Nesta concentração nem todos os isolados foram capazes de reduzir 100% do cromo presente no caldo nutritivo. O microrganismo que apresentou maior crescimento foi o isolado 12 e as menores DO foram obtidas com os isolados 18 e 16. Em relação à redução do cromo, foi observada uma diminuição acima de 90% da concentração inicial para os isolados 6, 12 e 20.

Concentrações mais elevadas aumentam o tempo necessário para a redução total do Cr(VI), sendo que apenas o isolado 20 foi capaz de reduzir 100% do Cr em 48 horas. Komori et al. (1990) demonstraram em seu trabalho que em concentrações elevadas de Cr(VI) a velocidade de redução do cromo é proporcional a densidade de células. Alguns autores atribuem a velocidade da redução do cromo a sua concentração inicial (Shen & Wang, 1993; Wang & Xiao, 1995; Pattanapitpaisal et al., 2001), uma vez que a redução completa ocorre apenas em concentrações baixas do metal. Neste trabalho isto não foi observado uma vez que o isolado 20 foi capaz de reduzir totalmente 250 mg L^{-1} de Cr(VI) presente no caldo nutritivo. Devido à ocorrência de crescimento de todos os isolados nesta concentração, estes foram submetidos a uma concentração mais elevada visando determinar a concentração inibitória de crescimento.

O crescimento celular não foi inibido pela presença de 500 mg L^{-1} de Cr(VI), porém foi ainda mais lento que na concentração anterior testada [250 mg L^{-1} de Cr(VI)] e a quantidade de Cr(VI) reduzida menor (Figura 4). 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. Foi observada uma menor taxa de crescimento nas 12 primeiras horas, provavelmente pela diminuição da viabilidade celular, devido a toxidez do Cr(VI) que aumenta o tempo necessário para adaptação celular ou reparo do DNA.

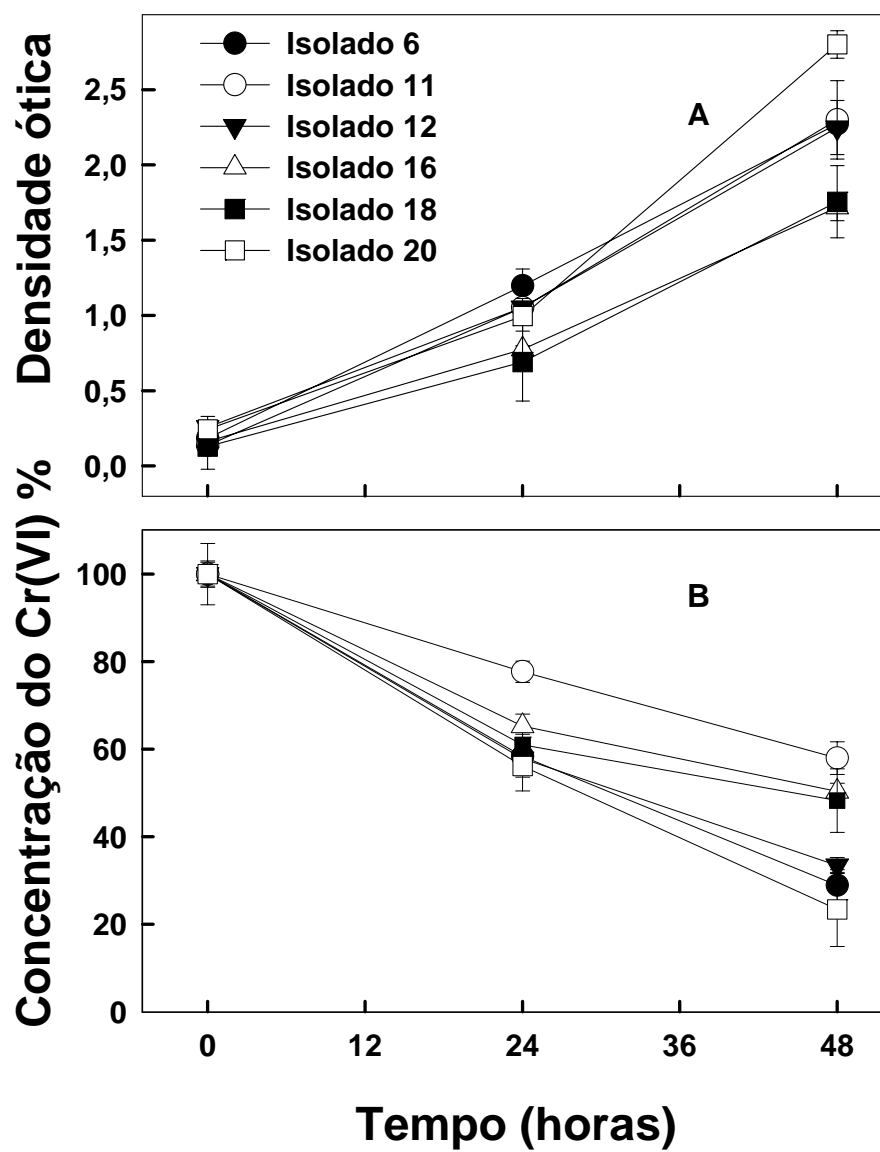


FIGURA 4: Crescimento (A) e redução do Cr(VI) (B) pelos isolados em caldo nutritivo com 500 mg L^{-1} de Cr(VI) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Após 24 horas de incubação, o crescimento não apresentou grande alteração em relação às concentrações mais baixas de Cr(VI), porém nenhum dos microrganismos avaliados foi capaz de reduzir 100 % do Cr(VI) presente no caldo nutritivo. Entre os isolados destaca-se o 20 que apresentou maior DO e redução do Cr(VI) sendo este reduzido a praticamente 80% da concentração inicial. O isolado 11 apresentou a menor redução, mas não a menor DO. Esta bactéria apresentou a segunda maior DO, demonstrando que é resistente a esta concentração, porém seu mecanismo de resistência talvez não tenha sido de redução.

Basu et al., (1997) relatam que a maioria dos microrganismos de solo do gênero *Actinomyces* por eles isolados apresentava resistência acima de 500 mg L⁻¹ de cromo, porém apenas em agar. Deve-se observar que estes isolados foram capazes de crescer nesta concentração em caldo, onde a toxicidade do cromo é maior por estar mais disponível e solúvel, sendo rapidamente transportada para o citoplasma celular.

Apenas três isolados foram capazes de crescer em caldo nutritivo contendo 750 mg L⁻¹ de Cr(VI) (Figura 5), sendo então esta concentração limitante para o crescimento dos outros isolados. Neste experimento as análises foram realizadas em um período de incubação de 48 e 96 horas.

Foi observado na avaliação após 96 horas uma menor redução do Cr(VI). O isolado 20 foi novamente o que apresentou maior capacidade de redução, porém ela foi de apenas 40 % da concentração inicial, não houve crescimento destes três isolados em concentrações mais elevadas. Entre os microrganismos estudados, a literatura relata a resistência as concentrações de

10 a 1500 mg L⁻¹ de Cr(VI) (Bopp et al., 1983; Losi and Frankenberger, 1994b; Basu et al., 1997; Cervantes et al., 2001; McLean & Beverige, 2001; Camargo et al., 2003b).

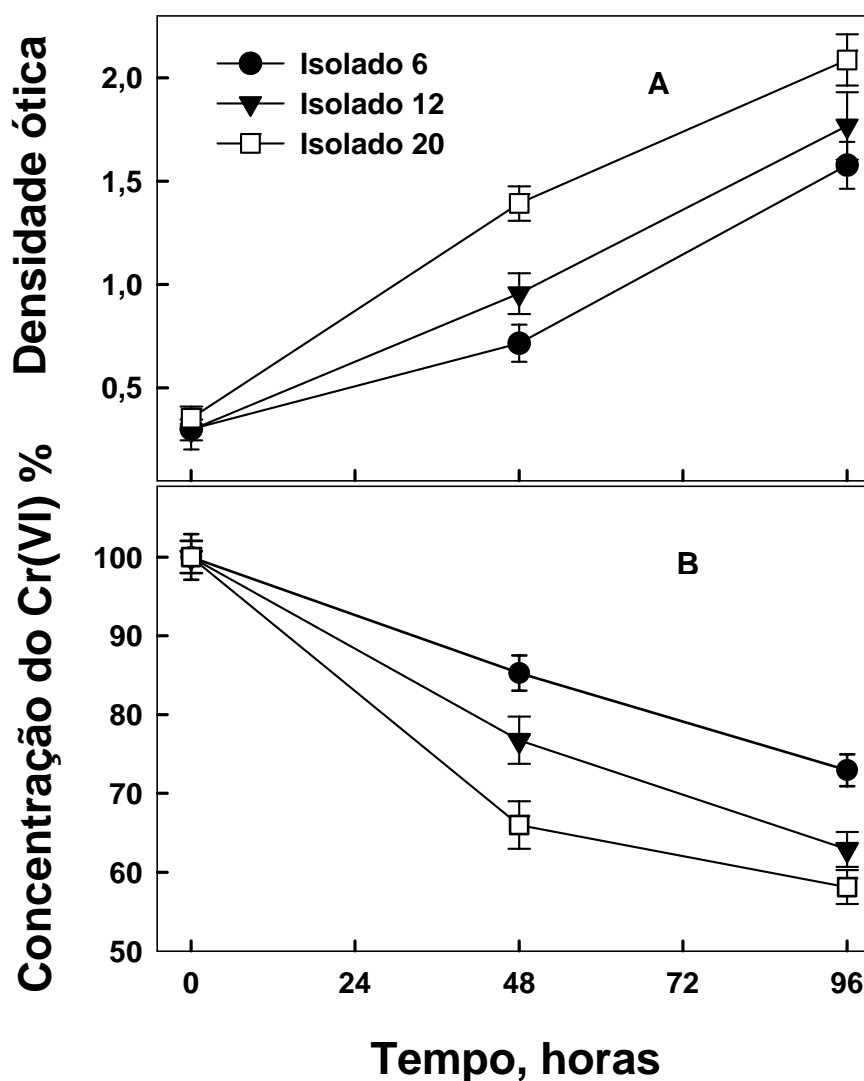


FIGURA 5: Crescimento (A) e redução do Cr(VI) (B) pelos isolados em caldo com 750 mg L⁻¹ de Cr(VI) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Alguns fatores influenciam a taxa de crescimento e a capacidade dos microrganismos em reduzir o Cr(VI), entre estes fatores foram testados pH do caldo nutritivo e a temperatura de incubação. De modo geral os isolados cresceram na faixa de 5,0 a 9,0 e reduziram o cromo na faixa de pH de 5,0 a 9,0 (Figura 6), demonstrando capacidade de adaptação às variações ambientais. Para esta adaptação o microrganismo deve ser capaz de manter o pH 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. Variações do pH no caldo nutritivo causaram efeito no crescimento dos isolados. Os pH 5,0 e 10,0 foram os que mais afetaram negativamente o crescimento das bactérias. A DO foi similar para todos os isolados em pH 6,0, sendo que o aumento do pH para valores de 7,0, 8,0 e 9,0 estimularam o crescimento dos isolados 20 e 11.

Os isolados que apresentaram maior sensibilidade às variações, em relação à redução do Cr(VI) foram o 11 e o 18. Este último isolado não foi capaz de reduzir 100% do cromo presente em nenhum pH. Os demais isolados apresentaram redução do Cr(VI) também em pH mais básicos, demonstrando adaptação a elevadas concentrações de H^+ . O isolado 20 reduziu o Cr(VI) em todos os pH, a exceção do pH 10,0, onde a transformação do cromo foi reduzida para todos os isolados.

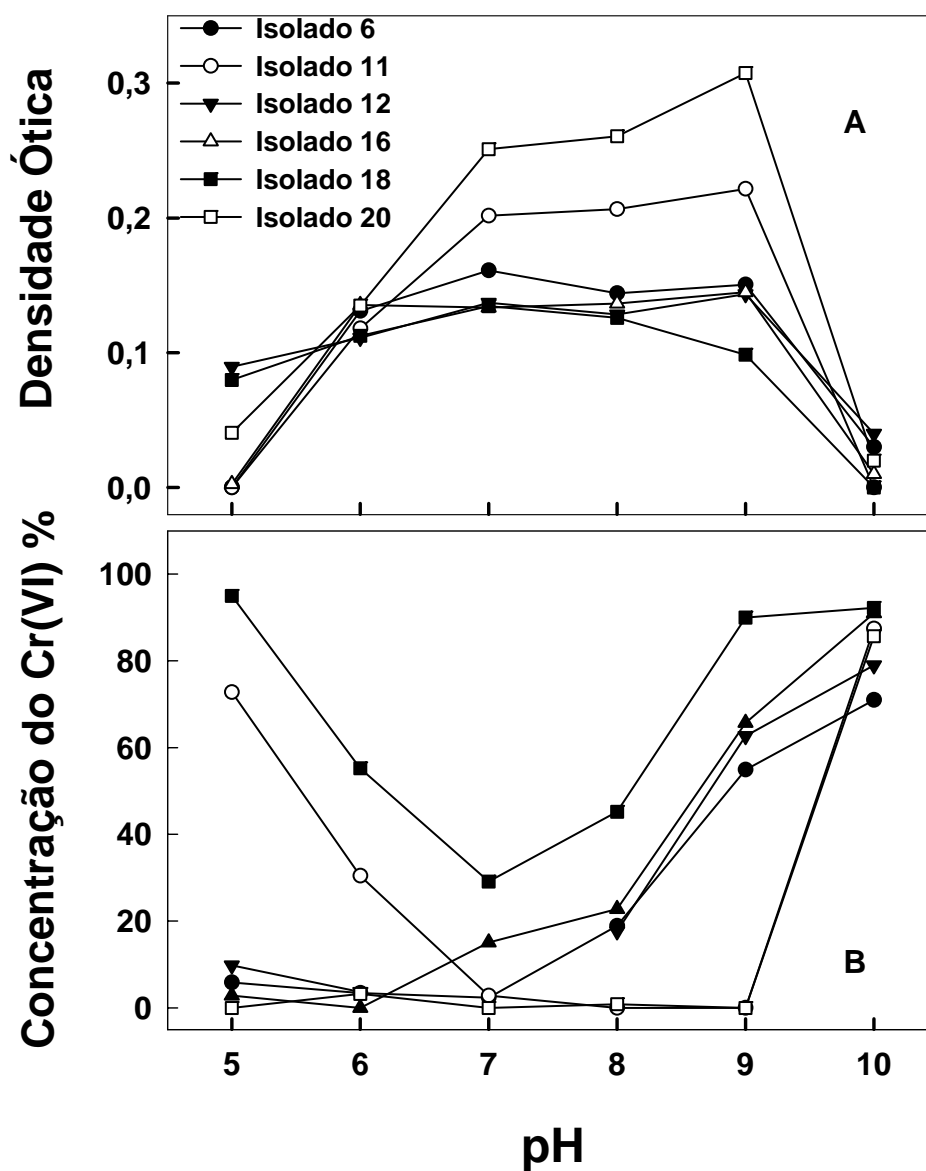


FIGURA 6: Influência do pH no crescimento celular (A) e na redução do cromo(VI) (B) presente no caldo nutritivo (50 mg L^{-1}) após 12 horas de incubação (dados são médias de duas repetições).

Wang et al. (1990) demonstraram que a bactéria redutora de cromo *Enterobacter cloacae* apresentou a redução somente em anaerobiose, sendo inibida a pH 5,0 e 9,0. Losi et al. (1994a), reportaram bactérias cromo

resistente, com seu crescimento e redução ótima em pH 7,0 e 7,8 sendo por eles observado que a variação do pH no caldo nutritivo tem grande efeito na redução do cromo. Foi observado neste trabalho e no de Camargo et al. (2003a) 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 um 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 vulnerável a fatores ambientais, sendo sua atividade inibida ou até destruída por calor excessivo ou variações no pH, sendo esta sensibilidade variável para cada enzima.

Para avaliar o efeito da temperatura no crescimento e redução do Cr(VI) foram testadas variações de 25, 30, 35 e 40°C (Figura 7). 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. Praticamente todos apresentaram as maiores DO nas temperaturas de 25, 30 e 35°C sendo que o isolado 18 apresentou baixa DO à temperatura de 25°C. Houve redução do Cr(VI) acima de 75% por todos os isolados nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Camargo et al. (2003a) também avaliaram os efeitos da variação de temperatura na redução do cromo, obtendo como

temperatura ótima para a redução do cromo(VI) de 30°C. Já Losi et al. (1994a) encontraram como temperatura ótima para seus isolados de 30 a 37°C.

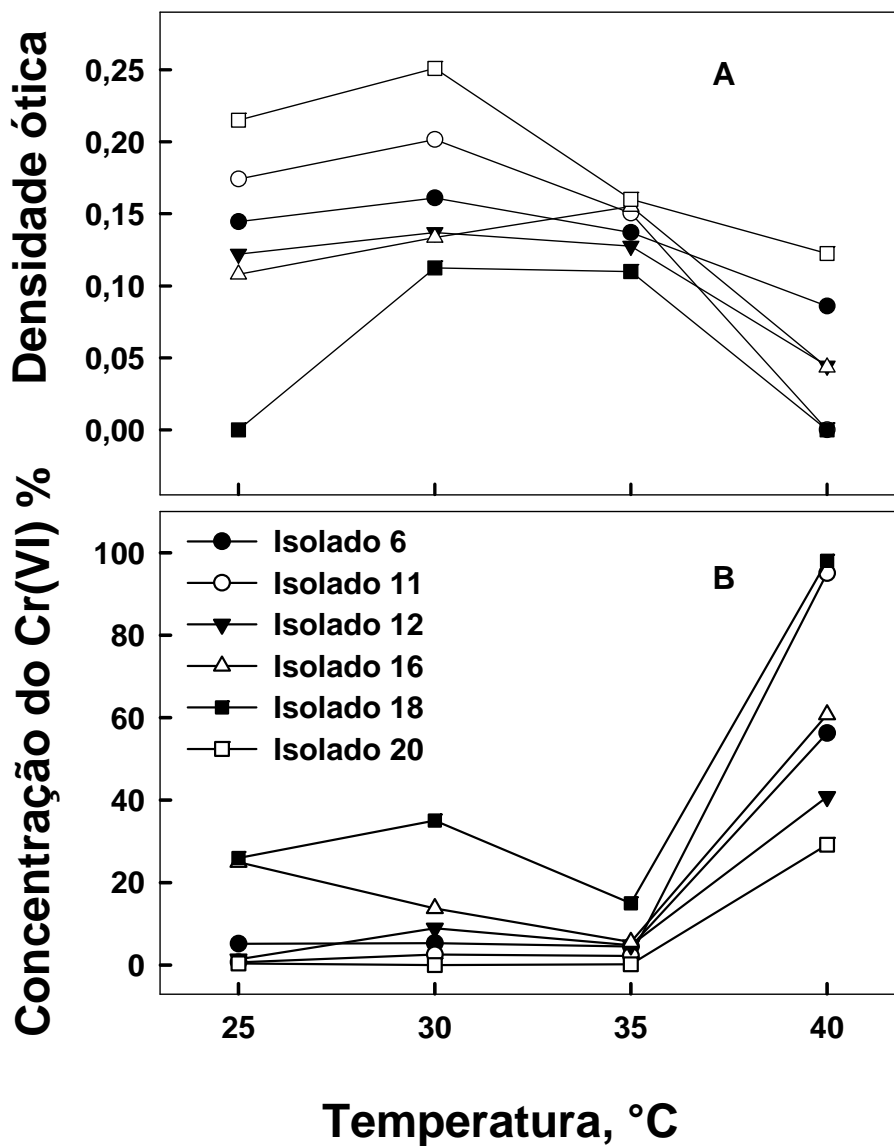


FIGURA 7: Influência da temperatura no crescimento celular (A) e na redução do cromo(VI) (B) presente no caldo nutritivo (50 mg L^{-1}) após 12 horas de incubação (dados são médias de duas repetições).

A temperatura é um importante fator para o crescimento microbiano, uma vez que todos os processos de crescimento celular são dependentes de reações químicas que são afetadas pela temperatura. Efeitos no crescimento microbiano afetam diretamente as reações enzimáticas necessárias para a redução do Cr(VI). Porém as variações de temperatura tiveram menor influência na atividade de redução do cromo se comparadas com as variações de pH. O isolado 18 foi o mais sensíveis a variações de pH e temperatura, não apresentou redução significativa de cromo nos pH 5,0, 9,0 e 10,0 nem em temperatura de 40°C, tendo como condições ótimas pH 7,0 e 35°C.

A capacidade de redução de 100% do cromo presente no caldo nutritivo do Cr(VI) pelo isolado 20 foi observado nos pH de 5,0 a 9,0, (neste último pH foi observada a maior DO) sendo inibida sua atividade de redução apenas em pH 10,0. A atividade ótima de redução do Cr(VI) deste isolado ocorreu em pH 7,0, 8,0 e 9,0 e na temperatura e 25 a 35°C. Demonstrando grande adaptação a estes dois fatores ambientais, o que o torna promissor para futuros estudos de biorremediação.

Através dos experimentos realizados até o momento foi possível observar que o tempo de redução do Cr(VI) esta estreitamente relacionada com a concentração deste metal e com fatores ambientais tais como pH e temperatura. A Tabela 4 resume as condições ótimas de temperatura e pH, assim como a capacidade de cada isolado na redução do Cr(VI) em sua condição ideal.

É de grande importância a presença de microrganismos que possam atuar reduzindo o Cr(VI) em uma ampla faixa de pH, visto que muitos efluentes

contaminados com este metal podem apresentar valores de pH bastante amplos. Desta forma, a redução biológica pode ser uma vantagem por ocorrer em diferente pH e temperatura, além de não necessitar de grandes quantidades de energia ou reagentes químicos.

TABELA 4: Redução de 50 mg L⁻¹ de Cr(VI) nas condições ótimas de crescimento.

Isolados	pH do caldo nutritivo	Temperatura de incubação °C	Atividade de redução do Cr(VI) %
6	7,0	25-35	100
11	8,0-9,0	25-35	100
12	7,0	25-35	100
16	6,0	35	100
18	7,0	35	65
20	5,0-9,0	25-35	100

4.5 Efeito de íons e doadores de elétrons sobre a atividade enzimática dos isolados

Para este teste utilizou-se o extrato celular dos isolados para a avaliação do efeito de íons na atividade enzimática de redução do Cr(VI). Como doadores de elétrons foram testados glicose (0,5 mM) e glicerol (1% v/v) e como inibidores, os íons de Cu⁺², Mg⁺², Hg⁺², Mn⁺², Na⁺ (1 mM) e NH⁺⁴ (10 mM). Foram testados os seis isolados mais eficientes na redução do cromo e o *Bacillus* sp. ES29, isolado por Camargo et al. (2003a).

Os isolados apresentaram características diferentes quanto a redução do Cr(VI) na presença de íons. A maioria os isolados foram estimulados por Cu e a atividade de todos foi totalmente inibida por NH⁺⁴. Este inibidor foi testado para avaliar sua interferência na atividade enzimática porque seria utilizado posteriormente para a purificação da enzima redutora de cromo,

sendo constatado neste teste que a presença de altas concentrações deste sal pode desestabilizar a enzima impedindo seu funcionamento. Os demais íons não estimularam a atividade dos isolados e alguns foram inibitórios.

Foi verificada a dependência de NADH como doador de elétrons para a redução de Cr(VI) por todos os isolados. A exigência desta coenzima para a atividade enzimática tem sido relatada por diversos autores (Shen & Wang, 1993; Campos et al., 1995; Park et al., 2000; Woo et al., 2005). Segundo Suziki 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). Para avaliar a redução não enzimática, pela presença de NADH, foram feitas reações apenas com a adição da coenzima e na ausência do extrato celular, não sendo observada redução significativa de Cr(VI), o que indica que a atividade de redução do Cr(VI) é devida a ação de enzimas presentes no extrato celular dos isolados.

Na Figura 8 é possível observar o efeito dos doadores de elétrons e do cátion monovalente na atividade enzimática de redução do cromo pelos isolados. A adição de doadores de elétrons e a presença do cátion monovalente não inibiram a atividade enzimática do *Bacillus* sp. ES29. A presença do glicerol causou inibição na atividade enzimática dos isolados 6, 11, 12, 16, 18. Já a presença de glicose foi mais inibitória para o isolado 11, que causou perda de praticamente 80% da atividade, porém os isolados 6, 12, apresentaram uma inibição menor do que a causada pelo glicerol. A presença de doadores de elétrons estimulou a atividade enzimática para o isolado 20 e

para o *Bacillus* sp. ES29. A adição do cátion monovalente afetou negativamente a atividade de todos os isolados, sendo os mais sensíveis a este íon os isolados 11 e 12. Esta forte inibição da atividade pela presença de sulfato de sódio, não foi observada por Keyhan et al. (2003), onde a atividade do isolado avaliado por estes pesquisadores não sofreu alteração pela adição deste íon.

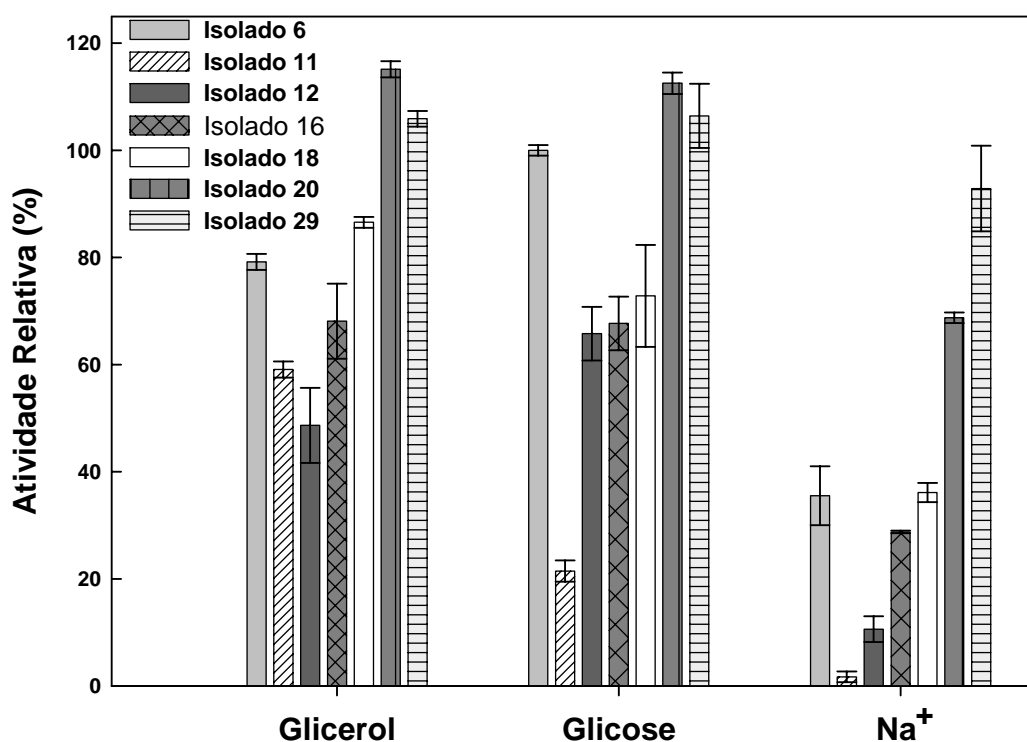


FIGURA 8: Efeito dos doadores de elétrons e do cátion monovalente na atividade enzimática de redução do cromo (VI). Os valores expressos em porcentagem são referentes a atividade do extrato celular de cada isolado considerado como 100% (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Na Figura 9 são apresentados os efeitos causados na atividade enzimática dos isolados pela adição de cátions divalentes. Em relação ao *Bacillus* sp. ES29, esta bactéria apresentou a maior atividade de redução

enzimática e a menor inibição pela presença dos íons testados se comparado com os outros 6 isolados. A presença sulfato de cobre estimulou a atividade de redução, sendo esta 60% maior que o controle. Este estímulo foi observado com adição de cloreto de cobre por Camargo et al. (2003b) e Keyhan et al. (2003), onde a atividade de redução do Cr(VI) pelo microrganismo avaliado foi estimulado pela adição de sulfato e cloreto de cobre.

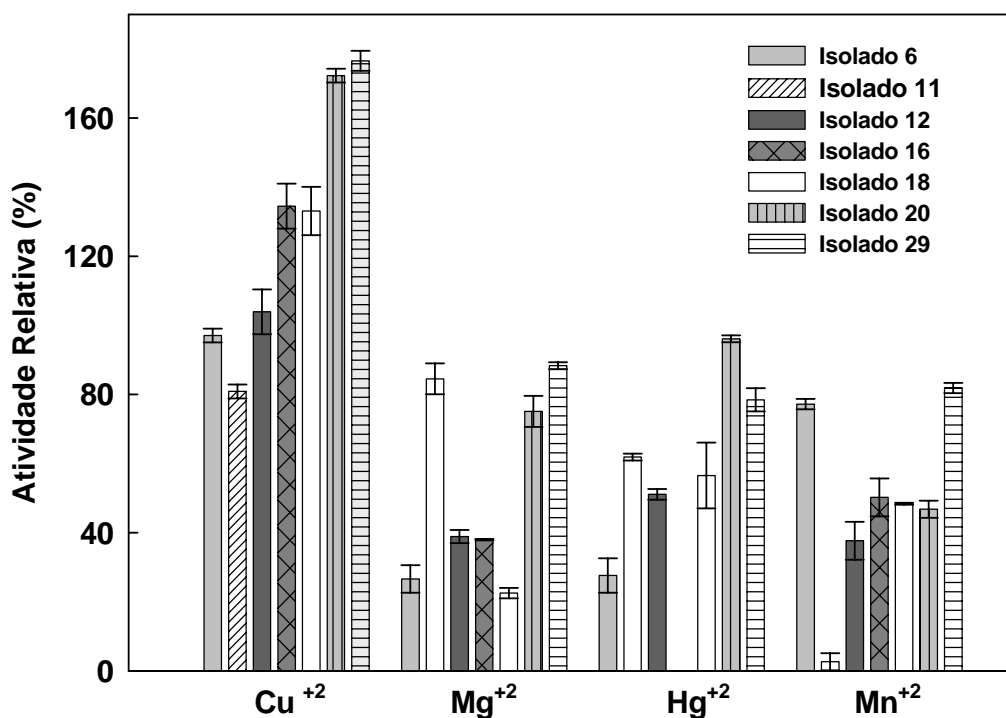


FIGURA 9: Efeito dos cátions divalentes na atividade enzimática de redução do cromo (VI). Os valores expressos em porcentagem são referentes a atividade do extrato celular de cada isolado considerado como 100% (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

A atividade de redução do Cr(VI) pelo isolado 6 não foi estimulada pela presença de íons, as maiores inibições ocorreram pelo mercúrio e magnésio (72%) seguidas por sódio e manganês, já a presença de íon Cu não

apresentou efeito na atividade, isto também foi observado por Park et al. (2000), onde a adição de 5 a 25 mM deste íon não afetava atividade de redução do Cr(VI) pelos seus isolados. Isto indica que a enzima responsável pela redução do Cr(VI) no isolado 6 possa ser diferente daquela presente no *Bacillus* sp. ES29. Conforme estudos de Park et al. (2000), Ackerley et al. (2004) e Wood et al. (2005) as bactérias resistentes a Cr(VI) apresentaram diferentes enzimas com capacidade de redução do cromo, sendo observado por estes pesquisadores a presença de flavoproteínas em *Pseudomonas putida* e *Escherichia coli*, quinona redutase em *Pseudomonas putida* e N-etilamina redutase em *E. coli*, respectivamente, sendo estas atribuídas a atividade de redução do Cr(VI).

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. A inibição da atividade pela presença de íons foi relatada por Pal & Paul (2004), estes pesquisadores observaram grande diminuição da atividade do *Bacillus sphaericus* AND303 na presença de cátions divalentes. Ao contrário dos demais isolados, a presença do Cu inibiu a atividade do isolado 11. Ohtake et al. (1987) demonstraram o efeito inibitório deste íon na atividade de cromo redutase, onde a adição de 0,5 mM de Cu diminuiu a redução do Cr(VI) em 32% no organismo por eles avaliado, a redução estava associada a uma proteína de membrana que atuava em condição anaeróbia. Estes resultados confirmam a idéia da existência de vários tipos de enzimas com capacidade de redução do Cr(VI).

A atividade de redução do cromo pelo extrato celular do isolado 12 foi inibida pela presença dos íons, com exceção do Cu que praticamente não alterou a atividade enzimática. Um pequeno aumento na atividade enzimática também foi observada por e McLean & Beveridge (2001) em bactérias do gênero *Pseudomonas* com a adição de 0,4 mM deste íon na reação.

A atividade enzimática dos isolados 16 e 18 foi similar, houve estímulo pela presença de Cu e inibição pelo mercúrio, sendo que para o isolado 16 a presença deste íon suprimiu a atividade enzimática. Porém a inibição do isolado 18 foi menor por Hg do que a causada pelo Mg. A forte inibição causada pelo Hg e pelo sulfato de amônia era esperada para todos os isolados, uma vez que o sulfato de amônia pode desestruturar a conformação das proteínas o que resulta no rompimento das pontes de hidrogênio e dissulfeto, que dão a conformação tridimensional das proteínas. O Hg tem forte atração por grupamentos com SH o que resulta na inativação da proteína por alterar seu centro ativo. Este efeito inibitório foi relatado em *Pseudomonas putida* por Ishbashi et al. (1990).

O isolado 20 apresenta grande capacidade de resistência e redução do Cr(VI). Verifica-se que esta atividade foi levemente inibida pela presença de todos os 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 compõem 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 glutathione 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 em danos a célula.

4.6 Identificação de gênero dos isolados mais eficientes

Foram identificados os gêneros dos seis isolados mais eficientes na redução do Cr(VI), através dos testes bioquímicos propostos por Macffadin (1980) apresentados na Tabela 5. Tendo em vista que estes isolados foram obtidos a partir de amostras de solo, a identificação das espécies torna-se difícil devida a pouca informação sobre as características bioquímicas para a identificação de microrganismos do solo.

O isolado 6 foi identificado como pertencente ao gênero *Aeromonas*. As bactérias do gênero *Aeromonas* também têm sido relatadas como degradadoras de compostos orgânicos. Goud et al. (2003) relataram o isolamento de bactérias deste gênero a partir de resíduos da indústria de

petróleo e caracterizaram sua capacidade de metabolizar compostos orgânicos e resistência a metais pesados como cobalto, cobre, mercúrio, molibdênio, zinco e chumbo. Miranda & Castillo (1998) isolaram 172 bactérias deste gênero a partir de água de esgoto. Foi avaliada a ampla resistência destes isolados a antibióticos e também ao cromo. Loukidou et al. (2004), testaram a retirada de Cr(VI) de um efluente utilizando um sistema de bioreator 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 pesados. Não há relato na literatura de bactérias redutoras do cromo(VI) pertencentes ao gênero *Xanthobacter* que refere-se ao isolado 12. Alguns trabalhos associam este gênero a bactérias degradadores de poluentes orgânicos (Schwarzer et al., 1998; Inguva et al., 1999).

Dois isolados, 16 e 18, são pertencentes ao gênero *Agrobacterium*. Este gênero é conhecido por apresentar alguns microrganismos patogênicos, causando infecções de raízes. Wang & Xiao (1995) isolaram uma bactéria identificada como *Agrobacterium radiobacter* capaz de reduzir aerobicamente o cromo(VI), utilizando a glicose como doador de elétrons. Porém neste trabalho as duas bactérias deste gênero não utilizaram a glicose como doador de elétrons, sendo sua atividade inibida pela presença de 0,5 mM deste carboidrato.

TABELA 5: Testes morfológicos e bioquímicos para identificação de gênero dos isolados resistentes a Cr(VI).

Testes bioquímicos	Isolados					
	6	11	12	16	18	20
Coloração de gram	- ¹	+ ²	-	-	-	+
Coloração de esporos	-	-	-	-	-	+
Ácido micólico	-	-	-	-	-	-
Prova da gelatinase	+	-	-	-	+	+
Prova do amido	-	-	-	-	-	+
Prova da catalase	+	+	+	+	+	+
Produção de S ₂ H	-	-	-	-	-	-
Prova do indol	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	+	+	+	+	+
Prova da fenilalanina	-	-	-	-	-	-
Teste de oxidase	+	+	+	-	-	^β
Teste da glicose	O ⁴ / F ⁵	inerte	O	O	Inerte	O/F
Prova da Urease	+	-	+	-	-	-
Prova do nitrato	+	/	+	-	-	/
MacConkey	+ lac ⁶	-	+lac	+lac	+lac	-
VM	-	/	/	/	/	+
VP	-	/	/	/	/	+
Glicose	+f ⁷	+f	-	-	-	+f
Galactose	+f	-	-	-	-	+
Arabitol	+f	-	-	-	-	+
Xilose	+f	-	-	-	-	+
Manitol	+f	-	-	+	+	+
Frutose	+f	+	-	+	+	+
Sacarose	+f	-	-	-	-	+
Arabitol	+f	-	-	-	-	+
Gênero	<i>Aeromonas</i>	<i>Aureobacterium</i>	<i>Xanthobacter</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>

¹Resultado positivo, ²resultado negativo, ³teste não realizado, ⁴capaz de oxidar a glicose, ⁵capaz de fermentar a glicose, ⁶metabolização da lactose, ⁷fermentador da fonte de carbono.

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. Wang & Xiao (1995) relataram o isolamento do *Bacillus* sp. obtido a partir de um solo contaminado, sendo determinado sua atividade ótima de redução do Cr(VI) quando as células

eram incubadas a 30°C e pH 7,0. Campos et al. (1995), Garbisu et al. (1995) e Camargo et al. (2003a) também relatam a presença deste gênero em solos contaminados e a resistência a elevadas concentrações de cromo.

4.7 Crescimento e redução do cromo(VI) pelo *Bacillus* sp. ES29

Camargo et al. (2003a) isolaram a partir de solo contaminado bactérias capazes de crescer e reduzir Cr(VI) nas concentrações de 500 a 2500 mg L⁻¹. A bactéria capaz de crescer nesta elevada concentração de cromo foi identificada por seqüenciamento do gene *RNA16S* apresentando mais de 98% de similaridade ao gênero *Bacillus* sp. e recebeu a denominação de ES29. Nenhum dos 20 microrganismos isolados neste trabalho foi tolerante a estas concentrações, sendo este organismo o que apresenta maior atividade enzimática na redução do cromo(VI), dentre os testados, sendo portanto escolhido para as próximas avaliações.

Para avaliar o crescimento e a capacidade de redução do Cr(VI) pelo *Bacillus* sp. ES29 foram realizadas curvas de crescimento, onde foram adicionados 50 e 100 mg L⁻¹ de Cr(VI) (Figura 10).

Na presença de 50 mg L⁻¹ de Cr(VI) foi possível observar uma fase estacionária de crescimento até o período de 24 horas, concomitantemente ocorreu à rápida redução do cromo. Após a redução de 80% do cromo a curva entrou na fase de crescimento logarítmico. Comportamento similar foi observado na concentração de 100 mg L⁻¹ de Cr(VI), demonstrando que a maior atividade de redução do cromo ocorre antes da fase logarítmica, ou seja, o *Bacillus* sp. ES29 reduz a toxicidade do cromo no meio, o que lhe permite

aumentar a taxa de crescimento. Este comportamento torna esse microrganismo potencial para a biorremediação, por realizar a redução do Cr(VI) antes da fase exponencial de crescimento. Esta atividade de rápida redução e posterior crescimento exponencial já foi relatado por Pattanapitpaisal et al., (2001).

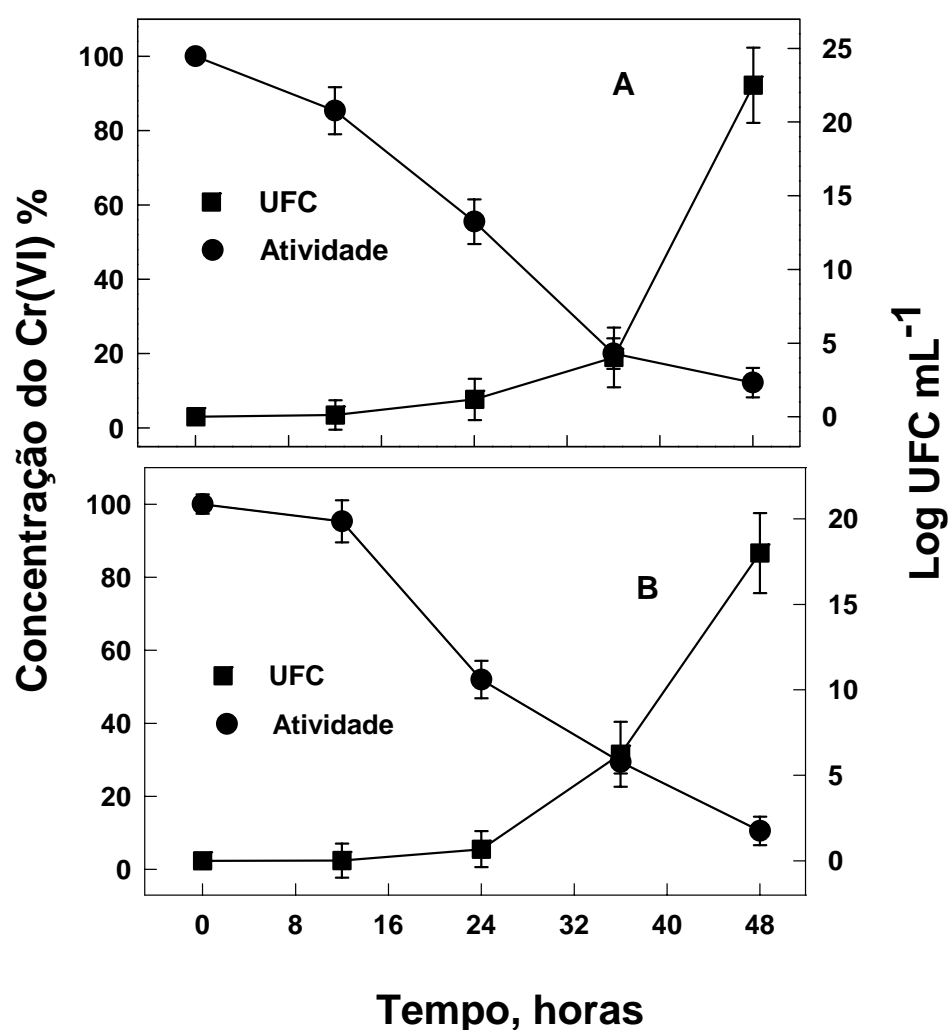


FIGURA 10: Crescimento e redução do cromo (VI) presente no caldo LB na concentração de 50 mg L⁻¹ (A) e 100 mg L⁻¹ (B) pelo *Bacillus* sp.

ES29 (dados são médias de três repetições e as barras representam o erro padrão).

Em ambas as concentrações houve a redução de praticamente 100% do cromo. O crescimento celular também não foi alterado sendo que nas duas concentrações o número de células, após 48 horas de incubação, foi praticamente o mesmo. Wang & Shen (1997) relataram que durante a redução do Cr(VI) havia um decréscimo na densidade ótica dos isolados, e que a presença de altas concentrações do metal podem ter sido tóxicas para as células devido a baixa capacidade metabólica de redução das células. A redução do Cr(VI) pelo microrganismo *Enterobacter cloacae* ocorre em maior velocidade quando as células entram na fase de crescimento logarítmico, ou seja para este microrganismo a redução é proporcional ao número de células (Wang et al., 1990).

Para avaliar se a produção da enzima é estimulada pela presença do cromo e avaliar o melhor tempo de incubação para obtenção da enzima foi realizado uma curva de crescimento e, em intervalos determinados, as células eram rompidas e avaliadas quanto à atividade de redução do Cr(VI). Conforme mostrado na Figura 11, o crescimento celular tendeu a ser menor onde havia a presença de cromo no caldo LB indicando que a presença do metal tendeu a reduzir a taxa de crescimento das células. A maior atividade de redução do Cr(VI) pelo extrato celular foi obtida após 16 horas de incubação das células, sendo este período utilizado para os próximos experimentos.

Foi possível observar aumento da atividade de redução quando as células eram crescidas em caldo LB com concentração baixa de Cr(VI), se comparado com aquelas que cresciam apenas em caldo LB. A presença do

romo pode ter estimulado a produção da enzima, neste caso poderia se tratar de uma enzima indutiva. A sua produção na ausência do cromo poderia ser explicada pelo fato de que as enzimas indutivas são produzidas em nível basal, mesmo na ausência do fator de indução.

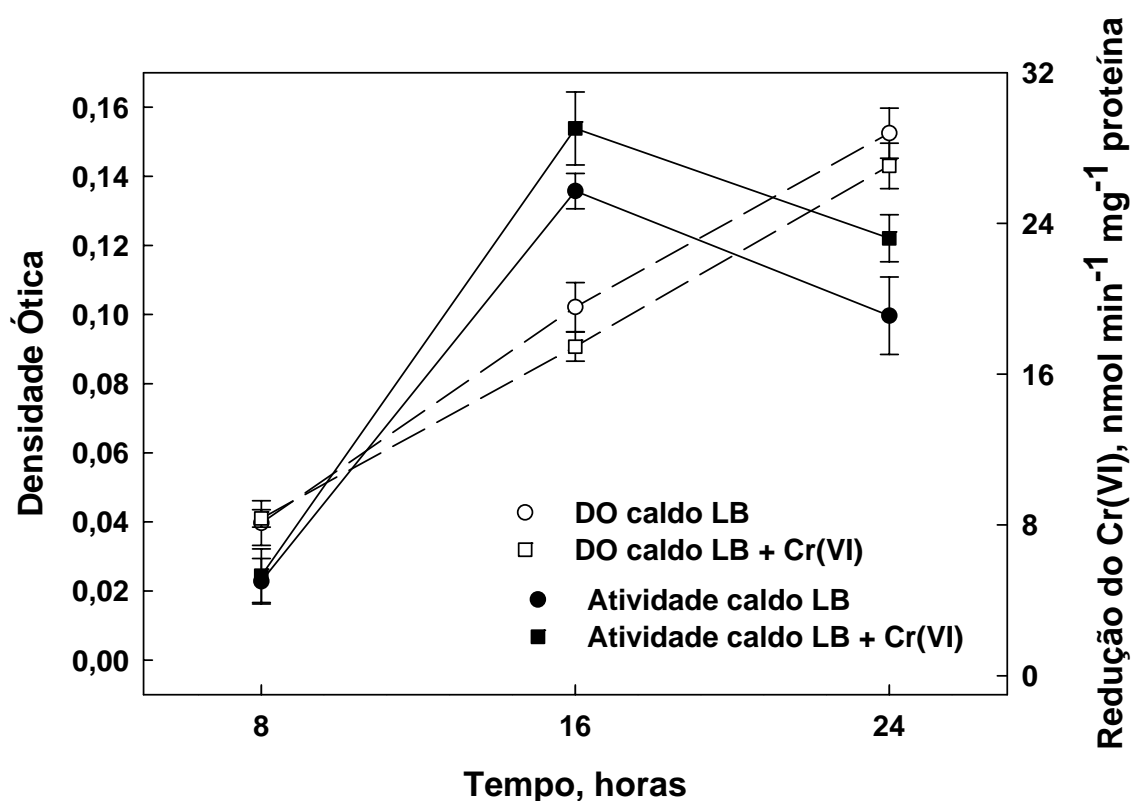


FIGURA 11: Atividade da enzima redutora de cromo durante o crescimento celular com 2 mg L⁻¹ de Cr(VI) ou na ausência do cromo (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Keyhan et al. (2003) avaliaram a capacidade de redução do Cr(VI) para algumas bactérias descritas na literatura e observaram um aumento da atividade enzimática quando os microrganismos *Pseudomonas putida* KT2440 e *Bacillus subtilis* eram crescidos na presença de Cr(VI) e não observaram

aumento da atividade em *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. Ackerley et al. (2004) estudaram a indução da síntese enzimática da enzima redutora de cromato e observaram a indução enzimática quando a *Pseudomonas putida* KT2440 era crescida em caldo contendo Cr(VI). Isto foi determinado por análise de *Western immunoblot*, que detectou um aumento da produção da proteína ChrR (redutora de cromo) quando o microrganismo crescia na presença do Cr(VI).

4.8 Condições ótimas para obtenção da enzima

Para a obtenção da fração celular que se encontra a atividade enzimática, as células são submetidas a sonicação em banho de gelo, uma vez que se trata de uma enzima intracelular. Durante a sonicação, ocorre grande liberação de energia, necessária para o rompimento celular, e o aquecimento gerado pode acarretar inativação e desnaturação da enzima de interesse. Foi então avaliado o tempo de sonicação que possibilitasse a melhor atividade de redução do cromo. Para os cálculos foi convencionado como 100% a atividade de redução do cromo pelas células integras, e a última sonicação, com a maior concentração de proteínas como 100% de proteínas solúveis (Figura 12).

Com a aplicação de 20 segundos de sonicação, observou-se baixa atividade enzimática e concentração de proteínas, provavelmente devido à pequena quantidade de células que foram rompidas. A sonicação em tempos maiores de 60 segundos resultou em aumento da concentração de proteínas, devido ao eficiente rompimento das células, porém baixa atividade enzimática, provavelmente devido a desnaturação das proteínas pelo calor. Desta forma,

para obtenção do extrato celular padronizou-se o tempo para sonicação de 40 segundos onde houve a maior atividade da enzima. Neste tempo de sonicação foram obtidas menores perdas da atividade enzimática, ainda que nem todas as células fossem rompidas.

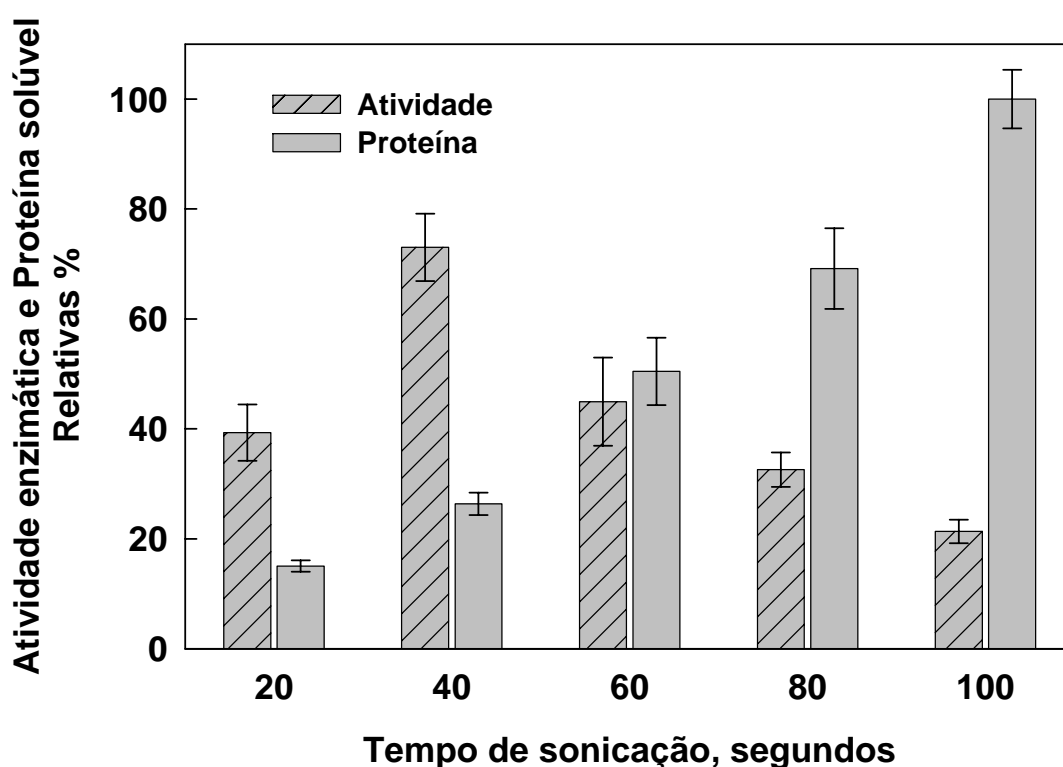


FIGURA 12: Atividade de redução do Cr(VI) e conteúdo de proteínas no extrato celular do *Bacillus* sp. ES29 obtido após diferentes tempos de sonicação (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Outro fator avaliado foi à concentração de tampão fosfato utilizado na lise celular e na mistura de reação para determinação da atividade enzimática (Figura 13). Em ambos os testes foi possível observar que a concentração de 50 mM de tampão fosfato era mais eficiente em manter a atividade enzimática durante o rompimento celular, além de proporcionar maior

atividade enzimática na mistura de reação. Este fato talvez possa ser atribuído a menor quantidade de íons sódio e potássio presentes neste tampão, o que em concentrações mais elevadas pode ter interferido na atividade da enzima. Nos trabalhos consultados, foi possível observar a utilização de diferentes tampões com baixa concentração como Tris-HCl (pH 7,0; 20mM), (Campos et al., 1997; Neppel et al, 2000) e ácido cítrico-NaOH (pH 5,0; 50 mM) (Park et al., 2000).

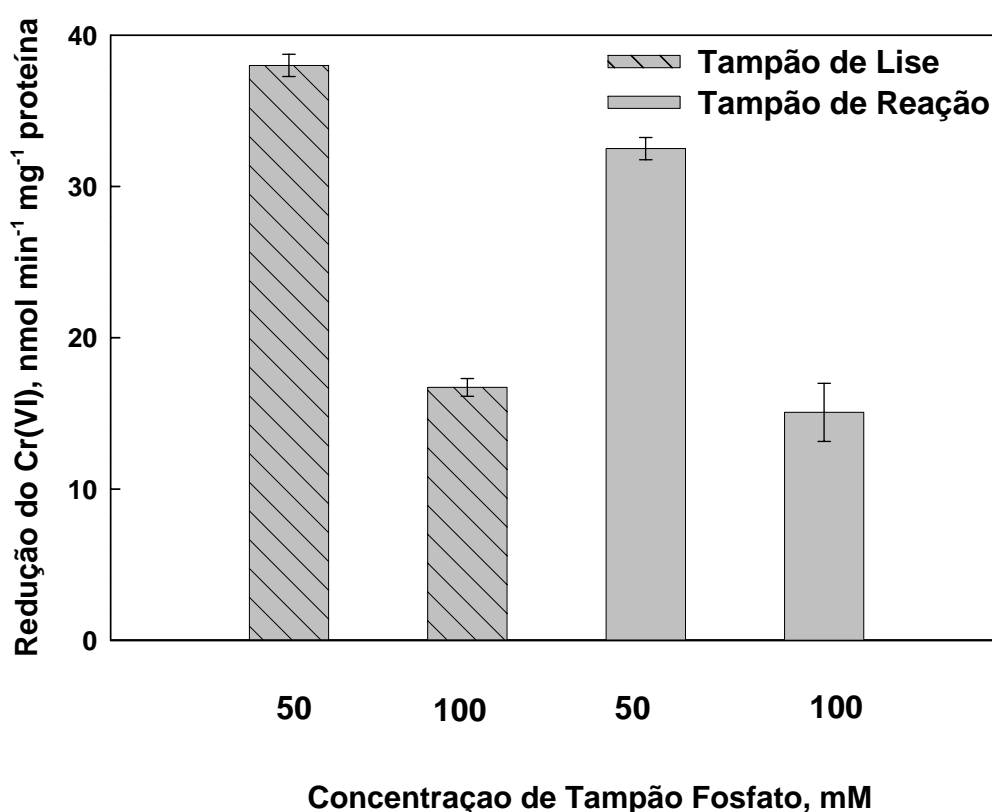


FIGURA 13: Atividade de redução do Cr(VI) em diferentes concentrações de tampão de lise e na mistura de reação para determinar a atividade enzimática de redução do Cr(VI) pelo *Bacillus* sp. ES29 (dados são médias de três repetições e as barras representam o erro padrão).

4.9 Purificação da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp.

ES29

O *Bacillus* sp. ES29 foi crescido em condições otimizadas para a obtenção da enzima redutora do cromo em caldo LB (pH 7,0), com 2 mg L⁻¹ de Cr(VI), a 30°C, por 16 horas. O extrato celular obtido foi submetido à precipitação fracionada com sulfato de amônia nas faixas de saturação de 45 a 75%, 55 a 75% e 65 a 75%. As proteínas precipitadas em cada faixa de saturação foram dialisadas e avaliadas quanto a quantidade de proteína solúvel e atividade enzimática.

Os valores de proteína e atividade enzimática para cada faixa de saturação foram expressos em porcentagem, sendo o valor de 100% referente ao extrato celular. Como se observa na Figura 14, a faixa de precipitação de 45 a 75% apresentou uma recuperação superior a 50% da atividade e acima de 60% de proteína da concentração inicial. Sendo esta faixa de saturação utilizada para as próximas etapas de purificação. Nas faixas de 55 a 75% e 65 a 75% foi observado menor quantidade de proteína, porém a atividade foi muito baixa, prejudicando a sua recuperação nos próximos passos de purificação.

Esta técnica de purificação foi utilizada em outros trabalhos para a obtenção da enzima redutora de cromo. Park et al. (2000) utilizaram a faixa de saturação de 55 a 70% para a purificação da enzima produzida por *Pseudomonas putida*. Porém, esta faixa de saturação pode eliminar proteínas menores que não precipitam, sendo descartadas. Woo et al. (2005) purificaram a partir do extrato celular de *Escherichia coli* uma enzima redutora de cromato. No primeiro passo de purificação foi utilizado precipitação com sulfato de

amônia na faixa de saturação de 35 a 65%, porém nesta faixa ocorre a precipitação de grande parte das proteínas presentes no extrato celular, o que pode dificultar a purificação devido ao excesso de proteína.

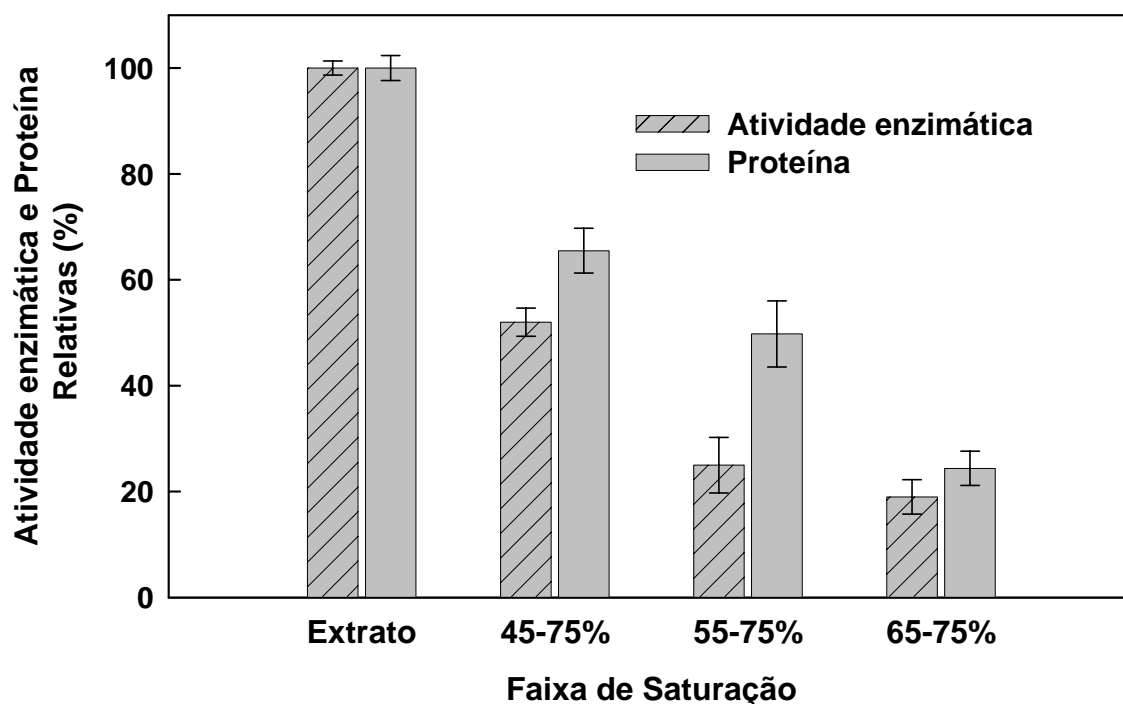


FIGURA 14: Quantificação da atividade enzimática e de proteína solúvel em cada etapa da precipitação fracionada com sulfato de amônio (dados são médias de três repetições e as barras representam o erro padrão).

Para verificar as condições ótimas de atividade da enzima foi utilizada a fração precipitada 45-75% de sulfato de amônio. Foram realizados testes de redução do Cr(VI) onde foram avaliados o pH da reação (5,0 a 10,0) e a temperatura de incubação da reação (15 a 70°C), na presença da enzima e na ausência da enzima, para verificar a ocorrência da redução não enzimática,

que pode ocorrer em altas temperaturas, baixo pH e também pela coenzima NADH. Tanto o pH (Figura 15) quanto a temperatura (Figura 16) tiveram forte influência na atividade enzimática de redução do Cr(VI).

A concentração de H^+ afeta a atividade enzimática de várias formas. Um dos fatores a ser considerado é que o processo catalítico requer que a enzima e o substrato tenham grupos catalíticos específicos em um estado ionizado ou não-ionizado, para poder interagir. O pH ideal para atividade desta enzima foi pH 7,0 em tampão fosfato, sendo que houve uma diminuição de atividade neste pH em tampão Tris-HCl (Figura 15).

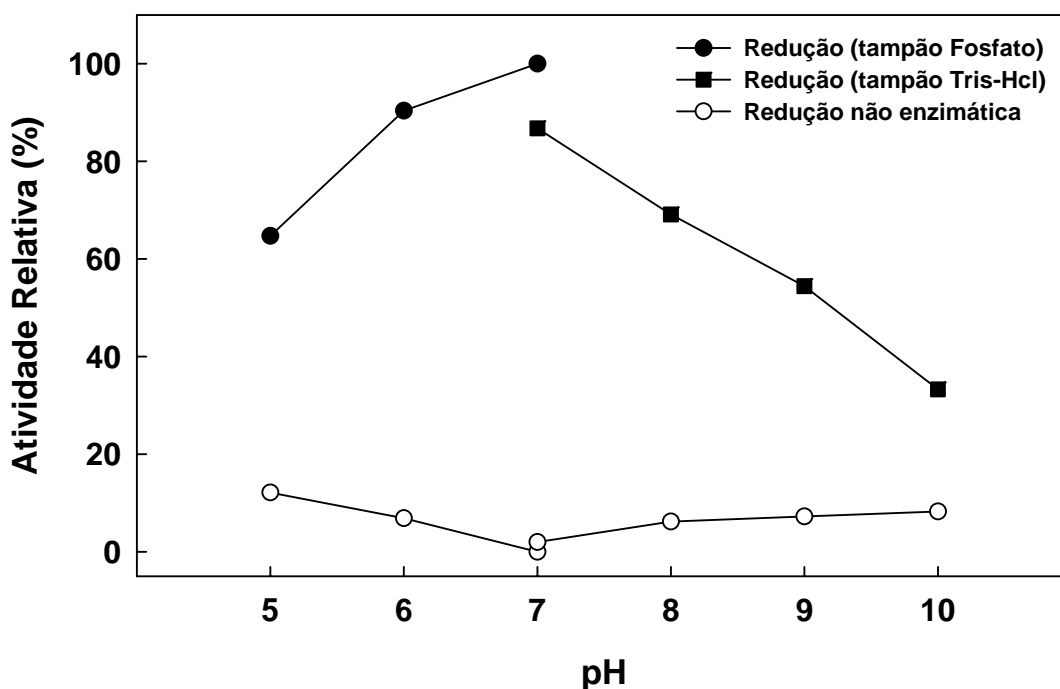


FIGURA 15: Efeito do pH na atividade redutora de cromo presente na enzima precipitada com sulfato de amônia, e na redução não biológica. Foram testados pH 5,0 a 7,0 em tampão fosfato e 7,0 a 10,0 em tampão Tris-HCl (dados são médias de três repetições).

Extremos de pH também podem levar a desnaturação da enzima, pois a estrutura da molécula de proteína cataliticamente ativa depende do caráter iônico das cadeias de aminoácidos, este fato pode explicar a baixa atividade obtida em pH 5,0, 8,0, 9,0 e 10,0. Esta enzima possivelmente se trata de uma enzima neutra, pelo fato de apresentar pH ótimo de 7,0.

A velocidade da reação aumentou com a temperatura até atingir valor máximo, que ocorreu a 30°C (Figura 16). Este aumento na velocidade é devido ao maior número moléculas com energia suficiente para atravessar a barreira de energia e formar produtos da reação, ou seja, a redução do Cr(VI). O aumento da temperatura a 40°C resultou em redução da atividade, possivelmente pela desnaturação da enzima. Uma atividade relativa de 80% ocorreu quando a temperatura de reação era de 20°C, sendo de grande importância para que esta enzima atue em temperatura ambiente.

As condições ótimas de atividade desta enzima foram em 30°C e pH 7,0, sendo que nestas condições não ocorreu redução não enzimática. Esta enzima apresentou alta atividade em pH 6,0 e 7,0 e temperatura entre 20 e 30°C, o que reforça a possibilidade de atuação desta enzima em condições ambientais. Suzuki et al. (1992) determinaram como condições ótimas para a enzima redutora de cromo parcialmente purificada a temperatura de 40 a 70°C e pH 6,0 a 9,0. A enzima do *Bacillus* sp.ES29 apresentou atividade em uma menor faixa de pH (6,0 a 8,0), porém em temperaturas menores (25 a 30°C).

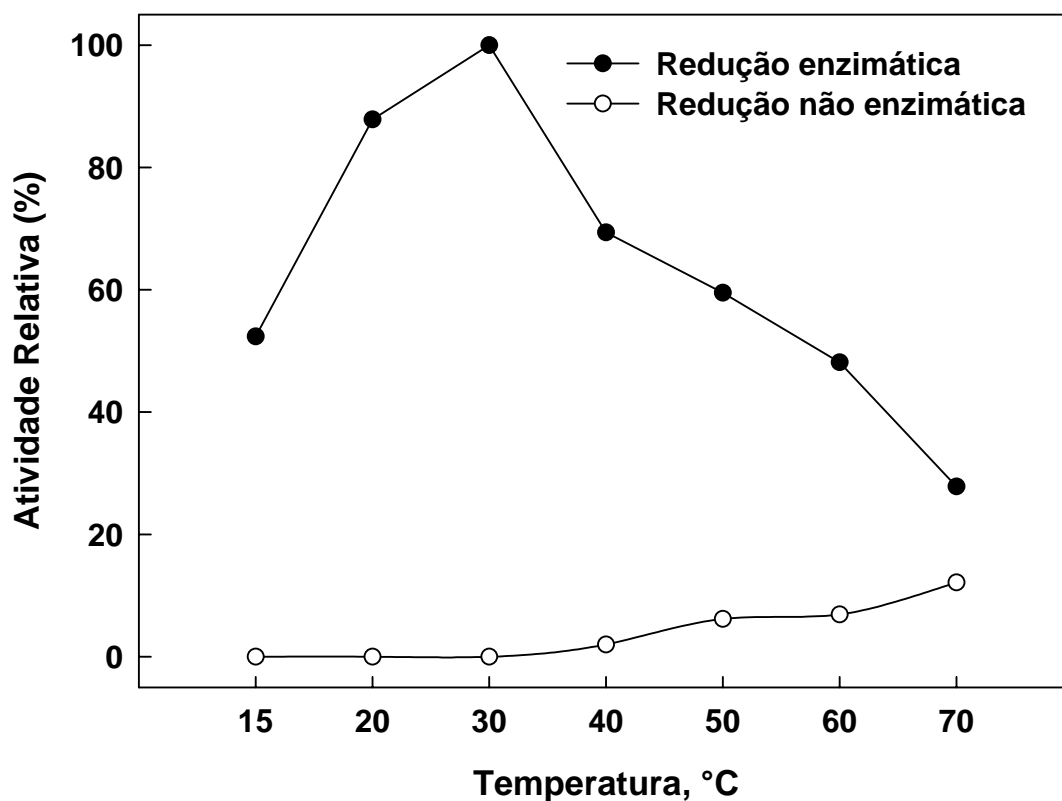


FIGURA 16: Efeito da temperatura na atividade redutora de cromo presente na enzima precipitada com sulfato de amônio, e na redução não biológica (dados são médias de três repetições).

4.9.1 Cromatografia de gel filtração

Com as proteínas precipitadas com sulfato de amônio na faixa de saturação de 45-75% foi realizado uma cromatografia de gel filtração. Foram coletadas 30 frações de 1,8 mL. Observa-se na Figura 17, que as frações 3 a 9 apresentaram um grande pico de proteínas (ABS~3,000). Entre estas frações, apenas as frações 6 e 7 foram agrupadas para realização da cromatografia de interação hidrofóbica, pois apresentaram maior atividade de redução do Cr(VI).

A coluna de gel filtração, desta forma, mostrou-se uma boa ferramenta para a purificação, pois conseguiu separar as enzimas de interesse (frações 6 e 7) das demais proteínas (frações 3,4,5,8 e 9).

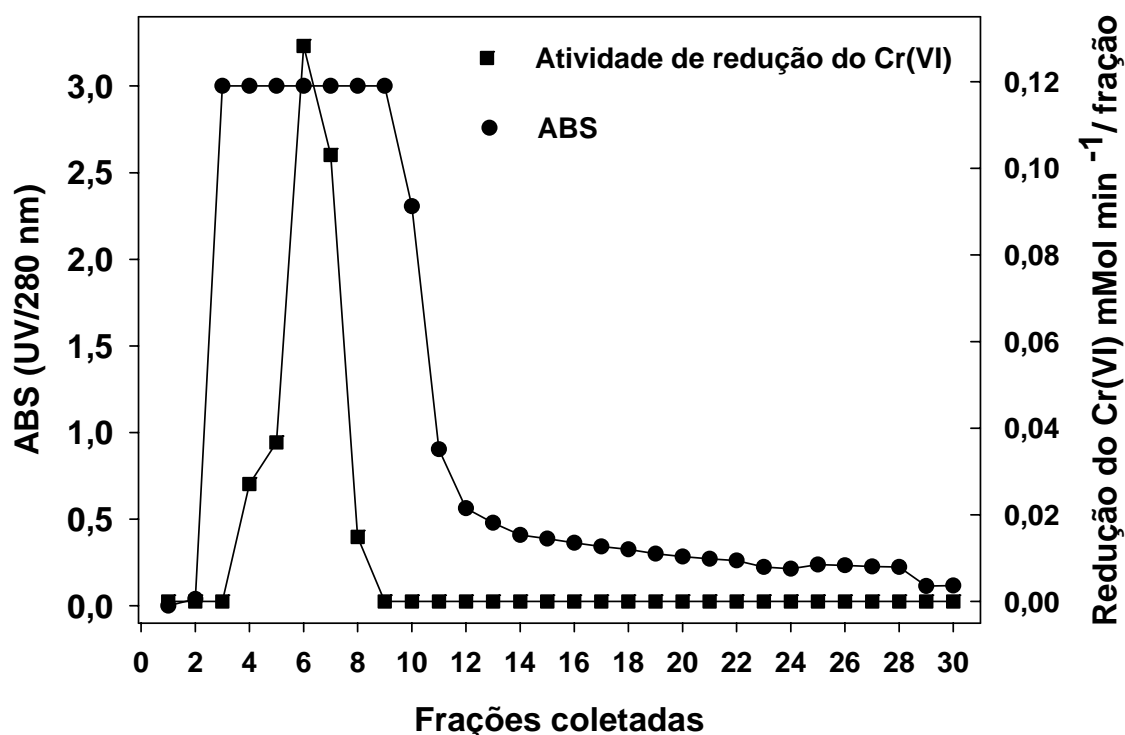


FIGURA 17: Valores de atividade enzimática e absorbância de cada fração obtida na cromatografia de gel filtração das amostras precipitadas com sulfato de amônio (dados são médias de duas repetições).

4.9.2 Cromatografia de interação hidrofóbica

As frações com melhor atividade na cromatografia de gel filtração foram submetidas a uma cromatografia de interação hidrofóbica. Em testes anteriores foi observado que a enzima de interesse possuía afinidade pelo ligante da resina. Então foram aplicadas na coluna a amostra com sulfato de amônio (1M) e após eluição de 20 ml de tampão fosfato, foi aplicado um gradiente de sulfato de amônio (0 a 1M) e coletado 25 frações de 1,5 mL. Na

Figura 18 é possível observar que a enzima de interesse saiu nas primeiras frações. Foi observado um pico de proteínas entre as frações 1 e 7, dentre estas, as frações 4, 5 e 6 foram agrupadas pois apresentaram maior atividade de redução do Cr(VI). Foram determinadas a concentração de proteína e quantificação de atividade enzimática de redução do Cr(VI).

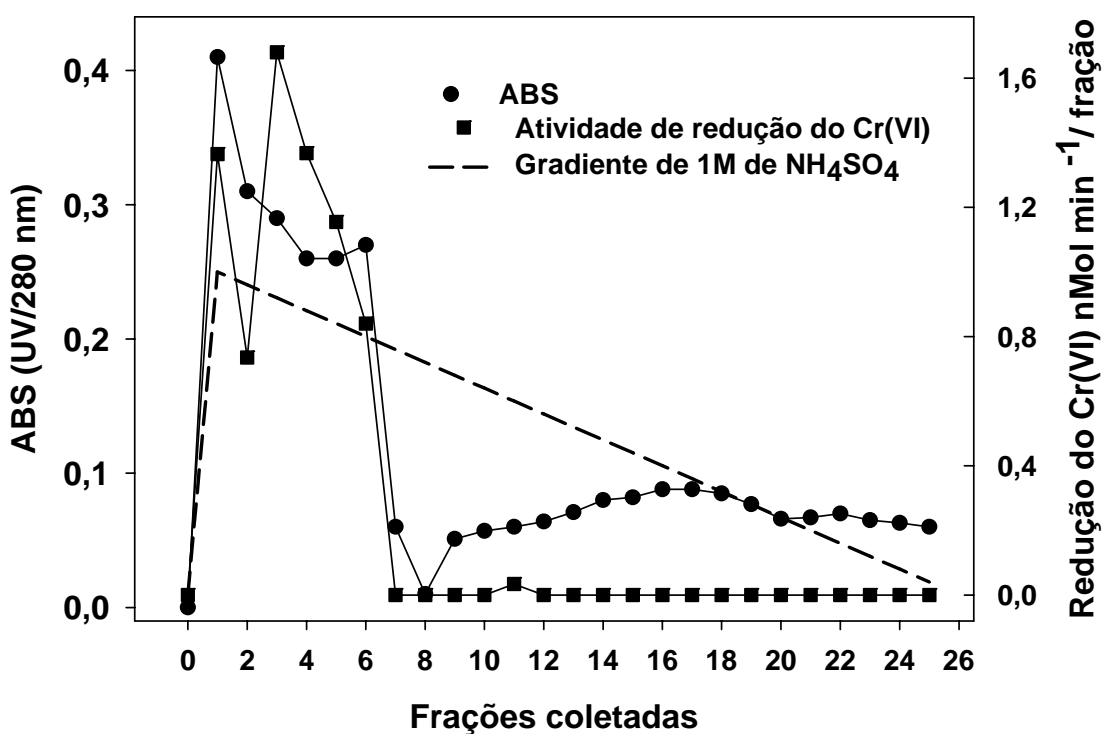


FIGURA 18: Valores de atividade enzimática e absorvância de cada fração obtida na cromatografia de interação hidrofóbica das frações com atividade na gel filtração (dados são médias de duas repetições).

Todos os passos para purificação parcial da enzima do *Bacillus* sp.ES29 são apresentados na Tabela 7. O processo de purificação realizado resultou em aumento de 11 vezes na atividade específica e um fator de purificação de 11,22. Porém, estes valores são ainda baixos. O fator de recuperação obtido demonstra grande perda de atividade durante o processo

de precipitação com sulfato de amônio (13,8) e durante a cromatografia de interação hidrofóbica (2,6). Isto pode estar associado à utilização de sulfato de amônio, que é um forte inibidor da atividade desta enzima. Este fato também foi observado por Campos et al. (1997), que atribuiu o baixo rendimento obtido a instabilidade causada pela grande quantidade de sais. Estes pesquisadores obtiveram com a purificação parcial da enzima com um fator de recuperação de 3% e fator de purificação de 40. O peso molecular foi estimado, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, 24 kDa, e na gel filtração 44 kDa, sendo sugerido pelos autores se tratar de uma proteína composta de duas subunidades de 24 kDa.

TABELA 6: Teores da enzima, fatores de recuperação e purificação em cada etapa do processo de purificação da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp. ES29.

Etapas de Purificação	Atividade Total (U)¹	Proteína Total (mg ml⁻¹)	Atividade Específica (U mg⁻¹)	Fator de Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato celular	8373,3	128,68	65,071	100	1
Precipitação	1156,6	5,928	195,11	13,8	3
Gel Filtração	800	1,48	537,93	9,6	8,27
Interação Hidrofóbica	217	0,297	730,27	2,6	11,22

¹ Unidade enzimática (U) é definido pela quantidade enzima necessária para converter 1 nmol de Cr(VI) por minuto a 30°C.

Suzuki et al. (1992) purificaram uma enzima redutora de cromo e obtiveram uma baixa recuperação (1,3%) na última etapa de obtenção da enzima, com um fator de recuperação de 38. Com a análise da formação de

produtos gerados pela enzima estabeleceram que a incubação na presença de NADH e $K_2Cr_2O_7$, possivelmente pela ação da coenzima, ocorria a redução do Cr(VI) a Cr(V). Porém, com a adição da enzima ocorria a redução do Cr(VI) a Cr(III), através da catálise enzimática, com transferência de três elétrons para o metal, consumindo três moléculas de NADH. A enzima purificada apresentou peso molecular de 65 kDa na cromatografia de gel filtração e duas frações de 25 kDa na eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo sugerido pelos autores se tratar de uma enzima dimérica.

Em todos os trabalhos referentes à purificação de enzimas redutoras de cromo é observada uma baixa recuperação de atividade. Neppel et al. (2000) obtiveram recuperação de 3% da atividade inicial depois de cinco passos de purificação, resultando em um fator de purificação de 40,6. A perda da atividade, segundo os autores talvez possa estar associada com eliminação, durante a purificação, de algum cofator importante, além do NADH.

Para a purificação da enzima de *Pseudomonas putida*, Park et al. (2000) utilizaram 40 litros de meio para a obtenção do extrato celular e realizaram precipitação com sulfato de amônia (55-70%), cromatografia de troca aniônica, cromatografia de gel filtração com HPLC e obtiveram um fator de purificação acima de 600. Esta enzima homogênea possui peso molecular de 50 kDa composta de duas subunidades de 20 kDa. Análise da seqüência N-terminal desta proteína demonstrou não apresentar metionina, sendo sugerido pelos pesquisadores se tratar de uma enzima periplasmática. Como o Cr(VI) é transportado para dentro da célula, a presença desta enzima próxima a membrana pode ser atribuída como uma vantagem para a célula microbiana

que realiza a rápida redução enzimática e efluxo da forma reduzida. Em estudos subseqüentes o gene *chrR*, responsável pela síntese da enzima, foi clonado e identificado como uma flavoproteína (Ackerley et al., 2004).

Woo et al. (2005) purificaram uma enzima redutora de cromo da *E. coli* ATCC 33456, que apresentava grande redução enzimática do Cr(VI). Após seis passos de purificação foi obtida uma enzima pura com fator de purificação acima de 967 que apresentou peso molecular de 84 kDa na gel filtração e 24 kDa na eletroforese em gel de poliacrilamida, também dependente de NADPH ou NADH como doadores de elétrons. Em análise da seqüência N-terminal da enzima obtida, verificaram apresentar 80% de similaridade com N-etilamina redutase, não apresentando similaridade com a enzima purificada por Park et al. (2000).

Estas enzimas apresentaram características como tamanho, pH e temperatura ótimos diferentes. Alguns autores atribuem a presença destas enzimas redutoras de cromo em diferentes organismos a uma atividade secundária ou seja possivelmente a enzima possui outro substrato (Ishibashi et al., 1990; Lovley 1993).

4.9.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações que apresentaram atividade de redução do Cr(VI) no extrato celular, na precipitação com sulfato de amônia na cromatografia de gel filtração e na cromatografia hidrofóbica foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentado na Figura 19.

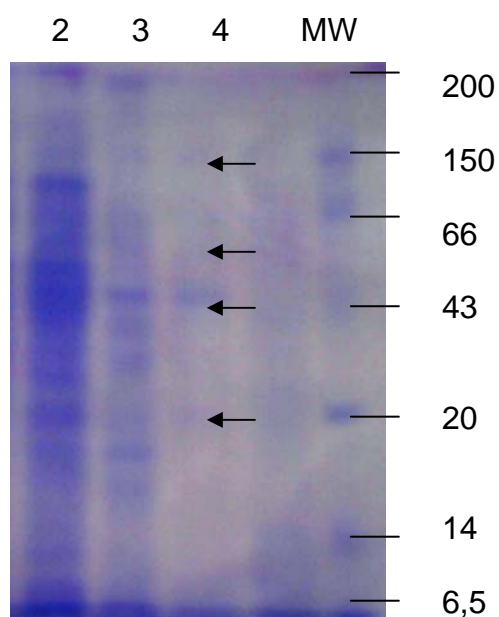


FIGURA 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações com atividade de redução do Cr(VI), sendo na canaleta 1 o marcador de peso molecular e as etapas de purificação obtidas da precipitação com sulfato de amônio (2), gel filtração (3) e interação hidrofóbica (4).

Na canaleta 2 observa-se uma grande quantidade de proteína que foi precipitada através da interação com o sulfato de amônio. Com a gel filtração um número relativamente menor de proteína é observado. Estas foram aplicadas na cromatografia de interação hidrofóbica e obteve-se três bandas com peso de 150, 43 e 20 kDa, este baixo número de bandas demonstra uma efetiva purificação parcial desta enzima. Porém passos adicionais de purificação devem ser empregados para a obtenção da pureza total desta enzima e determinação do seu peso molecular.

Neste trabalho para purificação parcial foram utilizados apenas três passos de purificação. A dificuldade de obtenção desta enzima é observada nos trabalhos descritos na literatura pela complexidade dos sistemas de

purificação, que muitas vezes ainda resultam em baixo fator de purificação e recuperação.

5. CONCLUSÕES

1) Para o isolamento de bactérias resistentes a Cr(VI), a partir de solo contaminado, a técnica de é mais eficiente que a do isolamento direto.

2) 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, capazes de reduzir 100 mg L^{-1} de Cr(VI) no caldo de nutritivo em 24 horas.

3) 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 a concentração de 750 mg L^{-1} de Cr(VI).

4) 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.

5) Todos os isolados tem sua atividade de redução do Cr(VI) fortemente inibida por sulfato de amônio.

6) A maioria dos isolados é estimulado por cobre, sendo que os outros íons avaliados apresentam diferentes níveis de inibição na atividade enzimática.

7) Os isolados 6, 11, 12 e 20 foram identificados como *Aeromonas*, *Aureobacterium*, *Xanthobacter* e *Bacillus* respectivamente. Os isolados 16 e 18 pertencem ao gênero *Agrobacterium*.

8) Com a metodologia utilizada neste trabalho para a purificação parcial da enzima redutora de cromo produzida pelo, obtém-se um fator de purificação de 11,2, o que aumenta a atividade específica da enzima em 11 vezes.

9) As enzimas parcialmente purificadas, produzidas pelo *Bacillus* sp. ES29, apresentam atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 30°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; MIURA, T.; INOUE, A.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K. Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the induction of superoxide desmutase activity by Cu^{2+} . **Biotechnology Letters**, London, v.25, n.23, p.2027-2034, 2001.
- ACKERLEY, D. F.; GONZALEZ, C.F.; PARK, C.H.; BLAKE, I.I.; KEYHAN, M; MARTIN, A. Chromate reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v.70, n.2, p. 873-882, 2004.
- ANDERSON, R.A. Nutritional role of chromium. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.17, n.1, p.13-29, 1981.
- ANDERSON, R.A. Chromium in the prevention and control of diabetes. **Diabetes and Metabolism**, Paris, v.26, n.1, p.22-30, 2000.
- ARAKAWA, H.; AHMAD, R.; NAOUI, M.; TAJMIR-RIAAHI, H.A. A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions. Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, n.4, p.10150-10153, 2000.
- ARSLAM, P.; BELTRAME, M.; TOMASI, A. Intracellular chromium reduction. **Biochemical and Biophysical Acta**, Orlando, v.931, n.1, p.10-15, 1987.
- BADER, J.L.; GONZALEZ, G.; GOODELL, P.C.; PILLAI, S.D. ALI, A.S. Chromium-Resistant Bacterial Populations from a Site Heavily Contaminated with Hexavalent Chromium. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 109, n.1-4, p.263-276, 1999.
- BANKS, R.B.; COOKE, J.R. Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.137, n.1, p.121-133, 2002.
- BARAL, A.; ENGELKEN, R.D. Chromium-based regulations and greening in metal finishing industries in the USA. **Environment Science and Policy**, New York, v.5, n.2, p.121-133, 2002.
- BARCELO, J.; POSCHENRIEDER C.; GUNSE, B. Effect of chromium (VI) on mineral element composition of bush beans. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.8, n.17, p.211-217, 1985.
- BARTLETT, R.J.; JAMES, B.R. Behavior of chromium in soils III. Oxidation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.8, n.11, p.31-35, 1979.

- BASU, M.; BHATTACHARYA, S.; PAUL, A.K. Isolation and characterization of chromium-resistant bacteria from tannery effluents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.58, n.11, p.535-542, 1997.
- BETZABE, E.P.; SÁNCHEZ, R.M.; CERVANTS C. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the Chra protein. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.212, n.2, p.249-254, 2002.
- BIANCHI, V.; DAL TOSO, R.; DEBETTO, P.; LEVIS, A.G.; LUCIANI, S.; MAJONE, F.; TAMINO, G. Mechanisms of chromium toxicity in mammalian cell cultures. **Toxicology**, Amsterdam, v.17, n.2, p.219-224, 1980.
- BLINDAUER, C.A.; HARRISON, M.D.; PARKINSON J.A.; ROBINSON, A.K.; CAVET, J.S.; ROBINSON, N.J.; SADLER, P.J. 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.
- BOPP, L.H.; CHAKRABARTY A.M.; EHRLICH, H.L. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal Bacteriology**, Baltimore, v.155, p.1105-1109, 1983.
- BORST-PAUWELS, G.W.F.H. Ion transport in yeast. **Biochemical and Biophysical Acta**, Amsterdam, v.650, n.2-3, p.88-127, 1981.
- BRADFORD, M.M. A rapid 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.
- BROCHIERO, E.; BONALY, J.; MESTRE, J.C. Toxic action of hexavalent chromium on *Euglena gracilis* cells strain Z grown under heterotrophic conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.13, n.5, p.603-608, 1984.
- BUTTNER, B.; BEYERSMANN, D. Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate. **Xenobiotica**, Londres, v.15, n.8-9, p.735-741, 1985.
- CAMARGO F.A.; BENTO F.M.; OKEKE B.C.; FRANKENBERGER W.T. Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.32, n.4, p.1228-1233, 2003a.
- CAMARGO F.A.; BENTO F.M.; OKEKE B.C.; FRANKENBERGER W.T. In vitro reduction of hexavalente chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES29 stimulated by Cu^{+2} . **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.62, n.5-6, p.569-573, 2003b.

- CAMARGO F.A.; BENTO F.M.; OKEKE B.C.; FRANKENBERGER W.T. Hexavalent chromium reduction by immobilized cells and the cell-free extract of *Bacillus* sp. ES29. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.8, n.1, p.23-30, 2004.
- CAMARGO F.A.; BENTO F.M.; OKEKE B.C.; FRANKENBERGER W.T. Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Applied Soil Ecology**, Jena, v.29, n.1-2, p.193-2002, 2005.
- CAMPOS, J.G.; MARTINEZ, M.P.; CERVANTES C. Hexavalent chromium reduction by a chromate resistant *Bacillus* sp. strain, **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.68, n.3, p.73-81, 1995.
- CAMPOS, G.J.; MARTINEZ, C.G.; ALVAREZ, G.R.; CERVANTES C. Purification and partial characterization of a chromate reductase from *Bacillus*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, Mexico, v.39, n.1, p.73-81, 1997.
- CERVANTES, J.C.; OHTAKE, H.; MISRA, T.; SILVER, S. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.172, n.1, p.287-291, 1989.
- CERVANTES, J.C.; GARCIA, C.; DEVARS, S. Interaction of chromium with microorganisms and plant. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.25, n.7, p.335-347, 2001.
- CHERMICHARO, C.A.L.; SPELING M.V. **A new approach for ambiental control industry**: In Proceeding of International Seminary of Tendencies Simplified Treatment of Domestic and Industrial Wastewater, Brasil, p.158-166, 1996.
- CHEUNG, K.H.; GU, J.D. Reduction of chromate (CrO_{4-2}) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v.52, n.8, p.1523-1529, 2003.
- 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.2376-2384, 2000.
- CIFUENTES, F.R.; LINDERMANN, W.C.; BARTON, L.L. Chromium sorption and reduction in soil with implications to bioremediation. **Soil Science**, Baltimore, v.161, n.4, p.233-241, 1996.

- CODD, R.; DILLON, C.T.; LEVINA, A.; LAY, P.A. Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. **Coordination Chemistry Reviews**, Sydney, v.4, n.216, p.537, 2001.
- CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, Lancaster, v.110, n.3, p.715–719, 1996.
- DE FILLIPS, L.F.; PALLAGHY, C.K. Heavy metals: sources and biological effects. In: RAI, L. C.; GAUR, J. P; SOEDER, C. J. (Eds.). **Algae and Water Pollution**. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1994. p.31-77.
- DELEO, P.C.; EHRLICH, H.L. Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluoresces* LB300 in batch and continues cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.40, n.8, p.756-759, 1994.
- DERMOU, E.; VELISSARIOU, A.; XENOS,D.; VAYENAS, D.V. 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.
- DÖNMEZ, G.; KOÇBERBER, N. isolation of hexavalente chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. **Enzyme and Microbial Tecnology**, New York, v.36, n.5, p.700-705, 2004.
- DREYFUSS, J. Characterization of a sulfate and thiosulfate transporting system in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.239, n.7, 1964.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHNRI A.K. Biotechnology and bioremediation: success and limitations. **Appled Microbiology and Biotechnology**, New York, v.6, n.59, p.143-152, 2002
- DUNCAN, A.; VEAL, H.; STROKES, W.; DAGGARD, G. Genetic exchange in natural mirobial communities. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.12, n.10, p.83-90, 1992.
- ELIAS, Z.; SCHNEIDER, O.; AUBRY, F.; DANIERE, M.C.; POIROT, O. Sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells treated with the trivalent chromium compounds chromic chloride and chromic oxide. **Carcinogenesis**, Oxford , v.4, n.5, p.605-611, 1983.

- FRANCISCO, R.; ALPOIM, M.C.; MORAIS, P.V. 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.
- GARBISU, C.; AIKORTA, I.; LIAMA, M.J.; SERRA, J.L. Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. **Biodegradation**, Dordrecht, v.2, n.3, p.133-14, 1995.
- GOUD, H.D.; PAREKH, L.J.; RAMAKRISHNAN, C.V. Bacterial profile of petrochemical industry effluents. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, Oxford, v.39, n.1, p.27-37, 2003.
- HENDERSON, G. A comparison of the effects of chromate, molybdate and cadmium oxide on respiration in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **BioMetals**, Oxford, v.2, n.2, p.83-88, 1989.
- HENZE M.; HARREMOES P.; JANSEN, J.; ARVINE, E. Wastewater treatment. **Springer Verlag**, Berlin, v.4, n.2, p.123-130, 1995.
- HUNTER, J.G.; VERGNANO, O. Trace element toxicities in plant. **Annals Applied Biology**, New York, v.40, p.761-777, 1953.
- INGUVA, S.; SHREVE, G.S. Biodegradation kinetics of trichloroethylene and 1,2-dichloroethane by *Burkholderia (Pseudomonas cepacia)* PR131 and *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.43, n.1, p.57-61, 1999.
- ISHIBASHI, Y.; CERVANTES, C.; SILVER, S. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.7, p.2268-2270, 1990.
- KAWANISHI, S.; INOUE, S.; SANO, S. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.261, n.13, p.5952-5958, 1986.
- KEYHAN, M.; ACKERLEY, D.F.; MATIN, A. Target of improvement in bacterial chromate bioremediation. **Battelle Press**, Columbus, v.1, n.6, p.146-150, 2003.
- KRAY, C.H. **Efeitos da aplicação de resíduo de curtume e carbonífero no solo e nas plantas**. 2001. 90f. Tese (Doutorado)-Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- KLEIMAN, I.J.; COGLIATTI, D.H. Uptake of chromate in sulfate deprived wheat plants. **Environmental Pollution**, Barking, v.97, n.1, p.130-135, 1997.

- KOMORI, K.; RIVAS, A.; TODA, K.; OHTAKE, H. A method for removal of toxic chromium using dialysis-sac cultures of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.33, p.117-119, 1990.
- KOSOWER, E.M. **Chemical properties of glutathione**. In: ARIAS, I.M.; JACOB, W.B. (Eds.). *Glutathione Metabolism and Function*. New York: Raven Press, 1976. p.1-15.
- KORTENKAMP, A.; CASADEVALL, M.; FAUX, S.P.; JENNER, A.; SHAYER, R.O.J.; WOODBRIDGES, N.; O'BRIENS, P. A role for molecular oxygen in the formation of DNA damage during the reduction of the carcinogen chromium(VI) by glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.329, n.2, p.199-207, 1996.
- KRISHNA, K.R.; PHILIP, L. Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v.121, n.1-3, p.109-117, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, London, n.227, p.680-685, 1970.
- LAXMAN, R.S.; MORE, S. Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus*. **Minerals Engineering**, Oxford, v.15, n.2, p.831-837, 2002.
- LEVINA, A.; CODD, R.; DILLON, C.T.; LAY, P.A. Chromium in biology: toxicology and nutritional aspects. **Progress in Inorganic Chemistry**, Hoboken, v.51, p.145-250, 2003.
- LEVINA, A.; LAY, P.A. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. **Coordination Chemistry Reviews**, Lausanne, v.249, n.3-4, p.281-298, 2005.
- LOSI, M.E.; AMRHEIN, C.; FRANKENBERGER, W.T. Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.13, n.11, p.1727-1735, 1994a.
- LOSI, M.E.; FRANKENBERGER, W.T. Chromium resistant microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. **Water Air Soil Pollution**, Baltimore, v.74, n.4, p.1-9, 1994b.
- LOSI, M.E.; AMRHEIN, C.; FRANKENBERGER, W.T. Environmental biochemistry of chromium. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, Washington, v.136, n.7, p.91-120, 1994c.

- LOSI, M.E.; AMRHEIN, C.; FRANKENBERGER, W.T. Bioremediation of chromate-contaminated groundwater by reduction and precipitation in surface soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.23, n.15, p.1141-1150, 1994d.
- LOUKIDOU, M.X.; ZOUBOULIS, A.I.; KARAPANTSIO, T.D.; MATIS, K.A. 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.
- LOVLEY, D. Dissimilatory metal reduction. **Annual Review of Microbiology**, New York, v.47, n.12, p.256-290, 1993.
- LOVLEY, D.; PHILLIPS, E.J.P. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c_3 cytochrome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.3, p.726-728, 1994.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980. p.527.
- MARZLUF, G.A. Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative Mutants. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.102, n.3, p.716-721, 1970.
- MCLEAN, J.; BECERIDGE, T.L. Chromate reduction by a pseudomonad isolates from site contaminated with chromate, copper and arsenate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.5, p.1076-1084, 2001.
- MERTZ, W.E. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiology Reviews**, Baltimore, v.49, n.2, p.163-239, 1969.
- McGRATH, S.P.; SMITH, S. Chromium and nickel. In: **Heavy Metals in Soils**. New York: Wiley, 1990, p.125-150.
- MICHEL, C.; BRUGNA, M.; AUBERT, C.; BERNADAE, A.; BRUSCHI, M. Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v.2, n.55, p.95-100, 2001.
- MILACIC, R.; STUPAR, J. Fractionation and oxidation of chromium in tannery waste and sewage sludge-amended soils. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.29, n.2, p.506-514, 1995.
- MIKALSEN, A.; ALEXANDER, J.; WALLIN, H.; INGELMAN-SUNDESBERG, M.; ANDERSON, R.A. Reductive metabolism and protein binding of

- chromium(VI) by P450 protein enzymes. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n.5, p.825-831, 1991.
- MIRANDA, C.D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.224, n.1, p.167-176, 1998.
- NIES, A.; NIES, D.H.; SILVER, S. Cloning and expression of plasmid gene encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.171, n.23, p.5065-5070, 1989.
- NEPPEL, B.B.; KESSI, J.; BACHOFEN, R. Chromate reduction by *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.25, n.3, p.198-203, 2000.
- OGAWA, T.; USUI, M.; YATOME, C. Influence of chromium compounds microbial growth and nucleic acid synthesis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, n.9, p.254-260, 1989.
- OHTAKE, H.; CERVANTES, C.; SILVER, S.; Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.169, n.8, p.3853-3856, 1987.
- OH, Y.S.; CHOI, S.C.; Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v.35, n.1, p.25-29, 1997.
- PAL, A.; PAUL, A.K. Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. **Microbiological Research**, Jena, v.159, n.4, p.347-354, 2004.
- PAPP, J.F. Chromium. In: **Mineral Facts and Problems**. Washington: U.S. Government Printing Office, 1985. p.139-155. Bureau of Mines bulletin 675.
- PARK, C.H.; KEYHAN, M.; WIELINGA, B.; FENDORF, S.; MATIN, A. 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.
- PATTANAPIITPAISAL, P.; BROW, N.L.; MACASKIE, L.E. Chromate reduction and 16rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.57, n.3, p.257-261, 2001.
- PEITZSCH, N.; EBERZ, G.; NIES, D.H. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n. 2, p.453-458, 1998.

- PILLICHSHAMMER, M.; PÜMPEL, T.; PÖDER, R.; ELLER, K.; KLIMA, J.; SCHINNER, F. Biosorption of chromium to fungi. **BioMetals**, Oxford, v.8, n.2, p.117-121, 1995.
- QUIEVRYN, G.; PETERSON, E.; MESSER, J.; ZHITKOVICH, A. Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI) ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. **Biochemistry**, Atlanta, v.42, n.4, p.1062-1070, 2003.
- ROMANENKO, V.I.; KOREN'KEN, V.N. A pure culture of bacteria utilizing chromates and bicromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. **Microbiology**, Praga, v.46, n.7, p.414-417, 1977.
- RYBERG, D.; ALEXANDER, J. Inhibitory action of hexavalent chromium (Cr(VI)) on the mitochondrial respiration and a possible coupling to the reduction of Cr(VI). **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.35, n.15, p.2461-2466, 1984.
- SCHIEMAN, E.A.; YONGE, D.R.; PETERSEN, J.N.; REGE, M.A.; APEL, W.A. Kinetics of chromium reduction by mixed cultures during growth phase. **Water Environmental Research**, New York, v.72, n.5, p.523-529, 2000.
- SCHWARZER, C.; AUER, B.; KLIMA, J.; HASELWANDTER, K. Physiological and electron microscopical investigations on syntrophic dicyandiamide degradation by soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.3, p.385-391, 1998.
- SCOPES, R.K. **Protein Purification**. New York: Springer Verlag, 1992. p.282.
- SELBACH, P.A.; TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C. Descarte e biodegradação de lodos de curtume no solo. **Resista do Couro**, Estância Velha, v.17, p.51-62, 1991.
- SIRKO, A.; HRYNIEWICZ, M.; HULANICKA, D.; BOECK, A. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cys* TWAM gene cluster. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.172, n.6, p.3351-3357, 1990.
- SHAKOORI, A.R.; MAKHDOOM, M.; HAQ, R.U. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.53, n.3, p.348-351, 2000.
- SHARMA, D.C.; CHATTERJEE, C.; SHARMA, C.P. Chromium accumulation and its effects on wheat metabolism. **Plant Science**, Dublin, v.111, n.1, p.145-151, 1995.

- SHEN, H.; WANG, Y.T. Characterization of enzymatic reduction of hexavalente chromium by *Escherichia coli* ATCC 334596. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.11, p.3771-3777, 1993.
- SHEWRY, P.R.; PETERSON, P.J. Distribution of chromium and nickel in plants and soil from serpentine and other sites. **The Journal of Ecology**, Ann Arbor, v.64, n.1, p.195-212, 1976.
- SHI, X.; DALAL, N.S. Chromium (V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium(VI). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.163, n.1, p.627-634, 1989.
- SHIN, Y.C.; PAIK, N.W. Reduction of hexavalent chromium collected on PVC filters. **American Industrial Hygiene Association**, Washington, v.61, n.4, p.563-567, 2000.
- SMITH, W.L.; GADD, G.M. Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Bradford, v.88, n.6, p.983-991, 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.
- STEARNS, D.M.; KENNEDY, L.J.; COURTNEY, K.D.; GIAGRANDE, P.H.; PHIEFFER, L.S.; WETTERHAHN, K.E. Reduction of chromium (VI) by ascorbate leads to chromium –DNA binding and DNA strand breaks in vitro. **Biochemistry**, Atlanta, v.34, n.9, p.910-919, 1995.
- STERN, R.M. Chromium compounds: production and occupational exposures. In: Langard, S. (Ed.). **Biological and environmental aspects of chromium**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press B.V. 1982. p.5.
- SUZUHI, T.; MIYATA, N.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; TAKAMIZAWA, K.; TAI, Y.; OKAZAKI, M. 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.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995.174p.
- TSAPAKOS, M.J.; WETTERHAHN, K.E. The interaction of chromium with nucleic acids. **Chemical-Biological Interactions**, Amsterdam, v.46, n.2, p.265-277, 1983.

- TREBIEN, D.O.P. **Influência dos teores de matéria orgânica, óxidos de manganês facilmente reduzíveis e umidade na oxidação do cromo no solo.** 1994. 81f. Tese (Doutorado)-Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
- YANG, J.L.; HSIEH, Y.C.; WU, C.W.; LEE, T.C. Mutational specificity of chromium(VI) compounds in the hprt locus of Chinese hamster ovary-K1 cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v.13, n.11, p.2053-2057, 1992.
- VALA, A.K.; ANAND, N.; BHATT, P.N.; JOSHI, H.V. Tolerance and accumulation of hexavalent chromium by two seaweed associated in *Aspergillus*. **Marine Pollution Bulletin**, London, v.48, n.9-10, p.983-985, 2004.
- WANG, P.C.; MORI, T.; TODA, K.; OHTAKE, H. Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.172, n.3, p.1670-1672, 1990.
- WANG, Y.; XIAO, C. Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. **Water Research**, Oxford, v.29, n.11, p.2467-2474, 1995.
- WANG, Y.; SHEN, H. Modeling Cr(VI) reduction by pure bacterial cultures. **Water Research**, Oxford, v.31, n.4, p.727-732, 1997.
- WILDE, E.W.; BENEMANN, J.R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.11, n.4, p.781-812, 1993.
- WOLF, T.; KASEMANN, R.; OTTENWÄLDER, H. Molecular interaction of different chromium species with nucleotides and nucleic acids. **Carcinogenesis**, Oxford, v.10, n.4, p.655-659, 1989.
- WOO, B.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 334596. **Journal of Microbiology**, Seoul, v.43, n.1, p.21-27, 2005.

VITA

Daniele Priscila da Conceição, filha de Nilton da Conceição e Rita de Cássia da Conceição, nasceu em 14 de janeiro de 1981, em Curitiba-PR. Estudou no Colégio Organização Paranaense de Ensino Técnico, onde completou o primeiro e segundo grau. Em 1999, ingressou na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde foi graduada em Bacharel em Biologia em 2003. Em 2004 iniciou o curso de Mestrado no curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.