



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas



UFAM

ProGrma Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

**SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A CROMO
HEXAVALENTE ENDÊMICAS DO IGARAPÉ DO QUARENTA**

MANAUS-AM

2017



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas



UFAM

ProGrama Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

YDRIELLY VERAS TELES

**SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A CROMO
HEXAVALENTE ENDÊMICAS DO IGARAPÉ DO QUARENTA**

Tese apresentada ao ProGrama Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Odair Pereira

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Adolfo José da Mota

MANAUS-AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T269s Teles, Ydrielly Veras
Seleção e isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente do igarapé do Quarenta / Ydrielly Veras Teles. 2017
69 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira
Coorientador: Adolfo José da Mota
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Igarapé do Quarenta. 2. cepas endêmicas. 3. cromo hexavalente. 4. biorremediação. 5. Vagococcus. I. Pereira, José Odair II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela permissão dada a cada dia por estar viva e com saúde para poder executar minhas metas profissionais e maternas.

Aos meus pais, por toda educação, carinho e exemplos dados ao longo da vida.

Ao meu esposo Victor Maxwell, por todo amor e compreensão dedicados nos últimos quatro anos.

Aos familiares por todo incentivo e orgulho sentido a cada vitória por mim alcançada.

Aos amigos pelos momentos de descontração e apoio moral.

A amiga Lorena Mota pela dedicação incansável, garra, determinação e acima de tudo altruísmo.

A amiga Aryana Pinheiro pela ajuda técnica, momentos de risadas e aprendizados.

As amigas Mariceli Fonseca e Helen Lobo, pelo carinho e cuidado dedicados a minha filha Laura Teles, quando não pude estar presente por motivos profissionais.

Ao meu orientador José Odair, pelos conhecimentos passados a mim, as grandes idéias e sugestões e principalmente por toda paciência dada mediante meu momento materno.

Aos professores Adolfo Mota e Pedro Queiroz por todo apoio intelectual e estrutural.

Ao professor Jean Peixoto, pelo incentivo a pesquisa com micro-organismos.

As pibics Rebeca Costa, Glauciane Arruda e Rayane Delmontes pelo apoio técnico e grandes momentos de descontração.

A FAPEAM pela bolsa de incentivo a pós graduação concedida.

A UFAM, por todo aparato técnico, científico e intelectual, fornecidos aos alunos por meio de grandes mestres e de infraestrutura.

Ao professor Ézio Sargentini, por toda sua gentileza ao me conceder permissão para realizar meus experimentos em seu laboratório e a todo seu conhecimento dividido comigo em nossas trocas de ideias a respeito do projeto.

RESUMO

A expansão acelerada do centro urbano da cidade de Manaus, tem gerado impactos importantes nos recursos hídricos da região. Em meio a esse cenário, o presente trabalho, tem como objetivo isolar amostras das comunidades bacterianas associadas à água do igarapé do Quarenta, avaliando seus potenciais de biorredução para o cromo hexavalente. A metodologia utilizada inclui a coleta de amostras de água em pontos estratégicos ao longo do igarapé do Quarenta, avaliação dos isolados em meio de cultura com concentrações de cromo (VI) variando de 0,01 mg/L a 320 mg/L, selecionando desta forma, as melhores cepas e identificando-as por técnica molecular de sequenciamento. Após a escolha do isolado, avaliou-se o crescimento deste na concentração de 300 mg/L ao longo de 72 horas em comparação com o controle em meio sem o metal. Simultaneamente, foram realizados testes em meio ambiente simulado com concentração de 10 mg/L de Cr (VI) com monitoramento do pH a cada 12 horas até o tempo final de 72 horas. Obtiveram-se 23 cepas resistentes a concentração de 300 mg/L de cromo (VI), onde dessas cepas foram selecionadas 18 com capacidade de reduzir o Cr (VI) sendo posteriormente identificadas via sequenciamento da região 16S. Foram identificados 10 gêneros bacterianos, entre eles estão os gêneros *Acidovorax* sp., *Acinetobacter* sp., *Alicyclophilus* sp., *Bacillus* sp., *Comamonas* sp., *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Proteus* sp., *Serratia* sp. and *Vagococcus* sp. A bactéria do gênero *Vagococcus* sp. reduziu 96,8 % de Cr(VI) a 10 mg/L em apenas 24 horas. O crescimento desta cepa na concentração de 300 mg/L, apesar de ter sido retardado pela quantidade de metal presente, após 48 horas se igualou ao controle, mostrando que esse gênero possui potencial para remediação de ambientes impactados por metais.

Palavras chave: Igarapé do Quarenta, cepas endêmicas, Cromo (VI), biorredução, *Vagococcus* .

ABSTRACT

The accelerated expansion of the urban center of the city of Manaus has generated important impacts on the water resources of the region. In the middle of this scenario, the present work aims to isolate samples from the bacterial communities associated to the water of the Quarenta stream, evaluating their bioreduction potentials for hexavalent chromium. The methodology used includes the collection of water samples at strategic points along the Forty stream, evaluation of the isolates in culture medium with chromium (VI) concentrations varying from 0.01 mg / L to 320 mg / L, selecting from this the best strains and identifying them by molecular sequencing technique. After the selection of the isolate, the growth of the isolate at the concentration of 300 mg / L was evaluated over 72 hours compared to the control in medium without the metal. At the same time, a simulated environment with a concentration of 10 mg / L Cr (VI) was monitored with pH monitoring every 12 hours until the final time of 72 hours. Twenty-three strains resistant to the concentration of 300 mg / L of chromium (VI) were obtained, where 18 strains were selected to reduce Cr (VI) and later identified by sequencing the 16S region. Ten bacterial genera were identified, among them the genera *Acidovorax sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Alicyclophilus sp.*, *Bacillus sp.*, *Comamonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.* and *Vagococcus sp.* The bacterium of the genus *Vagococcus sp.* reduced 96.8% Cr (VI) to 10 mg / L in only 24 hours. The growth of this strain at the concentration of 300 mg / L, despite being delayed by the amount of metal present, after 48 hours was equal to the control, showing that this genus has potential for remediation of environments impacted by metals.

Key words: Igarapé do Quarenta, bacterial strains, chromium (VI), bioreduction, *Vagococcus sp.*

Lista de Figuras

- Figura 1:** a) Mapa do igarapé do Quarenta desde a nascente até seu desagüe no Rio Negro. b) Em vermelho estão os pontos de coleta georreferenciados. 29
- Figura 2:** Pontos de coleta: A) UFAM (Nascente), B) Conjunto Nova República C) Bairro Japiim, D) PROSAMIM Educandos..... 31
- Figura 3:** Técnica de diluição seriada..... 32
- Figura 4:** Técnica da coloração de Gram A) amostra NR16 (*Proteus* sp.) bacilo Gram negativo; B) amostra NR11 (*Bacillus* sp.) bacilo Gram positivo; C) amostra SC22 (*Acinetobacter* sp.) cocobacilo Gram negativo; D) amostra NR06 (*Vagococcus* sp.) cocos Gram positivo..... 33

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Curva analítica para aferição de cromo hexavalente pelo método da difenilcarbazida.	38
Gráfico 2: Níveis de degradação do cromo (VI) a 300 mg/L pelas cepas selecionadas.	47
Gráfico 3: Índice de crescimento sem cromo (VI) (A) e com cromo (VI) (B), durante 72h com aferição de densidade óptica.	49
Gráfico 4: Relação tempo, densidade óptica e consumo de cromo (VI) do isolado NR06.....	50
Gráfico 5: Variação na concentração de cromo (VI) em 72 horas nos diferentes experimentos.....	51
Gráfico 6: Variação na concentração de Cr (VI) em meio LB.....	52
Gráfico 7: Relação pH e tempo de consumo do Cr (VI) do isolado NR06.	53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores máximos recomendados de metais (mg/L) por diferentes órgãos de regulamentação ambiental..... 16

Tabela 2: Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação de sequências do gene 16S rDNA de bactérias isoladas de trechos do igarapé do Quarenta com as sequências contidas no banco de dados do GenBank através da ferramenta Blastn 45

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Histórico de contaminação do Igarapé do Quarenta	15
2.2. Cromo no ambiente	17
2.3. Toxicidade do cromo.....	18
2.4. Interação do cromo com o DNA	19
2.5. Mecanismos de resistência	20
2.6. Biorremediação.....	22
2.7. Tolerância bacteriana a metais tóxicos.....	23
2.8. Domínio Bacteria	24
2.8.1. Filo Proacteria	24
2.8.2. FILO ACTINOBACTERIA	26
2.8.3. FILO FIRMICUTES	26
2.9. Diversidade Genética Microbiana	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. GERAL	28
3.2. ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Amostragem.....	29
4.2. Cultivo das bactérias em diferentes meios.....	31
4.2.1. Caracterização morfológica, purificação e preservação das bactérias isoladas	32
4.2.2. Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cromo (VI) ...	33
4.3. Identificação molecular.....	34
4.3.1. Extração de DNA bacteriano	34
4.3.2. Quantificação do DNA extraído	35
4.3.3. Amplificação do 16S	36
4.3.4. Purificação do produto da PCR	36
4.3.5. Identificação dos isolados	37
4.4. Determinação de Cr(VI): Método da s-difenilcarbazida	37
4.5. Perfil de crescimento bacteriano em cromo hexavalente	39

4.6. Aplicação da cepa em microambiente controlado	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Bactérias resistentes ao cromo VI (CIM).....	42
5.2. Caracterização morfológica.....	43
5.3. Identificação dos isolados resistentes via 16S	44
5.4. Avaliação do potencial de redução do Cr(VI) pelas cepas selecionadas.	47
5.5. Perfil de crescimento do inóculo NR06	48
5.6. Simulação <i>in vitro</i> de redução de cromo em ambiente	50
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

No decorrer do século XXI a problemática envolvendo o meio ambiente vem atingindo as diversas classes sociais. Questões como o impacto ambiental ocasionado pelo processo de antropização bem como as consequências negativas advindas do desenvolvimento tecnológico, tem sido tratados de maneira mais enérgica após a realização das primeiras conferências ambientais mundial.

O maior objetivo destas conferências é encontrar estratégias diplomáticas e democráticas para amenizar os impactos causados ao meio ambiente. Atualmente umas das maiores preocupações ambientais vem sendo a contaminação hídrica. O despejo de toneladas de resíduos advindo de fábricas, residências e hospitais em córregos, igarapés, rios e mares são frequentes em todo o mundo.

A gravidade dos problemas despertou a sociedade tornando-a mais consciente e interessada nas questões ambientais (Tiburtius et al., 2004). As preocupações ambientais são muitas porém, a poluição da água cresce em ritmo assustador. O número de compostos nocivos lançados nos sistemas aquáticos é muito elevado, principalmente aqueles de origem urbana e industrial (Montagner et al., 2014). Os efeitos das alterações das condições naturais de um ambiente aquático são mais preocupantes em cidades como Manaus, que possui uma rica flora e fauna, além de ser cercada por rios e igarapés afluentes do rio Negro.

Infelizmente, as políticas governamentais aplicadas no Brasil avaliam superficialmente os efeitos da poluição sobre os recursos hídricos (Cleto Filho, 1998). Fatores como ausência de aplicação da legislação ambiental, desarticulação dos órgãos de fiscalização entre outros foram fundamentais para as condições drásticas de poluição encontradas no sistema aquático.

Em Manaus os igarapés começaram a ter impactos ambientais a partir da urbanização e modernização da cidade, em meados da metade do século XIX. Esta problemática tomou dimensões maiores após a criação do Pólo Industrial de Manaus (Zona Franca de Manaus) em 1967. A perspectiva de aumento da renda familiar induziu o fluxo migratório de todas as partes do

Brasil, o que resultou na expansão da ocupação urbana. Dentre as áreas mais ocupadas se encontra aquelas localizadas as margens do rio Negro e bacias hidrográficas, como a do Educandos (Valle, 1999; Dias, 2001) que serve de escoamento de rejeitos, industriais e urbanos, e hoje é considerada a mais degradada (Geomanaus, 2002).

Dentre os problemas ambientais encontrados nessa bacia hidrográfica se encontra a eutrofização e altos níveis de metais potencialmente tóxicos, fatores que diminuem consideravelmente a qualidade das águas (Melo et al., 2005). Essa condição de degradação coloca em risco a saúde humana da população e dos animais que convivem com uma água de baixa qualidade.

Em meio a muitos metais pesados encontrados no igarapé do Quarenta o cromo destaca-se, por seu vasto uso nas indústrias manauaras, principalmente as voltados ao pólo de duas rodas e a produção de peças cromadas. O cromo é encontrado na natureza na forma de cromo hexavalente Cr (VI) e trivalente Cr (III). No entanto, o Cr (III) é considerado a forma mais estável, de baixa solubilidade e menos tóxica do metal. Diferente do Cr (VI), que é altamente solúvel, podendo este penetrar na célula através de transportadores de fosfato ou sulfato (Puzon et al., 2002; Codd et al., 2003; Asmatullah et al., 1998).

Quando em contato com o citosol celular é rapidamente reduzido, de forma não enzimática, aos seus intermediários Cr (IV), (V) e (III). Estes por sua vez, reagem com proteínas e com a molécula de DNA, causando monoadoção e adução ternária. Gerando erro de pareamento, de replicação e quebra da molécula, resultando em mutações, carcinomas e danos celulares irreversíveis (Thatoi et al., 2014).

Apesar de sua toxicidade ser comprovado em células procarióticas, estes micro-organismos, apresentam mecanismos de resistência provavelmente advindos de um processo de 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 (Conceição, 2007).

Neste contexto uma forma de remediar essa problemática vem por meio da biorremediação com o emprego de micro-organismos que possuem a capacidade de degradar ou reduzir determinados compostos químicos que

afetam o meio ambiente (Kumar et al., 2011).

A descoberta destes micro-organismos e o conhecimento sobre seus mecanismos de biodegradação despertam grande interesse na sociedade científica mediante ao fato de possuírem a capacidade de descontaminar poluentes orgânicos e inorgânicos presentes no solo, na água e nas plantas. Para isso são usadas metodologias voltadas ao isolamento e seleção destes microrganismos para obtenção de informações sobre sua diversidade e descoberta de novas espécies que também possam ser de grande potencial biotecnológico.

Por meio da biorremediação e de estudos voltados a esta finalidade é possível visualizar num futuro próximo o uso, em escala cada vez maior, destas tecnologias em acidentes causados por indústrias, refinarias e esgotos domésticos e hospitalares, possibilitando também que novas leis contra crimes ambientais possam ser criadas e aplicadas por órgãos públicos. O avanço de pesquisas dessa natureza pode proporcionar a descoberta de mais uma alternativa para biorremediação de ambientes contaminados.

Com base nestas considerações este estudo objetivou a identificação de microrganismos associados à água do Igarapé do Quarenta que possuem a capacidade de reduzir cromo hexavalente na fração dissolvida da água.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico de contaminação do Igarapé do Quarenta

A nível global a poluição das águas de mares, rios, lagos e igarapés são evidenciados pela grande descarga de efluentes industriais, hospitalares e domésticos, mediante a todo o processo de crescimento urbano nas proximidades destas áreas. No que se diz respeito a nível local a cidade de Manaus não foge a regra de desenvolvimento econômico e urbanístico tendo como umas das principais preocupações a falta de planejamento, ocasionando falhas na infraestrutura, urbanização e organização social, fazendo com que grande parte da população se instale nos igarapés, originando um grande número de favelas e palafitas (Kuck & Valle, 2004).

Um grande exemplo dessa situação é o Igarapé do Quarenta, que possui 38 Km de extensão, indo da nascente, na Reserva Sauim Castanheira (Zona Leste) até a confluência com o Igarapé do Educandos (Zona Sul), o qual deságua no Rio Negro. Devido ao número de habitantes que vivem às suas margens e a presença de efluentes do Distrito Industrial, acaba sendo um dos igarapés da cidade mais afetados pela poluição (Oliveira et al., 2003). Os perigos da contaminação hídrica não se restringem apenas ao consumo direto dessa água contaminada, mas também às consequências indiretas na cadeia alimentar quando nos referimos a tóxicos bioacumulativos (Riviere, 2006).

A introdução de poluentes em igarapés, rios e estuários, especialmente aqueles localizados em regiões influenciadas por grandes centros industriais e urbanos, tem levado a um aumento significativo na contaminação, tanto por substâncias consideradas não perigosas, como as que podem comprometer diretamente a vida, tais como o cromo hexavalente.

O cromo apresenta grande importância para a indústria do pólo industrial, por ser utilizado como anticorrosivo em metalúrgicas, na cromagem, em ligas metálicas, em catalisadores, em corantes, e no curtimento de peles. Estas aplicações geram grandes quantidades de efluentes e resíduos cromados no Igarapé do Quarenta (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). De acordo com a Tabela 1 podemos observar os valores máximos de metais pesados permitidos por alguns órgãos regulamentares, bem como trabalhos relacionados a pesquisa de contaminação da água do igarapé.

Em meio a todo este desenvolvimento industrial e aos impactos causados aos efluentes urbanos da cidade de Manaus, muitos estudos foram publicados a fim de trazer a luz esta problemática ambiental, como o de Silva (1996), que visou avaliar a distribuição de metais pesados em amostras de sedimentos de fundo e em suspensão em dois igarapés de Manaus, Igarapé do Quarenta e Igarapé São Raimundo, mostrando que os teores de metais analisados que se acumulam são provenientes de atividade antropogênica.

Valle (1998) por sua vez, verificou que as ocupações desordenadas, acompanhadas de lançamentos de lixo e efluentes industriais, têm contribuído para degradação ambiental, provocando alterações na textura dos solos, de pH e na distribuição de matéria orgânica. Guerra et al. (2011), discute a correlação metabólica de redução existente em micro-organismos em meio contendo metais pesados e antibióticos, comprovando a capacidade que estes seres possuem em tolerar, resistir e até mesmo reduzir estes compostos.

Kamika e Momba (2013) avaliaram a resistência e capacidade de biodegradação bacteriana e de espécies de protozoários em relação a metais pesados das águas residuais industriais, sendo que as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* mostraram maior capacidade de remover metais do meio em comparação com o protozoário do gênero *Peranema* sp.

Dentro deste contexto a biotecnologia se torna uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de uma solução para estes impactos, usando seu potencial de remediação de ecossistemas aquáticos contaminados com metais pesados como uma forma de mitigar os impactos ambientais.

Tabela 1: Valores máximos recomendados de metais (mg/L) por diferentes órgãos de regulamentação ambiental.

	OMS ¹	CONAMA ²	MS ³
Cádmio (Cd)		0,2	0,005
Chumbo (Pb)	0,1	0,5	0,01
Selênio (Se)	0,01	0,30	0,01
Arsênio (As)	0,01	0,5	0,01
Crômio (Cr III)	0,05	1,0	0,05
Crômio (Cr VI)	0,05	0,1	0,05

Ferro (Fe)	-	15	-
<i>Continuação da Tabela 1</i>			
Níquel (Ni)		2,0	0,07
Manganês (Mn)	0,4	1,0	-
Cobre (Cu)	2,0	1,0	2,0
Zinco (Zn)	-	5,0	-

¹Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), ²Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), ³Ministério da Saúde (Brasil, 2011)

2.2. Cromo no ambiente

O cromo é o sétimo elemento mais abundante na terra (Silva & Pedrozo, 2001) e largamente utilizado em vários segmentos industriais como na fabricação de peças cromadas, motores, tintas, curtumes, galvanoplastia entre outras (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Com a alta demanda, o cromo vem se tornando um sério agente poluidor do solo e da água. Suas concentrações médias aceitas em água doce não poluídas é de 0,1 a 0,5 mg/L e em oceanos de 0,0016 a 0,05 mg/L (De Fillipps & Pallaghy, 1994), porém sabe-se que em efluentes industriais não tratados lançados no ambiente podem conter concentrações muito mais elevadas de cromo.

O primeiro caso relatado de acidente envolvendo contaminação ambiental causada por cromo, ocorreu na Califórnia na cidade de Hinkley em 1987, onde foram detectados 580 mg/L de Cr (IV) na água subterrânea, advindo de uma indústria que utilizava cromo (VI) como anticorrosivo. A população desta cidade apresentou, após o incidente, vários tipos de doenças no coração, no sistema respiratório, baixa fertilidade e, principalmente, câncer. A empresa poluidora foi multada em 333 milhões de dólares (Nakamoto, 2014).

Em nosso cotidiano somos expostos de forma passiva ao cromo por meio do 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 et al., 2003).

Sendo considerado um poluente prioritário em vários países, a redução

do Cr VI a Cr III consiste em uma estratégia de tratamento viável, podendo ser efetuada com o uso de microrganismos que podem atuar diretamente (via enzimática) ou indiretamente (produção de metabólitos redutores), segundo Masaki et al. (2015). Conceição et al. (2007), avaliou a redução de cromo hexavalente através de bactérias isoladas de solos contaminados com cromo, isolando seis bactérias capazes de reduzir acima de 100 mg/L de Cr (VI) em 24h. Baz et al. (2015) também fez o estudo de biorremediação com 59 isolados de actinobactéria, capazes de resistir a concentrações de 0,15 mg/mL de cromo encontrado em áreas ao redor da região de Marraquexe/Marrocós. Estudos como os de Conceição e Baz comprovam que algumas bactérias selecionadas são eficientes na redução do Cr (VI) e apresentam potencial para outros estudos que visam a aplicação em demais processos de biorremediação.

2.3. Toxicidade do cromo

O cromo hexavalente é um metal solúvel, encontrando na célula bacteriana condições fisiológicas favoráveis para sua entrada. Para que haja a proteção desta célula contra os efeitos letais do Cr (VI) é necessário que ocorra a redução do mesmo através de mecanismos eficientes para a retirada do metal seja da parede celular ou mesmo de seu interior.

Uma das vias utilizadas para este processo de desintoxicação celular é através da via de captação do sulfato, uma vez que o íon cromato apresenta estrutura química tetraédrica similar ao íon sulfato. Por meio de transportadores inespecíficos de fosfato ou sulfato, o cromo (VI) consegue fazer sua entrada na célula, que por sua vez possui capacidade de impedir a entrada do metal por meio da alteração no canal de entrada do íon sulfato tornando impossibilitada a entrada do metal na célula bacteriana, sendo este reduzido de forma não-enzimática (Wenbo et al., 2000; Kummerer, 2004; Ramirez-Diaz et al., 2008).

Outro mecanismo de redução existente e não enzimático do Cr (VI) a Cr (III) é por meio extracelular, mediada pela ligação com grupos funcionais na superfície celular bacteriana ao cromo hexavalente (Ngwenya & Chirwa, 2011). Uma vez reduzido a cromo (III), este fica aderido a peptídeoglicanos encontrados na parede celular bacteriana, onde esta ligação auxilia e facilita

sua remoção.

Portanto, podemos afirmar que dentre muitos agentes redutores existentes, os que apresentam maior eficiência na remoção deste metal de forma não enzimática são: o ácido ascórbico, os grupos tiol, a cisteína, a glutatona e o peróxido de hidrogênio (Quiévryn et al., 2003; Poljsak et al., 2010).

O primeiro estudo realizado com a finalidade de compreender o mecanismo biológico dos microrganismos em relação ao cromo foi em 1964 por Dreyfuss com uso da *Salmonella typhimurium* e posteriormente em *Escherichia coli* por Sirko et al. (1990). Muitos estudos subsequentes tais como (Oh & Choi, 1997; Chirwa & Wang, 2000; Park et al., 2000; Srinath et al., 2002; Dhal et al., 2013) relataram a capacidade das bactérias reduzirem o cromo em formas menos tóxica para o ambiente.

2.4. Interação do cromo com o DNA

Os efeitos do cromo (VI) e de seus intermediários no DNA vem sendo alvo da realização de muitas pesquisas voltadas a compreensão dos mecanismos usados pelas bactérias para a remoção deste metal. Em geral o processo de redução do cromo para seus intermediários provoca modificações moleculares na base do esqueleto de DNA (Codd et al., 2001; Levina et al., 2003; Ramirez-Diaz et al., 2008).

Com relação aos demais intermediários do Cr, o Cr (V), em particular, provoca a oxidação das bases do DNA e suas pentoses, provocando a quebra da estrutura. De maneira similar ao cromo (IV) e cromo (III) também causa os mesmos danos já citados, além de formar ligações cruzadas entre proteínas-cromo-DNA (Zhitkovich, 2011).

A interação do cromo com DNA e grupos fosfatos pode ocorrer através de ligações covalentes ou interação iônica. O Cr (VI) e suas formas reduzidas como o (III) podem causar, dentro de células bacterianas, ligação cromo-DNA (ligação do Cr com bases nitrogenadas ou grupamento fosfato, resultando em erros de pareamento de bases e de replicação). Pode também formar ligação cruzada entre proteínas-cromo-DNA, prejudicando a síntese protéica (Conceição, 2007).

Estas são algumas das interações relatadas até o momento, porém a utilização de novas técnicas de análises moleculares, sugere que possa haver outras ligações entre cromo e outras macromoléculas (Joutey et al., 2015; Kamika & Momba, 2013).

2.5. Mecanismos de resistência

Através do processo da seleção natural, as comunidades bacterianas que habitam água, solo e sedimentos evoluíram seus mecanismos de resistência e tolerância aos ambientes contendo metais pesados. Por meio de vários mecanismos essas bactérias são capazes de transformar formas tóxicas do metal em produtos com menor toxicidade (Sotero-Martins et al., 2014).

Os mecanismos de resistência são codificados por genes cromossomais e plasmidiais e incluem: bombas de efluxo, acúmulo e complexação do metal dentro da célula e redução química do contaminante a uma forma menos tóxica (Abdelatey et al., 2011). Destaca-se que a resistência a metais pesados é devida aos mecanismos intrínsecos e a exposição prolongada a esses metais o que favorece a seleção e proliferação de micro-organismos tolerantes ao estresse causado por eles (Hutchinson & Symington, 1997).

A alta resistência ao Cr (VI) bem como a capacidade de redução a este metal tornam uma cepa bacteriana candidata ideal para a biorremediação, sendo eficaz na descontaminação de ambientes impactados (Christ et al., 2012).

Esta capacidade de tolerância ao metal pode estar relacionada a diversos fatores, um deles é a produção de metalotioneína (MTs), uma família de proteínas quelantes de metais. Esta proteína produzida por alguns microrganismos apresenta uma seqüência curta de aproximadamente 60 aminoácidos ricos em cisteína, que se liga ao cromo, reduzindo sua concentração intracelular e conseqüentemente, os danos causados pelo metal (Blindauer et al., 2001).

Outros sistemas usados pelas bactérias são os de redução e as bombas de efluxo. A redução é um sistema com grande potencial biotecnológico para a biorremediação, podendo esta ser realizada em meios com ou sem a presença de oxigênio. A redução aeróbia de Cr (VI) está geralmente associada a

proteínas solúveis e requer NAD(P)H como doador de elétrons. Estas proteínas solúveis são proteínas citosólicas, localizadas no citosol (Shen & Wang, 1993). Uma vez reduzido, o Cr (III) liga-se normalmente aos grupos funcionais contidos na superfície da célula bacteriana, servindo de locais de nucleação para precipitação adicional.

Por sua vez, a redução anaeróbia por bactérias está geralmente associada a enzimas redutases ligadas à membrana, como flavina redutases, citocromos e hidrogenases, que podem ser parte do sistema de transporte de elétrons e utilizam o cromato como o acceptor terminal de elétrons. No entanto, a redução de Cr (VI) se torna ainda mais eficiente em condições anaeróbicas quando mediadas pelo ferro (II) e pelos sulfetos gerados pelas bactérias redutoras de ferro e de sulfato, chegando a ser, em média, cem vezes mais rápida que as bactérias redutoras de cromo, uma vez que bactérias redutoras de sulfeto produzem H₂S, que serve como um redutor de Cr (VI) (Thatoi et al., 2014).

As bombas de efluxo são também um mecanismo de resistência encontradas no citoplasma bacteriano, onde são mediadas por transportadores codificados por genes plasmidiais específicos. O efluxo de cromo é considerado um dos mais eficientes e mais conhecidos mecanismos de resistência, que impede a acumulação de íons tóxicos dentro das células bacterianas (Ramirez-Diaz et al., 2008).

Este sistema foi melhor compreendido após o estudo a nível molecular de dois plasmídeos, pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes et al., 1989) e pMOL28 de *A. eutrophus* (Nies et al., 1989). Estudos com o plasmídeo 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). De acordo com esses dois estudos, o mecanismo básico que confere resistência a cromo seria similar nas duas bactérias, onde a proteína ChrA funciona como uma bomba quimiosmótica que exporta cromato do citoplasma para fora, movido pela força motora do próton (Alvarez et al., 1999).

Portanto, a realização contínua de estudos voltados aos micro-organismos resistentes e redutores pode ser de grande potencial de uso nos processos de biorremediação e no monitoramento da concentração do poluente (biossensores) em efluentes industriais.

2.6. Biorremediação

Entende-se por biorremediação, a capacidade que os organismos vivos, principalmente os micro-organismos, possuem em converter substâncias tóxicas em compostos menos nocivos (Kumar et al., 2011). A utilização de organismos endêmicos, sem qualquer interferência de tecnologias ativas (biorremediação intrínseca ou natural), adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) são algumas das principais estratégias de biorremediação (Tonini et al., 2010).

Pensando nisso, pesquisas são realizadas para que o cromo, bem como outros metais, possam ser retirados ou reduzidos dos ambientes. A remoção dos metais pesados no ambiente pode ser feita através de tratamentos físico-químicos, utilização de micro-organismos ou por meio do uso de plantas resistentes (Costa & Duta, 2001; Sar et al., 2001; Xinxian et al., 2011).

Para a remoção dos metais pesados em efluentes industriais, em geral são utilizados processos que envolvem: precipitação química, oxirredução, filtração, técnicas eletroquímicas e sofisticados processos de separação por membranas. No entanto, estes processos são geralmente dispendiosos e muitas vezes apresentam baixa eficiência, por isso alternativas biotecnológicas vêm sendo incentivadas devido ao seu custo reduzido, alta eficiência e menores danos ao ambiente.

Com isso, os micro-organismos estão cada vez mais sendo estudados para o uso na remediação de ambientes contaminados. Trabalhos como os de (Samanta et al., 2012; Kamika & Momba, 2013; Wuana & Okieimen, 2014), mostram a relação dos metais pesados com as bactérias e o seu processo de descontaminação de ambientes por meio da biorremediação, mediante seus altos índices de crescimento celular e tolerância a vários poluentes. Portanto, estudos com esses micro-organismos são de suma importância para a

recuperação de ambientes contaminados com metais pesados, uma vez que eles apresentam um grande potencial como agentes na biorremediação.

2.7. Tolerância bacteriana a metais tóxicos

Os efeitos tóxicos e inibitórios dos metais pesados sobre o crescimento microbiano requerem atenção, uma vez que os íons metálicos dependendo de sua natureza, concentração e disponibilidade irão interferir em atividades essenciais dos microrganismos, danificar a estrutura da parede celular e do DNA, alterar a especificidade de enzimas e interferir no processo de degradação dos compostos orgânicos por aqueles que são capazes de degradá-los, causando impactos na diversidade microbiológica (Amor et al., 2001; Roane et al., 2000). A toxicidade também ocorre por deslocamento de metais essenciais de seu sítio ligante em proteínas, alterações em fosforilações oxidativas e no balanço osmótico (Bruins et al., 2000).

No entanto já é possível saber por meio dos bancos de dados como BacMet e NCBI que existem bactérias que apresentam de fato resistência a determinados metais e os níveis de toxicidade destes, como: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, entre outras, já foram descritos genes de resistência a metais pesados (Silva, 1996).

Estes micro-organismos desenvolveram mecanismos para contornar o estresse por metais pesados, em resposta à pressão seletiva desses elementos no ambiente. Várias vias de resistências são conhecidas, tais, como: transporte ativo de substâncias, bombas de efluxo, alteração da sensibilidade a íons metálicos em sítios específicos, extrusão por barreiras de permeabilidade, sequestro de metais pesados complexados e especiação de metais (Bruins et al., 2000; Levy, 2002; Nies, 2003).

Por meio destas informações são geradas estratégias que permitem o tratamento do contaminante, geralmente a um baixo custo, através da biorremediação (Dobler et al., 2000).

Dessa maneira Dick et al. (1996) idealizaram a existência de uma população e de sua atividade microbiana no solo capaz de indicar a qualidade do mesmo, uma vez que estes possuem alta sensibilidade a modificações

ambientais, podendo esta ideia ser aplicada a outros ambientes como água por exemplo. Desta forma qualquer modificação de quantidade ou de qualidade que houvesse na diversidade das espécies de microrganismos poderiam ser vistas como um indicador ambiental (Curry & Good, 1992; Stork & Eggleton, 1992).

Outros trabalhos como os de Ivask et al. (2009) utilizaram um conjunto de estirpes de bactérias luminescentes recombinantes para a quantificação dos metais pesados biodisponíveis e para realizar testes de toxicidade. Samanta et al. (2012), investigaram a tolerância a metais pesados e resistência aos antibióticos e outras propriedades da estirpe bacteriana *Bacillus sp.* isolada a partir de águas residuais. Estes e muitos outros trabalhos ajudam a elucidar os mecanismos que as bactérias utilizam para chegar a uma redução natural das formas mais tóxicas dos metais disposto nos ambientes.

2.8. Domínio Bacteria

Este domínio possui uma ampla distribuição nos continentes, mares e atmosferas e determinados grupos apresentam ocorrências limitadas em ambientes hostis (Ludwig et al., 1997). Os representantes desses domínios apresentam uma alta diversidade metabólica quanto à fonte de carbono (autotrófico – heterotrófico), tipo de energia (luminosa – fototrófico ou química – quimiotrófica) e tipo de substrato oxidável utilizado (orgânico - organotrófico ou inorgânico – (litotrófico) (Barbosa & Torres, 1998). Alguns filos podem ser destacados:

2.8.1. Filo Probacteria

É um dos principais grupos de bactérias que incluem uma grande variedade de agentes patogênicos, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*. Seu nome deriva do Deus grego “Proteu”, o qual possuía a habilidade de mudar de forma. Este grupo tem como característica possuir membros de uma grande diversidade de formas. Todas as proteobactérias são Gram – negativas, sua parede celular é formada principalmente de lipopolissacarídeos. Sua forma de locomoção em maioria é por via de flagelos ou por deslizamento. A nutrição é normalmente heterotrófica, mas existem dois

grupos que realizam fotossíntese, denominadas bactérias purpúreas. As bactérias purpúreas sulfurosas utilizam enxofre e o sulfeto de hidrogênio, como doador de elétrons. As bactérias púrpuras não-sulfurosas utilizam hidrogênio. A dominância de Proteobactéria ocorre geralmente em solos de cultivo (NUSSLEIN; TIEDJE, 1999) e ou contaminados com metais pesados (SANDAA et al., 2001), que geralmente apresenta pH mais elevado em relação ao solo de floresta.

As proteobactérias alfa compreendem a maioria dos gêneros fototróficos, simbioses de plantas (por exemplo, os rizóbios) e de animais (CULLIMORE, 2000).

As proteobactérias beta incluem vários grupos de bactérias aeróbias ou facultativas, que são versáteis nas suas capacidades de degradação, mas também contêm gêneros quimiolitotróficos (por exemplo, o gênero *Nitrosomonas* que oxida o amoníaco) e alguns fototróficos (gêneros *Rhodocyclus* e o gênero *Rubrivivax*) (CULLIMORE, 2000). Outra característica é que as proteobactérias desempenham um papel importante na fixação de azoto em várias espécies de plantas, e são usualmente encontradas em amostras ambientais, tais como águas residuais ou no solo.

As proteobactérias gama envolvem inúmeros grupos de bactérias importantes para a ciência e para a medicina, tais como as *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Pseudomonadaceae*. Estes grupos incluem vários agentes patogênicos importantes, por exemplo: *Salmonella* (enterite e febre tifoide), *Yersinia* (peste), *Vibrio* (cólera), *Pseudomonas aeruginosa* (infecções pulmonares em pacientes hospitalizados ou com fibrose cística).

O grupo das proteobactérias delta contém gêneros predominantemente aeróbios, mixobactérias, que formam corpos frutíferos, e um grupo de gêneros estritamente anaeróbios que contém a maior parte das bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* etc), e das bactérias redutoras de enxofre (por exemplo, *Desulforomonas*), juntamente com outras bactérias anaeróbias com diferentes fisiologias (por exemplo, redutoras de ferro férrico, como o gênero *Geobacter* e os gêneros sintróficos *Pelobacter* e *Syntrophus*) (CULLIMORE, 2000).

As proteobactérias ípsilon pertencem a um grupo mais discreto quanto à quantidade de representantes, onde poucos gêneros, porém não menos

importantes, principalmente do ponto de vista da medicina: *Wolinella*, *Helicobacter* e *Campylobacter*. São habitantes comuns do aparelho digestivo, tanto em seres humanos como nos animais irracionais. Podem ser classificados como simbiotes ou patogênicos. Simbiotes no gado, por exemplo, são patogênicos aos seres humanos (CULLIMORE, 2000).

2.8.2. FILO ACTINOBACTERIA

Constitue-se por bactérias Gram-positivas conhecidas como actinomicetos ou actinobactérias e possuem em seu genoma um alto teor de G+C. Estas bactérias tem organização filamentosa, muitas vezes ramificada. Dada a sua semelhança com fungos e por produzirem, como estes, cadeias de esporos semelhantes à conídeos, os actinomicetos são, com frequência, erroneamente classificados como tais. Ao contrario dos fungos, porém, são organismos procarióticos em sua grande maioria aeróbios e Gram-positivos. Os actinomicetos ocorrem amplamente em ambientes aquáticos e terrestres e possuem uma função importante na decomposição da matéria orgânica e na formação de húmus (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983), portanto, são fundamentais para o melhoramento do solo. Além de possuem também, importantíssimo papel na produção de diversos antibióticos.

2.8.3. FILO FIRMICUTES

Os representantes do filo Firmicutes estão descritos como bactérias Gram-positivas aeróbias e anaeróbias com baixo teor de G+C. São bactérias que apresentam o metabolismo caracterizado como homo e heterofermentação e respiração. Dentre os representantes mais comuns encontram-se bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Esses organismos apresentam desenvolvimento rápido quando há nutrientes em quantidades suficientes, no entanto, prevalecem somente quando há condições de disponibilidade de nutrientes em áreas com baixa competição. Desse modo podem ser encontrados frequentemente em ambientes instáveis que estejam passando por transição (ATLAS; BARTHA, 1998).

2.9. Diversidade Genética Microbiana

Historicamente os primeiros autores a sugerirem o uso do gene 16S rDNA como um marcador molecular foram: Pace e colaboradores em 1986, com o estudo de populações microbianas em amostras do ambiente, independente de seu cultivo. Com o tempo as sequências de 16S rDNA se tornaram um padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; HONG et al., 2009).

A escolha do 16S rDNA decorreu ao fato dele apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal: possui uma distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os taxons e um tamanho grande o suficiente que permita o aparecimento de divergências na sequência. Além disso, sua estrutura primária possui uma alternância entre regiões mais e menos conservadas permitindo a investigação de um amplo espectro de distâncias filogenéticas, desde o nível de domínio até o nível de espécie (Ludwig & Schleifer, 1994; Roux et al., 2011).

Com isso as sequências de rRNAs ocupam atualmente uma posição crucial no estudo da evolução e ecologia dos microrganismos. O método original consistia na extração de rRNA de culturas puras seguido por análises comparativas realizadas com o uso dos catálogos de oligonucleotídeos de 16S rRNA (Fox et al., 1977). A partir da década de 90 as análises comparativas da estrutura primária dos genes de rRNA transformaram a taxonomia microbiana de um simples sistema de identificação para um sistema estruturado de sistemática baseado na história evolutiva dos organismos (Olsen et al., 1994; Oros-Sichler et al., 2006).

Atualmente o número de artigos gerados com base em informações de sequências da região 16S com bactérias com potencial de biorremediação são exorbitantes, uma vez que as técnicas foram e ainda estão se aperfeiçoando cada vez mais, muitos destes trabalhos tais como os dos autores Kamika & Momba (2013), Wuana & Okieimen (2011), Baz et al., 2015; elucidaram mecanismos e estratégias de redução de cromo, por meio de genes, proteínas, enzimas ou efluxos contidos em células bacterianas.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Isolar bactérias de um igarapé que cruza a região distrital do município de Manaus (Igarapé do Quarenta) capazes de resistir e reduzir cromo hexavalente.

3.2. ESPECÍFICOS

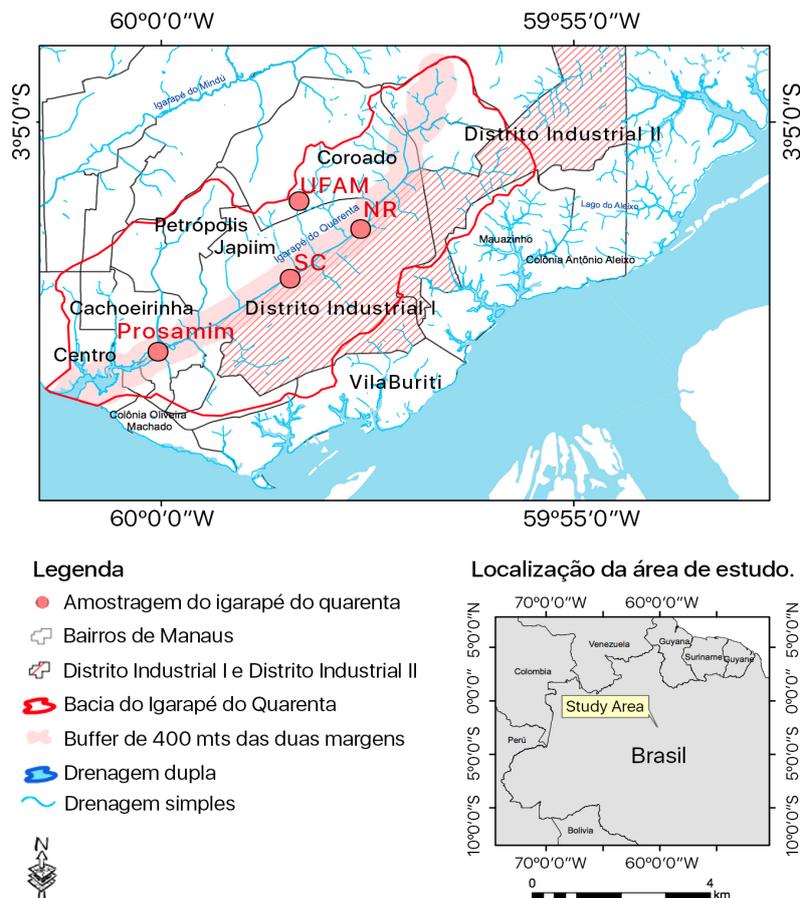
- Isolar as bactérias da fração aquosa do Igarapé do Quarenta;
- Observar o perfil de sensibilidade e resistência das bactérias em diferentes concentrações de Cr(VI)
- Identificar via sequenciamento 16S as bactérias que apresentarem maior capacidade de redução do metal;
- Executar testes em micro ambiente controlado de biorredução do metal pela bactéria com melhor desempenho nos experimentos antecedentes.

4. METODOLOGIA

4.1. Amostragem

Para a realização do experimento foi necessário coletar 1 L de água do igarapé do Quarenta de cada ponto previamente escolhido, seguindo o manual de recomendações da Agência Nacional de Águas – Brandão (2011) com uso de garrafas de polímero inerte previamente esterilizadas. Os pontos são: nascente - UFAM, Conjunto Nova República, Bairro Japiim e Conjunto Prosamin Educandos (Figura 1). As amostras de água foram coletadas com o uso da garrafa de van Dorn quando a profundidade encontrava-se acima de 50 cm, nas demais áreas onde a profundidade era inferior a 50 cm foi coleta apenas com uso direto das garrafas de polímero estéreis.

Figura 1: a) Mapa do igarapé do Quarenta desde a nascente até seu desague no Rio Negro. b) Em vermelho estão os pontos de coleta georreferenciados.



Fonte: ArcGis, CPRM.

O material coletado foi devidamente identificado e armazenado em caixa térmica durante o traslado até o Laboratório de Diversidade Microbiológica – LDM do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, onde foi feita as etapas iniciais do trabalho em bancada.

Todo material utilizado para a coleta de água e inoculação foram esterelizados em autoclave (120 °C/1 atm), e postos em estufa a 200 °C para as vidrarias e 40 °C para os plásticos. Os materiais que não podem ser esterilizados em autoclave ou em estufa foram expostos a radiação ultra violeta - UV em capela de fluxo laminar, durante 40 minutos.

Todos os pontos de coletas (Figura 2) que estão dentro do perímetro urbano encontram-se poluídos com diversos rejeitos como: diferentes polímeros, latas, pneus entre outros. As águas apresentam odor desagradável, em maior ou menor intensidade, característicos de despejo de esgotos. Sua coloração varia do translúcido no ponto da nascente convertendo-se a marrom escuro à jusante e, chegando a apresentar cores incomuns como o vermelho e preto. A nascente localizada na área de preservação permanente da UFAM é o único ponto que ainda encontra-se limpa em seu entorno, com a presença de mata ciliar.

Figura 2: Pontos de coleta: A) UFAM (Nascente), B) Conjunto Nova República C) Bairro Japiim, D) PROSAMIM Educandos.



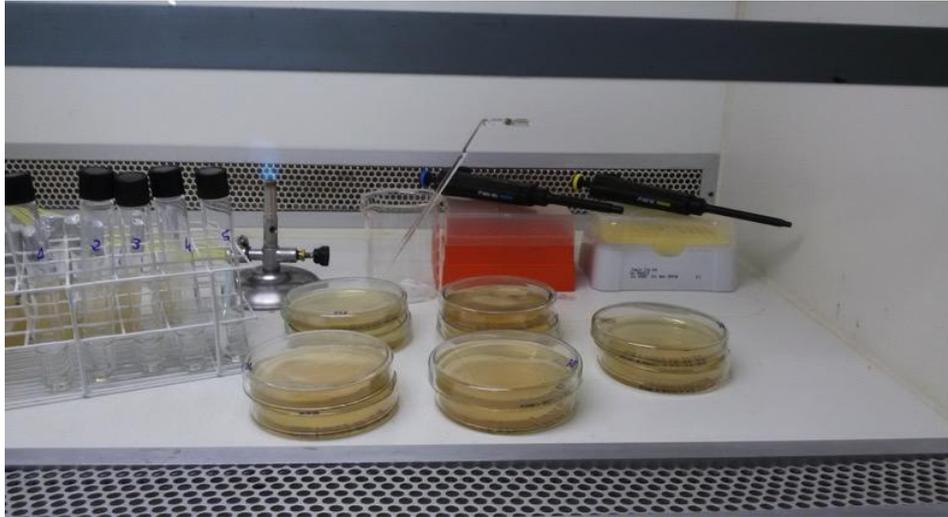
Fonte: Autor

4.2. Cultivo das bactérias em diferentes meios

As amostras foram diluídas em série, onde uma alíquota de 1,0 mL da amostra é retirada e transferida para 9,0 mL de solução salina estéril. Este procedimento é repetido sucessivamente, visando obtenção de diferentes diluições, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (Figura 3).

Para cada diluição foi aplicada uma alíquota de 100 μ L da amostra, por meio da técnica de espalhamento em superfície descrito por Antunes (1995), Neder (1992), Korn-Wendisch e Kutzner (1992), em placas de Petri em meios de cultura: Agar Triptona de Soja – TSA e Luria Bertani - LB, afim de avaliar em qual meio teria o maior número de colônias bacterianas. O experimento foi feito em triplicatas, e incubadas a 30 °C em estufa bacteriológica durante cinco dias.

Figura 3: Técnica de diluição seriada.



Fonte: Autor

4.2.1. Caracterização morfológica, purificação e preservação das bactérias isoladas

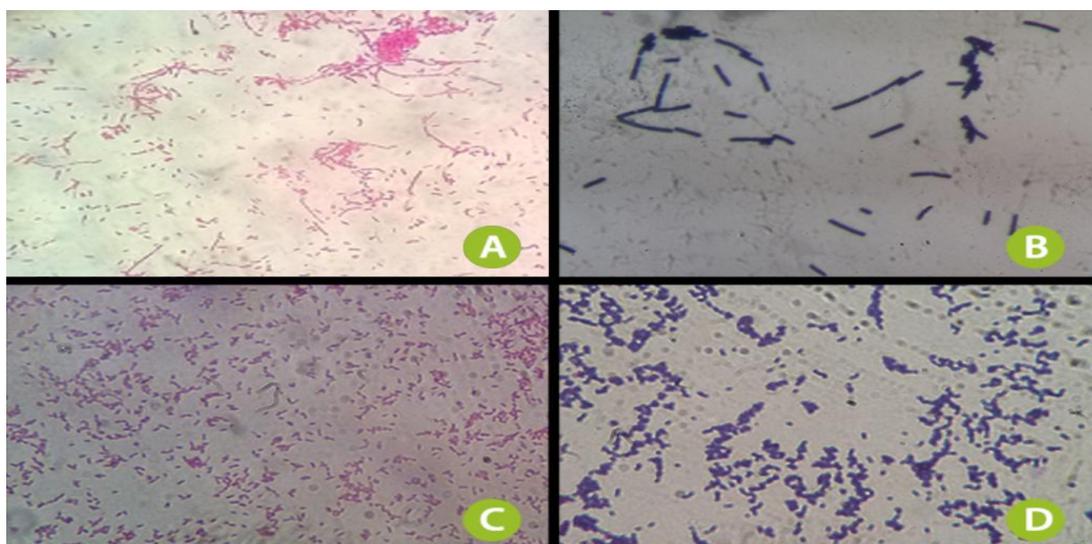
Após os cinco dias de crescimento bacteriano, as placas foram avaliadas quanto aos dois diferentes meios de cultura testados, Agar Triptona de Soja – TSA e Luria Bertani – LB. No entanto, não foram identificadas diferenças significativas no crescimento bacteriano em ambos os meios. Mediante tal similaridade de resultado de crescimento nos dois meios, foi aplicado o segundo critério de escolha, baseada na realização de uma revisão bibliográfica. Dessa maneira, o meio definido para o trabalho foi o Agar Triptona de Soja – TSA nas primeiras etapas do experimento. Para a segunda etapa dos experimentos, o inóculo escolhido para os testes de estresse a condições adversar de pH, tempo e concentração de metal, foi utilizado o meio LB por sua composição simplificada, ausência de agente tamponante e resultado similar ao primeiro meio de cultura escolhido.

As colônias crescidas na diluição 10^{-3} do meio de cultura escolhido, foram repicadas para placas com o meio TSA e submetidas ao processo de purificação por meio de repiques sucessivos em placas de Petri.

A purificação foi comprovada e verificada através do método da coloração de Gram (Figura 4). Em média foram necessários três repiques sucessivos para a purificação das bactérias. No ultimo repique as colônias

purificadas foram estriadas em placas de Petri em triplicata, onde uma placa era composta pelo controle positivo (meio TSA e bactéria) e outras três contendo cromo hexavalente a 0,1 mg e bactéria. Durante três dias a 30 °C em estufa bacteriológica. Após o crescimento, as colônias do controle positivo de cada placa foram coletadas por meio de raspagem e inseridas em microtubos de 1,5 mL em triplicata, contendo glicerol 20% diluído em meio de cultura e mantidas armazenadas em freezer a -20 °C.

Figura 4: Técnica da coloração de Gram A) amostra NR16 (*Proteus* sp.) bacilo Gram negativo; B) amostra NR11 (*Bacillus* sp.) bacilo Gram positivo; C) amostra SC22 (*Acinetobacter* sp.) cocobacilo Gram negativo; D) amostra NR06 (*Vagococcus* sp.) cocos Gram positivo.



Fonte: Autor

4.2.2. Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cromo (VI)

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram conduzidos utilizando-se a técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços, segundo Giovanella et al. (2010), com modificações. Os isolados foram incubados em caldo TSB a 30°C por 24h, estabelecendo-se o parâmetro de turbidez da escala 0,5 de McFarland. Em cada poço foi adicionado 97,5% de caldo TSB (195 µL) com diferentes concentrações de soluções do cromo hexavalente e 2,5% da cultura (5 µL). As concentrações metálicas foram preparadas a partir

de soluções-estoque prontamente diluídas em água Milli Q estéril. O sal metálico utilizado foi o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), com concentrações de 0,1 mg; 1,0 mg; 10 mg; 15 mg; 100 mg; 200 mg, 300 mg e 320 mg (Netzahuatl-Muñoz 2015; Upadhyay et al. 2017).

Os experimentos foram feitos em triplicata, sendo preparados poços com concentrado salino e com inóculo (teste); meio sem concentrado salino e com inóculo (controle positivo de crescimento do inóculo); meio sem concentrado salino e sem inóculo (controle negativo de crescimento do inóculo) e meio com concentrado salino e sem inóculo (controle negativo). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. Uma alíquota de 20 µL de cada poço com concentrado salino e cultura, porém sem turbidez, foram inoculadas em placas de TSA e incubadas a 30°C por 24h. A concentração salina da qual não se obteve crescimento em placa foi considerada a concentração inibitória mínima.

4.3. Identificação molecular

As bactérias isoladas que apresentarem melhores resultados no teste de concentração mínima inibitória, foram submetidas à identificação molecular de acordo com as etapas descritas na sequência.

4.3.1. Extração de DNA bacteriano

Os isolados foram crescidos em meio TSA e incubados a 30 °C por 24 horas. Com um palito estéril foi transferido uma porção da colônia para um microtubo plástico contendo 100 µL de tampão TRIS-EDTA-DEXTROSE, acrescido de 5 µL de lisozima, sendo este homogeneizado e incubado a 37 °C em banho seco durante 30 minutos.

Após, acrescentou-se ao microtubo 10 µL de SDS 10%, procedeu-se a incubação em banho seco a 50 °C por 20 minutos. Foram adicionados 90 µL de acetato de potássio e agitado vigorosamente, em seguida, levado ao congelador por aproximadamente 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.500 rcf, o sobrenadante retirado e transferido para novos microtubos.

Foi adicionado aos novos microtubos 200 μ L de isopropanol puro, deixando agir por cinco minutos, sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.500 rcf, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 70%.

Nova centrifugação foi realizada por cinco minutos a 16.000 rcf, descartado o sobrenadante e o microtubo contendo o DNA precipitado colocado para secar com a tampa aberta em capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. Após seco, o DNA foi reidratado com 30 μ L de TE + RNase, incubado durante cinco minutos em banho seco a 37 °C, para que a RNase agisse. Ao término do processo os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados no congelador até a realização do gel de quantificação (Mota et al., 2009).

4.3.2. Quantificação do DNA extraído

A quantificação por fluorescência consiste, basicamente, na adição de um fluorocromo (ex. Brometo de Etídio) que se liga ao DNA e que, ao ser submetido a uma fonte de luz ultravioleta emite fluorescência, sendo a quantificação verificada pela quantidade da fluorescência emitida (Sambrook & Russel, 2001).

Para quantificação foi utilizado uma alíquota de 2 μ L de DNA extraído, adicionado a 3 μ L de tampão de corrida (TEB 5X - Azul de Bromofenol) seguida de uma breve homogeneização com a micropipeta. As amostras adicionadas de tampão foram carregadas em 100 mL de gel de agarose 1%, que foi preparado previamente com tampão TEB 1X e adicionado 1 μ L de brometo de etídio (10 mg/mL).

O gel contendo as amostras foi transferido para uma cuba de eletroforese e adicionado solução tampão TEB 1X em volume suficiente para cobrir o gel. A eletroforese foi realizada utilizando uma voltagem de 100 V por cerca de 30 minutos e, após isto, o gel transferido para um transiluminador UV para visualização da fluorescência, sendo a quantificação determinada pela intensidade da emissão (Sambrook & Russel, 2001).

4.3.3. Amplificação do 16S

A amplificação do 16S rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR, utilizando-se os *primers* para bactéria 400 F (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG -3') and 1492R (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1,0 µL de DNA molde (10 ng/µL); 1,0 µL de cada *primer* 10 mM; 2,5 µL de dNTPs 2,5 mM; 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µL de Tampão 10X e 0,3 µL da enzima Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 15,2 µL de água Milli-Q, num volume final de 25 µL.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador da marca MyGenie 96 Thermal Block da Bioneer, proGramado para realizar uma desnaturação inicial a 95 °C por 40 segundos, 30 ciclos compreendendo desnaturação a 95 °C por 25 segundos, anelamento de 59 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos, seguida de extensão final a 72 °C por sete minutos.

O produto das reações foi analisado em gel de agarose (1% p/v) para visualização dos fragmentos.

4.3.4. Purificação do produto da PCR

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados, foram purificados por meio de solução de *Polyethylene glycol* (PEG 6000), a fim de que os restos de *primers* e de dNTPs não utilizados durante o processo de amplificação fossem removidos (digeridos) por uma enzima com o intuito de evitar interferências no processo de sequenciamento das amostras.

Foram utilizados 10 µL do produto da PCR + 10 µL de PEG e incubados em banho maria a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.500 rcf por 15 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 125 µL de etanol 80%.

Uma nova centrifugação foi realizada durante dois minutos a 1.450 rcf, descartado o sobrenadante e o microtubo contendo o precipitado colocado para secar com a tampa aberta em capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. Após seco, o precipitado foi reidratado com a adição de 14 µL de água Milli-Q.

4.3.5. Identificação dos isolados

As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA pelo sequenciamento foram utilizadas para identificação dos isolados, por meio do banco de dados *16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)* do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), através do *BLASTn*[®]. Foram consideradas sequências com dissimilaridades menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

4.4. Determinação de Cr(VI): Método da s-difenilcarbazida

Para a realização da etapa de quantificação do cromo (VI) nos isolados selecionados, foi necessário realizar a padronização do valor de crescimento bacteriano de cada amostra, antes das mesmas serem enviadas ao laboratório de química analítica. Na padronização dos selecionados, os mesmos foram crescidos em meio LB por 16h a 30°C, sob agitação de 150 rpm. O método selecionado para a quantificação do Cr (VI) foi o 3500 – D do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012) que consiste na reação da difenilcarbazida em meio ácido com o Cr (VI), resultando na formação de um complexo de coloração vermelha onde é determinada a sua absorvância em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm.

Retirando-se 1 mL do pré-inóculo para realizar a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, e ressuspendendo o *pellet* bacteriano em 100 µL de solução salina 0,85%. Após a centrifugação aferiu-se a densidade celular da suspensão em espectrofotômetro a 600 nm (10 µL de suspensão + 990 µL de solução salina). Em seguida, foi retirado um volume da suspensão bacteriana preparada (inóculo), adicionando esta ao meio contendo 50 mL de meio LB.

Por fim, foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 600 nm para que o mesmo fosse padronizado a 0,01 de transmitância. Para chegar a este padrão foi seguido o cálculo da concentração ($C_1.V_1=C_2.V_2$), usando o valor da absorvância da suspensão x volume retirado (mL) = 0.01 (absorvância desejada) x 50 mL (volume final). Com o inóculo padronizado deu-

se início ao experimento de quantificação do cromo (VI) em cada meio de cultura.

As amostras contendo a combinação meio de cultura + bactéria + metal foram centrifugadas (Modelo NT 810, Nova Técnica) para remoção da massa bacteriana, para a utilização somente do sobrenadante, sendo este transferido para um balão volumétrico de 200 mL. Após aferição do volume, uma alíquota de 25 mL foi transferida para um tubo falcon onde foram adicionados 250 µL de H₃PO₄ P.A. seguido de aferição do pH em pHmetro digital (Modelo Orion Star A211, Thermo Scientific) devendo estar no padrão de 1,0±0,3, onde este foi corrigido com a adição de H₂SO₄ 0,2 N para as amostras que não estavam dentro deste padrão. As amostras acidificadas foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL, aferidas e acrescidas de 2 mL de difenilcarbazida para desenvolvimento da cor. Todas estas etapas foram seguidas para a elaboração da curva de calibração (Faixa de trabalho: 0,01 – 1,0 mg/L, Gráfico 1), o branco e o controle com exceção da etapa de centrifugação.

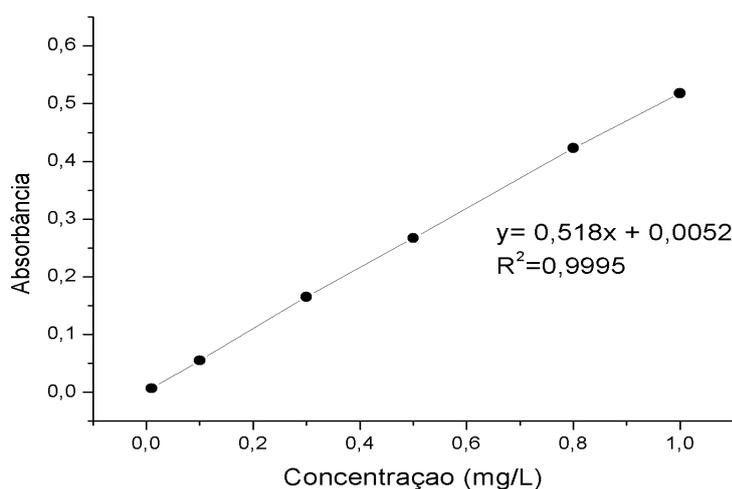


Gráfico 1: Curva analítica para aferição de cromo hexavalente pelo método da difenilcarbazida.

Após estabilização da cor, as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV/VIS Thermo Aquamate Plus em comprimento de 540 nm. Por meio dos resultados deste teste um dos isolados será selecionado para dar continuidade aos demais experimentos.

4.5. Perfil de crescimento bacteriano em cromo hexavalente

Após a etapa do crescimento bacteriano em meio com cromo (VI), foi selecionada a melhor bactéria para ser traçado o perfil de crescimento em meio ao metal. A bactéria selecionada NR06 pertencente ao gênero *Vagococcus sp.* apresentou desempenho significativo no processo de redução do Cr (VI) via método difenilcarbazida. Sendo ela posta a crescer em 30 mL de caldo Luria Bertani – LB uma vez que este meio possui a ausência de agentes tamponantes em sua composição possibilitando avaliar a variação do pH referente à redução do Cr(VI) pelo isolado ao longo das 72h. Seu crescimento ocorreu por 16h a 30°C, sob agitação de 150 rpm para o preparo do pré-inóculo.

A partir do crescimento do pré-inóculo, foi preparado o inóculo padronizado, que será utilizado no experimento. Retirando-se 1 mL do pré-inóculo para realizar a centrifugação a 10.000 rpm por 5 min, descartando-se o sobrenadante, e ressuspensando o *pellet* bacteriano em 100 µL de solução salina 0,85%. Após a centrifugação aferiu-se a densidade celular da suspensão em espectrofotômetro a 600 nm (10 µL de suspensão + 990 µL de solução salina). Em seguida, foi retirado um volume da suspensão bacteriana preparada (inóculo), adicionando esta ao meio contendo 50 mL de meio LB.

Por fim, foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm para que o mesmo fosse padronizado a 0,01 de transmitância. Para chegar a este padrão foi seguido o cálculo da concentração ($C_1.V_1=C_2.V_2$), usando o valor da absorbância da suspensão x volume retirado (mL) = 0.01 (absorbância desejada) x 50 mL (volume final).

Com o inóculo padronizado deu-se início ao experimento objetivando caracterizar seu perfil de crescimento, por meio de um sistema montado que consistiu de quatro erlenmeyers contendo 30 mL de meio LB diluído em água da nascente do igarapé do Quarenta acrescido do inóculo de *Vagococcus sp.*, E um segundo sistema contendo quatro erlenmeyers com 30 mL de meio LB diluído em água da nascente do igarapé do Quarenta, localizada no bairro Armando Mendes e do inóculo NR06 (*Vagococcus sp.*) acrescido de cromo na concentração de 300 mg/L. Com isso, foi gerada uma curva de crescimento

com base na aferição do inóculo em espectrofotômetro a 600 nm com intervalos de 24h, durante três dias de observação.

4.6. Aplicação da cepa em microambiente controlado

A fim de avaliar o potencial reducional do cromo VI, o inóculo NR06 foi posto em ambiente similar ao que se encontra *in vivo*. Para maior fidelidade ao meio ambiente, o teste foi feito com água da nascente do Igarapé do Quarenta localizada no bairro Armando Mendes, próximo ao Instituto Federal do Amazonas da Zona Leste com coordenadas 59°56'07" W e 3°05'08"S.

A amostra de água foi filtrada em pré-filtro de 1,2 µm em seguida em filtro 0,45 µm para remoção do material particulado suspenso, restando somente os componentes dissolvidos da água como íons, metais e material orgânico dissolvido. Após essa etapa, a amostra foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Após o processo de padronização da água, o experimento foi montado da seguinte maneira: Foram montados quatro testes, onde temos o controle composto por água da nascente + metal; um teste com nutriente composto por água da nascente + metal + meio LB + bactéria e uma duplicata do experimento sem nutriente contendo água da nascente + metal + bactéria.

Os béquers utilizados nos experimentos foram lavados e esterilizados antes do seu uso. Cada amostra continha o equivalente a 250 mL da água da nascente com Cr (VI) a 10 mg/L, inserido pela diluição de dicromato de potássio (Padrão primário). O inóculo bacteriano NR06 foi padronizado em espectrofotômetro a 0,01 de transmitância o que corresponde a escala 0,5 de McFarland, valor de crescimento mínimo de bactéria, para que fosse possível ser realizada uma avaliação de crescimento bacteriano de forma mais sensível e perceptível.

Para simular a aeração da água, foi inserido um compressor de ar em cada sistema de teste e para a padronização dos valores de cromo obtidos durante o teste, foi retirada uma quantidade inicial de cada sistema para a primeira quantificação do Cr (VI) pelo método da difenilcarbazida, antes de inserir o inóculo em cada sistema. Após inserir a bactéria nos respectivos experimentos, a retirada e leitura da concentração de Cr (VI) foi efetuada a

cada 12 horas até o tempo final de 72h. Paralelamente, foi realizada a leitura do pH com um pHmetro de bancada Tekna modelo T-1000.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Bactérias resistentes ao cromo VI (CIM)

Foram isolados 84 cepas, morfologicamente diferentes, sendo 20 obtidas na coleta do conjunto Nova República, 15 no igarapé da Universidade Federal do Amazonas - UFAM considerada umas das nascentes do igarapé do Quarenta, 23 no igarapé ao lado da Secretaria de Estado de Educação – SEDUC e 26 no Prosamim Educandos. Cada um dos isolados passaram pelo teste de resistência a concentrações máximas de Cr VI.

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, onde foram adicionados os controles e os testes, como já descritos detalhadamente na metodologia, cada placa foi armazenada em B.O.D com observação a olho nu de turvação de meio a cada 24h durante três dias.

Após as 72h de avaliação da turvação, o meio sem turvação foi selecionado e repicado em placa de petri com a mesma concentração inibitória selecionada, sendo este avaliado por mais três dias.

Ao fim deste processo, foi observado que 100% dos 84 isolados foram resistentes a concentrações de 0,1; 1,0; 10; 15 e 100 mg/L. 65% dos 84 isolados foram resistentes a concentrações até 200 mg, apenas 27% dos 84 isolados, foram resistentes a concentração de até 300 mg e nenhum resistiu a concentração de 320 mg/L de Cr VI. Os mecanismos de resistência apresentados pelas bactérias endêmicas de locais impactados por metais pesados estão intimamente relacionados a capacidade de adaptação a estas condições. Desta forma estes micro-organismos se proliferam e se tornam dominantes, pois utilizam os substratos poluentes como fonte de nutrientes (Kuiper et al., 2004).

Os 23 indivíduos selecionados, representando 27% destes 84 isolados, foram utilizados para as demais etapas seguintes do trabalho. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram em grande parte com os encontrados nos trabalhos de Sotero-Martins et al. (2014) avaliando o potencial de biorremediação de bactérias isoladas das praias da Baía de Guanabara, observaram que 25,2% dos micro-organismos apresentaram resistência a cromo de até 1 µg/L (0,0192 mmol/L).

Minari et al. (2016), avaliou a capacidade de resistência de diferentes cepas bacterianas em meios contendo íons de cádmio, crômio, níquel, zinco e mercúrio para possível aplicação em biorremediação de solos contaminados com esses metais, obtendo 40% dos micro-organismos resistentes a cromo na concentração de 3,0 mmol /L.

Samanta et al. (2012), ao caracterizarem um dos seus isolados notaram a resistência a Cr VI de 0,75 mg/mL (14,42 mmol/L). El Baz et al. (2015) investigou a resistência de metais pesados e o potencial de bioacumulação de linhagens de actinobactérias isoladas de áreas de mineração abandonadas, e encontrou 59 actinobactérias resistentes a cromo na concentrações de 0,15 mg/mL.

Esta capacidade de tolerância está associada a mecanismos de resistência, codificados por genes cromossomais e plasmidiais e incluem as bombas de efluxo, o acúmulo e complexação do metal dentro da célula e a redução química do contaminante a uma forma menos tóxica (Abdelatey et al., 2011). Possibilitando assim a utilização destes micro-organismos em processos de biorremediação, que consistem na utilização de agentes biológicos para transformar ou remover resíduos tóxicos ambientais (Krastanov et al., 2013).

5.2. Caracterização morfológica

Através da técnica de coloração de Gram foi observada a predominância de bacilos Gram negativos e cocos Gram negativo com 28% cada, 26% de cocos Gram positivos, 14% de bacilos Gram positivos e apenas 2% de cocobacilos Gram negativos. Tais resultados podem ser comparados com os obtidos nos estudos de Conceição et al. 2007, que isolaram bactérias do gênero *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Aureobacterium*, *Aeromonas* e *Xanthobacter* com resistência a concentrações de 500 à 750 mg/L de cromo hexavalente. Bazine e Spagiari (2016) encontraram resistência ao cromo hexavalente em *Acetobacter acetii*, bacilo Gram negativo e *Micrococcus luteus*, cocos Gram positivo na concentração de 300 mg/L obtendo 36 e 38% de redução do metal no meio. Assim também Batool et al. (2015) avaliaram cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Ochrobactrum intermedium*, ambos bacilos Gram negativos quanto sua resistência ao cromo hexavalente nas concentrações de 100, 500 e

1000 µg/mL. Neste estudo, a maioria das bactérias isoladas são Gram negativas, o que em alguns casos está relacionada à patogeneidade das mesmas, sendo todavia necessária a confirmação dessa característica.

Esta resistência a contaminantes como os metais pesados pode ser inerente de alguns microrganismos podendo ser desenvolvida por características do genoma e metabólicas (Lopes et al., 2011). Todavia, a exposição prolongada a contaminantes pode favorecer a seleção e proliferação de micro-organismos tolerantes ao estresse causado por estes (Hutchinson & Symington, 1997).

5.3. Identificação dos isolados resistentes via 16S

Foram identificados, através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, um total de 18 bactérias isoladas de trechos do igarapé do Quarenta. Tendo como critério de seleção para o sequenciamento o potencial biotecnológico apresentado pelas bactérias testadas.

Para realizar o processo de identificação por similaridade das sequências foi utilizado o programa BLASTn por meio da base de dados 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea no *GenBank*[®] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), onde mostra que o percentual de identidade entre sequências completas do gene 16S, refletem a confiança em se classificar taxonomicamente isolados bacterianos. De maneira que resultados com identidade de 94,5 % ou inferior é uma forte evidência para gêneros distintos; 86,5 % ou inferior é característico de famílias distintas; 82,0 % ou inferior detecta ordens distintas; 78,5 % ou inferior é forte evidência para classes distintas e 75,0 % ou inferior é forte evidência para filos distintos (YARZA et al., 2014).

O resultado na distribuição das sequências permitiu identificar 12 gêneros entre as linhagens, sendo a grande maioria pertence ao filo Proteobacteria com predominância da classe Gammaproteobacteria. Abaixo são mostradas as linhagens e suas respectivas identificações de similaridade do 16S rDNA que variaram de 99 a 100% utilizando fragmentos de 400 pb (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação de sequências do gene 16S rDNA de bactérias isoladas de trechos do igarapé do Quarenta com as sequências contidas no banco de dados do GenBank através da ferramenta Blastn

Isolado	Local	Identificação	Número de Acesso	Similaridade (%)
02	Nova República	<i>Serratia</i> sp.	KY404159.1	99
06	Nova República	<i>Vagococcus</i> sp.	KJ626243.1	100
10	Nova República	<i>Proteus</i> sp.	KY007581.1	100
11	Nova República	<i>Bacillus</i> sp.	KY427112.1	99
13	Nova República	<i>Proteus</i> sp	KX702380.1	99
16	Nova República	<i>Proteus</i> sp	KR189229.1	99
19	Nova República	<i>Proteus</i> sp	KX702380.1	100
10	Seduc	<i>Klebsiella</i> sp.	CP015134.1	100
12	Seduc	<i>Acidovorax</i> sp.	KM603662.1	99
14	Seduc	<i>Micrococcus</i> sp.	KX356328.1	99
15	Seduc	<i>Alicyclophilus</i> sp.	LC097202.1	100
16	Seduc	<i>Acinetobacter</i> sp.	KU991267.1	100
22	Seduc	<i>Acinetobacter</i> sp	KJ396945.1	100
23	Seduc	<i>Comamonas</i> sp.	LT576263.1	99
02	Prosamim	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX098359.1	100
08	Prosamim	<i>Enterobacter</i> sp.	KU145660.1	99
16	Prosamim	<i>Bacillus</i> sp.	KX130958.1	99
17	Prosamim	<i>Acinetobacter</i> sp.	KT203431.1	100

Os níveis de resistência e capacidade de reduzir o cromo hexavalente observados neste trabalho foram satisfatórios quanto a quantidade de metal introduzida no meio (300 mg/L), uma vez que esta não é uma concentração

comumente encontrada nos efluentes do igarapé do Quarenta ao longo dos últimos anos por meio de revisão realizada em artigos de Bringel (1986), Sampaio (2000), Dias (2001), Guedes (2003) e Torrezani 2016.

Os gêneros bacterianos encontrados nos pontos de coleta do igarapé do Quarenta mostram mais uma vez que em sua maioria são cepas Gram negativas e patogênicas, tais resultados encontrados foram similares aos identificados nos trabalhos de Mishra et al. (2011) que isolaram *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus*, e estas foram capazes de reduzir 500 ppm de cromo hexavalente. As espécies *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus* toleraram e reduziram cromo em concentrações que variaram de 500 a 1000 mg/L.

MClean e Beveridge (2001), Basu et al. (1997), Losi e Frankenberger (1994), Bopp et al. (1983), mostraram micro-organismos de gêneros também encontrados no igarapé do Quarenta, capazes de tolerar e reduzir concentrações de cromo hexavalente em valores que variaram de 10 a 1500 mg/L. Dessa maneira é possível afirmar que a contaminação por determinado metal no ambiente, aumenta o nível de resistência da comunidade bacteriana local ao metal (Malik et al., 2002).

Akinbowale et al. (2007) encontraram resistência bacteriana ao cromo bem como a outros metais em *Pseudomonas* e *Aeromonas*, em concentrações que variaram de 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Matyar et al. (2010), estudando os sedimentos da baía de Iskenderum na Turquia, isolaram *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *Stenotrophomonas maltophilia*, que apresentaram grande resistência ao Cd, Cu e Cr, em concentrações similares a este trabalho realizado bem como aos já citados nele.

Estes estudos revelam que existem diferenças nas concentrações de metais pesados na água e nos sedimentos, de diferentes regiões de acordo com as atividades antrópicas realizadas, o que reflete no perfil de resistência bacteriana. Possibilitando a utilização destes micro-organismos em processos de biorremediação, que consistem na utilização de agentes biológicos para transformar ou remover resíduos tóxicos ambientais (Krastanov et al., 2013).

5.4. Avaliação do potencial de redução do Cr(VI) pelas cepas selecionadas.

Conforme observa-se no Gráfico 2, dos 23 isolados resistentes de interesse biotecnológico, apenas o NR2 apresentou redução de 18% de cromo. Os indivíduos AC13, AC19 e NR19 reduziram 20% já os indivíduos da população SC14, 15, 22 e 23 reduziram 30%, a redução de 40% foi dos indivíduos AC17 e SC11, As bactérias mais eficientes na redução (capazes de reduzir acima de 50% do cromo) foram os isolados AC16, NR10, NR13, NR8, SC12, SC16, AC8, NR16 e NR06. Este último isolado foi o mais eficiente na redução, transformando 97% do Cr (VI) a Cr (III). O mesmo foi selecionado para dar continuidade aos testes de redução e tolerância ao cromo (VI).

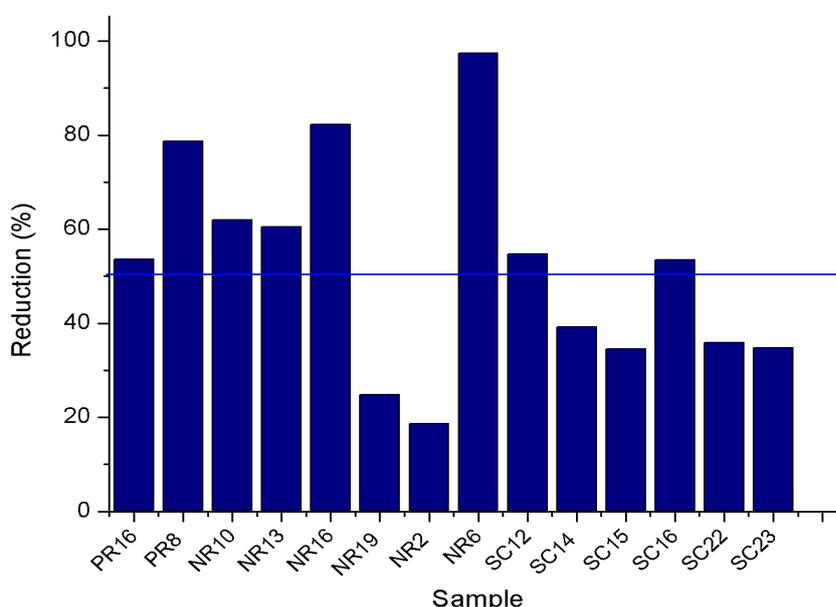


Gráfico 2: Níveis de degradação do cromo (VI) a 300 mg/L pelas cepas selecionadas.

Por meio destes dados gerados no teste, notamos a eficiência bacteriana em tolerar esta concentração de cromo determinada para o experimento. Nota-se também que cada cepa apresenta um mecanismo diferente de tolerância, entre estes mecanismos de resistência a elevadas concentrações de cromo pode-se citar o acúmulo intracelular, baixa absorção e o mecanismo de redução enzimática observados em vários trabalhos

envolvendo bactérias redutores de cromo hexavalente (Elangovan et al., 2006; Iftikhar et al., 2007; Patra et al., 2010; Chirwa & Molokwane, 2011; Tripathi & Garg, 2013; Yu et al., 2016). Uma vez que nem todas foram capazes de reduzir o Cr (VI) como observado nos indivíduos NR2, AC13, AC19 e NR19 com redução máxima de 20% do metal.

As pesquisas voltadas para bactérias resistentes a cromo hexavalente tem sido uma constante em tempos atuais, mediante os altos índices de poluentes lançados em nossos ecossistemas, trabalhos como os de Malik et al. (2002), Resende et al. (2012), Krastanov et al. (2013), Joutey et al. (2015) e muitos outros nos mostram que seus mecanismos de tolerância e resistência são fisiológicos, bem como também podem ser adquiridos, mediante alguma fonte de estresse ambiental de origem antrópica. Uma vez que a tolerância aos metais é maior e mais eficiente em micro-organismos endêmicos de áreas impactadas, mediante a pressão de seleção exercida pelo ambiente nas comunidades microbianas ali presentes do que em micro-organismos pouco ou nunca expostos a contaminação por metais.

5.5. Perfil de crescimento do inóculo NR06

Apresentando o melhor percentual de redução do cromo (VI) o inóculo NR06, foi escolhido para a realização da caracterização do perfil de crescimento em meio com concentração limite de cromo hexavalente determinada (300 mg/L) em relação ao meio sem o metal. Para a realização do experimento foi utilizada o inóculo previamente padronizado a densidade óptica de 0,1 em espectrofotômetro a 600 nm, após esta etapa, deu-se início ao processo de avaliação do perfil de crescimento bacteriano.

A cada 24h durante três dias, foi aferida a leitura de densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm, a fim de observar a tolerância do inóculo quanto ao cromo. O experimento foi realizado em quadruplicatas a fim de reduzir possíveis erros estatísticos. Em paralelo a leitura do crescimento bacteriano, foi realizada também a leitura da densidade óptica do inóculo em espectrofotômetro a 540 nm para avaliação da redução do cromo, através da técnica da s-difenilcarbazida.

Com isso, obteve-se como resultado um crescimento exponencial e esperado em meio sem cromo logo nas primeiras 12 horas como mostra o Gráfico 3A. Em contrapartida NR06 em meio com cromo (VI) apresentou uma redução significativa em sua velocidade de crescimento celular nas primeiras horas, como observado no Gráfico 3B.

Nota-se que o inóculo passou por um processo de adaptação (fase lag) ao meio, com uma alta concentração de cromo nas primeiras 24 horas. Após esta etapa o inóculo deu um salto em relação ao crescimento, mostrando que a bactéria do gênero *Vagococcus* possui capacidade de redução do cromo após passar por um processo de adaptação, levando a mesma a utilizar de seu arsenal metabólico para desempenhar uma melhor resposta ao meio contaminado.

Em 48 horas a bactéria atingiu seu ápice de crescimento e adaptação ao meio com metal, sugerindo uma redução significativa de cromo. Seu declínio no crescimento foi acompanhado após 72h.

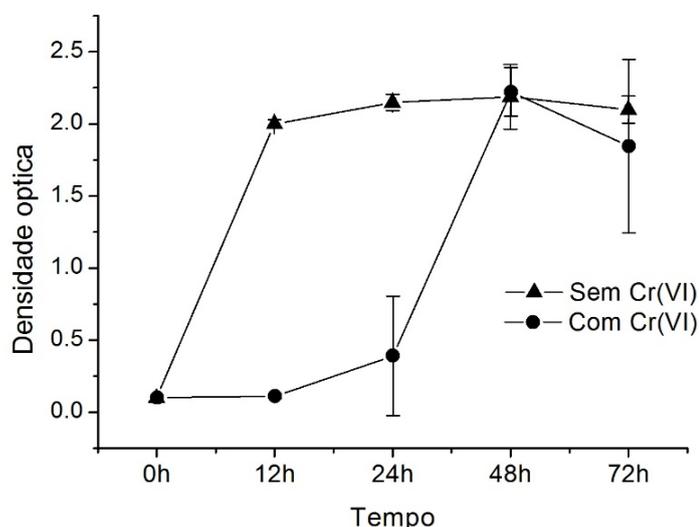


Gráfico 3: Índice de crescimento sem cromo (VI) (A) e com cromo (VI) (B), durante 72h com aferição de densidade óptica.

Diante a exposição ao cromo (VI) o inóculo apresentou uma redução acima de 50%, nas primeiras 24h (Gráfico 4), embora seu crescimento exponencial se deu após as 24h. O que nos mostra que seu potencial de resistência não está relacionado diretamente a sua quantidade de células multiplicadas, mas sim ao seu potencial de redução do metal. Em 72h de exposição bacteriana ao metal, notou-se o consumo total do metal.

Esta relação tempo vs concentração de cromo, nos evidência que a bactéria NR06 do gênero *Vagococcus* apresenta um grande potencial biotecnológico para uso na biorremediação de cromo (VI) em efluentes contaminados. Como visto no trabalho de Shakoori e Muneer (2002), onde mostra que o gênero *Vagococcus* é capaz de reduzir cromo (VI) na concentração de 400 mg/L, sendo este um valor um pouco acima do testado neste trabalho.

Segundo Christ et al. (2012), a elevada resistência ao cromo (VI) assim como a alta capacidade de redução do cromo (VI) torna uma cepa bacteriana uma candidata adequada para uma boa remediação do metal. Tendo como pontos positivos para uso na biorremediação, um bom crescimento em meio ambiente impactado, uma adaptação em tempo hábil e uma grande resistência metabólica, fácil manuseio e baixo custo. Essas características são fundamentais para um micro-organismo ser considerado apto para uso biotecnológico.

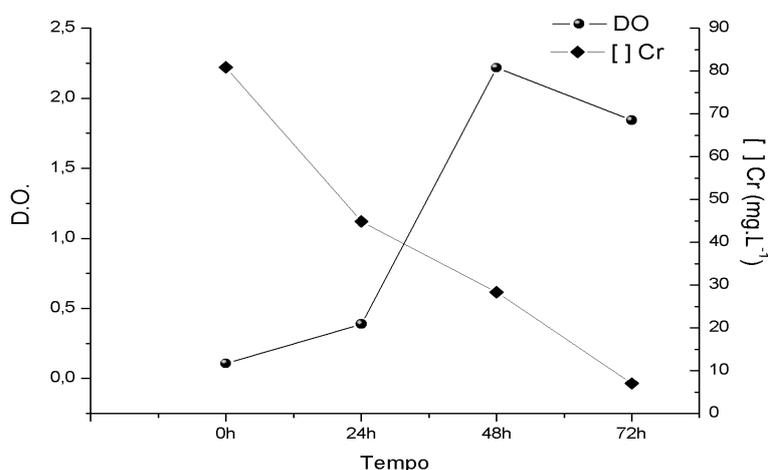


Gráfico 4: Relação tempo, densidade óptica e consumo de cromo (VI) do isolado NR06.

5.6. Simulação *in vitro* de redução de cromo em ambiente

Para avaliação do isolado em condições próximas as encontradas em ambiente natural, propôs-se um ensaio objetivando observar fatores que podem vir a influenciar a taxa de crescimento bem como a capacidade do

isolado NR06 em reduzir o Cr(VI), sendo estes: concentração de cromo (VI) próxima ao encontrado em ambientes minimamente impactados por este metal, tempo e pH.

Para isto foram testados: um controle contendo apenas água do igarapé do Quarenta. Meio de cultivo LB com o isolado NR06 e metal; isolado NR06, meio LB e metal; metal e LB; A variação da concentração do Cr(VI) ao longo de 72 h pode ser observada no Gráfico 5. Utilizou-se como fonte de carbono no experimento o meio de cultura Luria Bertani - LB por ser um meio também bastante elencado em testes com metais e de composição simples de forma a interferir minimamente na redução de metais.

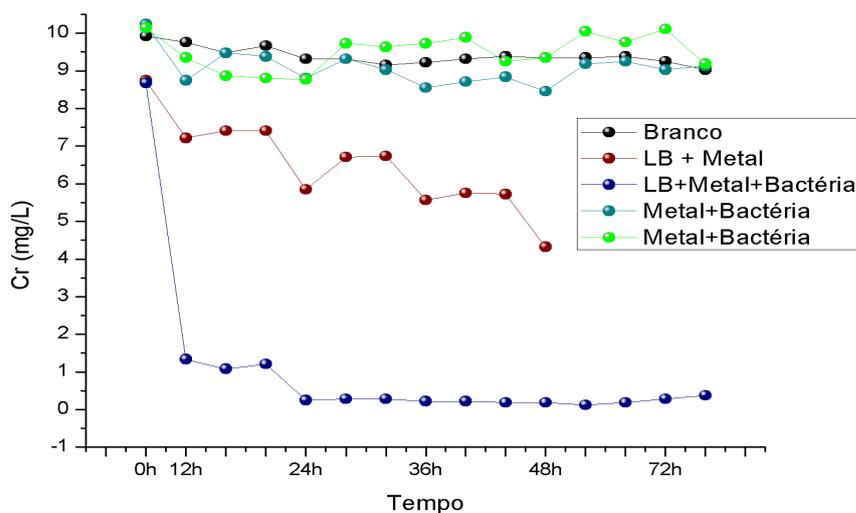


Gráfico 5: Variação na concentração de cromo (VI) em 72 horas nos diferentes experimentos.

A redução do Cr VI nos experimentos contendo apenas metal e bactéria pouco se distanciaram do branco (ausência da bactéria). A matéria orgânica dissolvida presente na água filtrada mostrou-se ser um nutriente pouco eficaz para promoção do crescimento bacteriano no tempo avaliado. Comprovando que para melhor eficiência do desenvolvimento celular e, conseqüentemente, no processo de redução do cromo faz-se necessário o acréscimo de uma fonte de carbono mais fácil de ser metabolizada pela célula bacteriana.

No experimento contendo meio LB + Cr (VI), verificou-se que há redução do metal pelo próprio meio (Gráfico 6), porém, em comparação com o

desempenho da bactéria, esta se mostrou mais eficaz por reduzir quase todo o cromo em menos tempo.

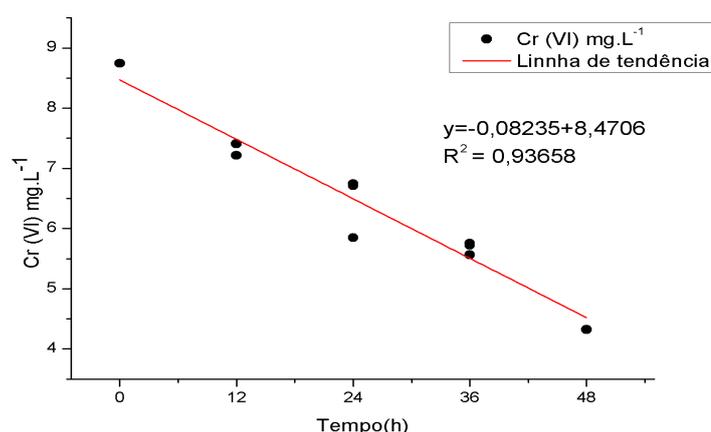


Gráfico 6: Variação na concentração de Cr (VI) em meio LB.

Ao longo do período de 72h foi observado que o isolado NR06 acrescido de meio LB e cromo, teve um consumo significativo do metal nas primeiras 12h, com valores acima de 80%. No decorrer das 24h o consumo atingiu seu ápice, sendo estabilizado e mantido no decorrer das 48h, ao final do terceiro dia notou-se a total ausência do cromo no meio de cultura.

Trabalhos como os de Mishra et al. (2011), Resende et al. (2012), Ge et al. (2013), evidenciam o uso de bactérias em testes de simulação controlada de ambientes contaminados por metais pesados com altas concentrações e sua capacidade de reduzir tais metais, mostrando que o tempo de redução do metal ocorre em média nas primeiras 24h após o contato com o metal, podendo este tempo variar para mais ou menos dependendo da concentração do metal e a capacidade de adaptação da bactéria.

Avaliando a variação do pH ao longo do tempo nos diferentes experimentos (Gráfico 7), verificou-se que o pH da amostra LB+Metal+Bactéria variou de forma distinta dos demais. Esse aumento do pH se deve ao consumo de íons H^+ no processo de redução do cromo, conforme explicito na seguinte reação (Brandhuber et al., 2004): $CrO_4^{2-} + 8H^+ + 3e^- = Cr^{3+} + 4H_2O$

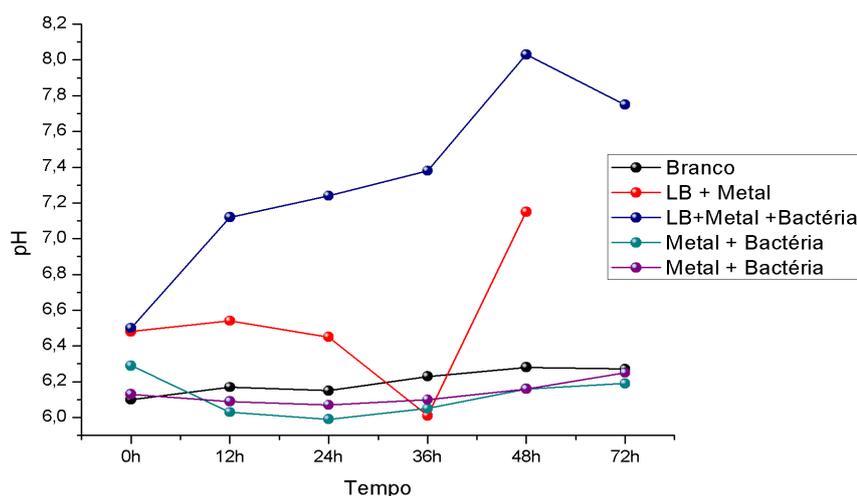


Gráfico 7: Relação pH e tempo de consumo do Cr (VI) do isolado NR06.

Trabalhos como os de Shakoori e Muneer (2002), Shakoori et al. (2010), Mishra et al. (2011) e Santana et al. (2012), também mostram uma ampla faixa de pH consideradas ideais no processo de remoção de metais do meio. Junto a esta informação, está a capacidade de tolerar, resistir e reduzir o Cr (VI) a Cr (III), em ambientes altamente contaminados pelo metal. Conforme Conceição et al. (2007), microrganismos possuem a capacidade de se adaptarem às diversas variações ambientais, para isto sendo necessária a capacidade de manter o pH intracelular em torno de 7,5, onde este é alcançado por meio da extrusão ou intrusão de íons H^+ pela célula microbiana. Segundo o mesmo autor, este contexto colabora com a redução do Cr(VI) que é favorecida em pH na faixa de 7,0 a 8,0. Corroborando assim, com os dados gerados neste trabalho, que elucidam por meio de gráficos que, a medida que o pH aumenta, a concentração de cromo diminui ao longo das 72h.

Inversamente a estes dados, notamos que os testes realizados com o controle e as duplicatas de metal + bactéria, mostra que sem uma fonte minimamente rica de nutriente a bactéria não consegue se desenvolver e reduzir o metal. Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para cada replicata (N=15) com nível de significância de 0,05. Os valores de $W_{\text{calculado}}$ (0,9248 e 0,9297) foram maiores que o $W_{\text{crítico}}$ (0,881), assumindo-se a normalidade do conjunto de amostras. Após a análise da variância, foi possível observar que as populações não são significativamente diferentes entre si ($F_{\text{estatística}} = 0,9029$, p-

valor = 0,851). Portanto, ao longo das 72h de incubação a concentração de Cr(VI) reduziu em média 10,14% na ausência de nutrientes, enquanto que, com a adição de nutrientes, a redução final observada foi de 96,18%, sendo que nas primeiras 12h de incubação foi observada a redução de 86,11% na concentração de Cr(VI).

Desta forma conclui-se que a aplicação da bactéria do gênero *Vagococcus* sp. apresentou resultados promissores quanto a biorremediação do cromo (VI), mediante aos fatores externos que podem influenciar na redução do Cr(VI).

6. CONCLUSÃO

O aproveitamento da microbiota local na remediação dos contaminantes abundantes neste mesmo local consiste em uma ação altamente promissora devido à fatores de adaptação dessas espécies a essas situações extremas. Com relação ao Cr (VI) apenas uma pequena quantidade de cepas isoladas do igarapé do Quarenta mostraram resistência à uma quantidade alta deste metal (300 mg/L), sendo que, além da resistência a cepa do gênero *Vagococcus* sp. destacou-se por reduzir mais de 90% deste em apenas 72 horas. Este estudo é o primeiro a relatar o potencial desse gênero isolado de um dos principais igarapés do município de Manaus-AM para aplicação na remediação de metais tóxicos. Recomenda-se para estudos futuros o aprofundamento do conhecimento acerca dessa espécie,afim de elucidar que mecanismos estão envolvidos no processo de resistência e redução para o Cr(VI) e outros metais tóxicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELATEY, L.M. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in egyptian soils. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 6, n. 2, p. 201–211, 2011.

APHA - American Public Health Association. Standard Methods of the Experimentation of Water and Wastewater.– WPCF, New York, 2012.

ALVAREZ, A.H.; MORENO-SANCHEZ, R.; CERVANTE, C. Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 23, p. 7398-7400, 1999.

AKINBOWALE, O.L. et al. Antibiotic resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, n. 30, p. 177-182, 2007.

AMOR, L.; KENNES, C.; VEIGA, M.C. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 78, p.181-185, 2001.

ANTUNES, G.S. Manual de Diagnóstico Bacteriológico. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS 278p., 1995.

ASMATULLAH, S.N.; SHAKOORI, A.R. Hexavalent chromium induced congenital abnormalities in chick embryos. **Journal of Applied Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 167-171,1998.

ATLAS, R.M.; BARTHA R. Fundamentals and Applications. 4th Edn, Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California, p. 523-530, 1998.

BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Microbiologia Básica. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 196p.

BASU, M.; BHATTACHARYA, S.; PAUL, A. Isolation and characterization of chromium- Resistant bacterial from Tannery effluents. **Bulletin of Environmetal Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 535-542, 1997.

BATOOL, R. et al. Production of EPS under Cr (VI) challenge in two indigenous bacteria isolated from a tannery effluent. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 1-11, 2015.

BAZ, S. BARAKATE, M., HASSANI L., EI GHARMALI, A., and IMZILN, B. Resistance to and accumulation of heavy metals by acinetobacteria isolated from abandoned mining areas. **The Scientific World Journal**, p. 1-14, 2015.

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.

BOPP, L.H.; CHAKRABARTY, A.M.; EHRLICH, H.L. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal Bacteriology**, v. 155, n. 3, p. 1105-1109, 1983.

BLINDAUER, C.A. et al. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. **National Academic Society**, Washington, v. 98, n. 17, p. 9593-9598, 2001.

BRANDÃO, C. J. Guia nacional de coleta de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas. São Paulo: **CETESB**; Brasília: ANA, 2011.

BRANDHUBER, P. et al. Low-level hexavalent chromium treatment options: bench-scale evaluation. **American water works association Research Foundation**, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Ministério do Meio Ambiente, 2000.

BRUINS, M.; KAPIL, S.; OEHME, F. Microbial resistance to metal in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

CERVANTES, J.C. et al. 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, C. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 335-347, 2001.

CHIRWA, E.N.; WANG, Y.T. Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria. **Water Research**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 2376-2384, 2000.

CHIRWA, E.; MOLOKWANE, P. Biological Cr (VI) reduction: Microbial diversity, kinetics and biotechnological solutions to pollution. **Biodiversity**, p. 75-100. 2011.

CHRIST, I. et al. Aerobic reduction of chromium (VI) by *Pseudomonas corrugata* 28: influence of metabolism and fate of reduced chromium. **Geomicrobiology Journal**, v. 29, n. 2, p. 173-185, 2012.

CLETO FILHO, S.E.N. Efeitos da ocupação urbana sobre a macrofauna de insetos aquáticos de um igarapé da cidade de Manaus/AM.1998. 300f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas área de concentração Ecologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônica/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1998.

CODD, R. et al. Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. **Coordination Chemistry Reviews**, Sydney, v. 4, n. 216, p. 537, 2001.

CODD, R., IRWIN, J.A., LAY, P.A., Sialoglycoprotein and carbohydrate complexes in chromium toxicity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 213-219, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. *Resolução no 357*. São Paulo: 2005. 27 p.

CONCEIÇÃO, D. et al. Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1661-1667, 2007.

COSTA, A.C.A.; DUTA, F.P. Bioaccumulation of Copper, Zinc, Cadmium and Lead By *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 1-5, 2001.

CULLIMORE, D.R. Practical atlas for bacterial identification. New York: **Lewis Publishers**, 2000. 209p.

CURRY, J.P.; GOOD, J.A. Soil Fauna Degradation and Restoration. **Advances in Soil Science**, v. 17, p.171-215, 1992.

DIAS, C.M. Estudo físico-químico da água de três igarapés na região do Distrito Industrial de Manaus - AM. 2001. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2001.

DICK, R.P.; BREAKWILL, D.; TURCO, R. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. Handbook of Methods for Assessment of Soil Quality. **Soil Science Society of America Specific Publications**, Madison, p. 242-272, 1996.

DE FILIPPIS, L.F.; PALLAGHY, C.K. Heavy metals: sources and biological effects. In: RAI, L.C.; GAUR, J.P.; SOEDER, C.J. **Advances in Limnology**

Series: Algae and Water Pollution, E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart, p. 31-77, 1994.

DOBLER, R.; SANER, M.; BACHOFEN, R. Population changes of soil microbial communities induced by hidrocarbon and heavy metal contamination. **Bioremediation Journal**, v. 4, p. 41-56, 2000.

ELANGOVAN, R., ABHIPSA, S., ROHIT, B., LIGY, P., CHANDRARAJ, K. Reduction of Cr(VI) by a Bacillus sp. **Biotechnology Letters** 28:247–52, 2006.

ELANGOVAN, R.; PHILIP, L.; CHANDRARAL, K. Hexavalent Chromium Reduction by free and immobilized cell-free extract of *Arthrobacter rhombi*- RE. **Biochemical Biotechonology**, 2008.

FOX, G.E.; PECKMAN, K.J.; WOESE, C.R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 27, p. 44-57, 1977.

GATG, S.K. et al. Pentachlorophenol dechlorination and simultaneous Cr⁶⁺ reduction by *Pseudomonas putida* SKG-1 MTCC (10510): Characterization of PCP dechlorination products, bacterial structure, and functional groups. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2288-2304, 2013.

GE, S. et al. Comparative evaluations on bio-treatment of hexavalent chromate by resting cells of *Pseudochrobactrum* sp. and *Proteus* sp. in wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 126, p. 7-12, 2013.

GEOMANAUS. Projeto Geo Cidades - Relatório Ambiental Urbano Integrado. Rio de Janeiro: Consórcio Parceria 21, 2002.

GIOVANELLA, P. et al. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 232-236, 2011.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of *actinomycetes*. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216, 1983.

GUERRA, W. et al. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 01, p. 111-118, 2011.

GUEDES, N.C. Poluição aquática na microbacia do Igarapé do Quarenta, Manaus - Amazonas. 2003. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, 2003.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HONG, S. et al. Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. **The ISME Journal**, p. 31365-1373, 2009.

HUTCHINSON, T.C.; SYMINGTON, M.S. Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. **Journal of Geochemical Exploration**, New York, v. 58, p. 323-330, 1997.

IFTIKHAR, S., FAISAL, M., HASNAIN, S. Cytosolic reduction of toxic Cr(VI) by indigenous microorganism. **Research Journal of Environmental Sciences** 1:77–81, 2007.

IVASK, A.; ROLOVA, T.; KAHRU, A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 41, p. 1-15, 2009.

JOUTEY, N.T. et al. Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 233, p. 45–69, 2015.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 3. ed. Boca Raton: **CRC Press Online**, 2001. 413p.

KAMIKA, I.; MONBA, M. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. **BMC Microbiology**, v.13, n. 28, p.1471- 2180, 2013.

KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 13, n. 1, p. 76-87, 2013.

KORN-WENDISCH, F.; KÜTZNER, H.J. The Family *Streptomycetaceae*. In: BALOWS, A. et al. The prokaryotes. 2 ed. New York: **Springer Verlag**, 1992. 1027p.

KUCK, J.; VALLE, G. Remoção das habitações em palafitas ao longo do “Igarapé do Quarenta” para a criação de avenida: proposta alternativa para essas medidas inadequadas em implantação na cidade de Manaus. In: NUTAU, 2004, Demandas sócias, inovações tecnologias e a cidade. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

KUIPER, I. et al. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. **The American Phytopathological Society**, v. 17, p. 6-15, 2004.

KUMAR, A. et al. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. **International Journal of Environmental Sciences**, Jaipur, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

LEVINA, A. et al. Chromium in biology: toxicology and nutritional aspects. **Progress in Inorganic Chemistry**, Hoboken, v. 51, p. 145-250, 2003.

LEVY, S.B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 65-71, 2002.

LOPES, A. et al. Identificação da Presença de Bactérias Resistentes a Metais em Solos não Contaminados por Poluição Industrial. **Revista CAPTAR**, Aveiro, v. 3, p. 95-103, 2011.

LOSI, M.E.; AMRHEIN, C.; FRANKENBERGER, W.T. Bioremediation of chromate contaminated groundwater by reduction and precipitation in surface soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 23, n. 1, p. 1141-1150, 1994.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-173, 1994.

LUDWING, W. et al. Detection and in situ identification of representative of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**. v.153, p. 181-190, 1997.

MALIK, A.; SAKAMOTO, M.; KAKII, K. Coaggregation of *Microbacterium esteraromaticum* S51 with other strains of non-flocculating sludge bacteria. **Water and Environmental Management Series**, p. 737-48, 2002.

MASAKI, Y., HIROJIMA, T., SASAKI, K. Bioreduction and immobilization of hexavalent chromium by the extremely acidophilic Fe(III) – reducing bacterium *Acidocella aromatica* strain PFBC. **Extremophiles**, 19, p. 495-503, 2015.

MATYAR, F. et al. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistanc species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 167, p. 309-20, 2010.

MCLEAN, J.; BEVERIDGE, T.J. Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1076-1084, 2001.

MELO, E.G.F.; SILVA, M.S.R.; MIRANDA, S.A.F. Influência antrópica sobre águas de igarapés na cidade de Manaus – Amazonas. **Caminhos de**

Geografia, v. 5, n. 16, p. 40-47, 2005.

MINARI, G.D. Acúmulo de Cádmio, crômio e níquel e isolamento de micro-organismos potenciais para biorremediação em área agrícola. 2016. 99f. Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

MISHRA, V. et al. Bioreduction of hexavalent chromium in a non-nutritive medium by chromium resistant bacterial isolates. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 395–399, 2011.

MONTAGNER, C.C. et al. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 8, p. 10-13, 2014.

MOTA, A. J. et al. A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction. In: Mycoses. COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, p. 94-94, 2009.

NAKAMOTO, R.C.F. O princípio do poluidor pagador e o meio ambiente industrial sustentável. 2014. Dissertação (Mestrado Direitos Difusos e Coletivos) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2014.

NEDER, R.N. Microbiologia: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 137p.

NETZAHUATL-MUÑOZ, A.R., CRISTIANI-URBINA, MdC, CRISTIANI-URBINA, E. Chromium Biosorption from Cr(VI) Aqueous Solutions by *Cupressus lusitanica* Bark: Kinetics, Equilibrium and Thermodynamic Studies. PLOS ONE, doi:10.1371/journal.pone.0137086 10(9): e0137086, 2015.

NIES, D.H. Microbial heavy metal resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 730-750, 1999.

NIES, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS**

Microbiology Reviews, v. 27, p. 313-39, 2003.

NGWENYA N.; CHIRWA, E.M.N. Biological removal of cationic fission products from nuclear wastewater. **Water Science Technology**, v. 63, n. 1, p. 124-128, 2011.

NUSSELEIN, K.; TIEDJE, J.M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 65, n. 8, p. 3622-3626, 1999.

OH, Y.S.; CHOI, S.C.; Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. **The Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 25-29, 1997.

OLIVEIRA, J.A.; DUARTE, J.A.; GASNIER, T.R.J. Cidade de Manaus: visões interdisciplinares. Manaus: **Editora da Universidade do Amazonas – EDUA**, p. 81-116, 2003.

OLSEN, G.J.; WOOSE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 1-6, 1994.

OROS-SICHLER, M. et al. Molecular fingerprinting Techniques to analyze soil microbial communities. In: ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. (Eds). *Modern Soil Microbiology*. USA: **CRC Press**, 2006. p.355-386.

PARK, C.H. et al. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p.1788-1795, 2000.

PATRA, R.C. et al. Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1857–1863, 2010.

POLJSKAK, B. et al. Interference of chromium with biological systems in yeast and fungi: a review. **Journal Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 21-36, 2010.

PUZON, G.J. et al. Bacterial flavin reductase system reduces chromates (III) e NADp complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 294, n. 1, p. 76- 81, 2002.

QUIEVRYN, G. et al. 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.

RAMIREZ-DIAZ, M.I. et al. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. **Biometals**, v. 21, n. 3, p. 321-332, 2008.

RESENDE, J.A. et al. Multidrug-Resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 4, p. 449-455, 2012.

RIVIERE, J.E. Biological Concepts and Techniques in Toxicology. 1. ed. Nova lorque: **Taylor & Francis**, 2006.

ROANE, T.M.; PEPPER, I.L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial Ecology**, v. 38, p.358-364, 2000.

ROUX, S. et al. Comparison of 16S rRNA and protein-coding genes as molecular markers for assessing microbial diversity (Bacteria and Archaea) in ecosystems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 617-628, 2011.

SAMANTA, A. et al. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Bellary, v. 2, p. 178-189, 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. 3 ed. 3 vol. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SANDAA, R.A.; TORSKIK, V.; ENGER, O. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 287-95, 2001.

SHAKOORI, A.R.; MUNEER, B. Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater. **Folia microbiologica**, v. 47, n. 1, p. 43-50, 2002.

SHAKOORI, F.R. et al. Isolation and characterization of arsenic reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of wastewater. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 42, p. 331-338, 2010.

SHEN, H.; WANG, Y.T. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3771-3777, 1993.

SILVA, M.S.R. Metais pesados em sedimentos de fundo de igarapés (Manaus-Am). 1996. 120f. Dissertação (Mestrado Geoquímica Ambiental) – Universidade Federal do Pará, 1996.

SILVA, C.S.; PEDROZO, M.F.M. Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. Centro de recursos ambientais, Salvador, 2001. 100p.

SIRKO, A. et al. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the cystTWAM gene cluster. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3351-3357, 1990.

SPAGIARI, M. B.; BIZANE, B.P.; MENEZES, B. F. Avaliação da biorredução de alumínio, ferro e manganês por microorganismos isolados de drenagem ácida de mina. **Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada** (2016). n. pág. Web. 8 de fevereiro de 2017.

SRINATH T. et al. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere**, v. 48. p. 427- 435, 2002.

SOTERO-MARTINS, A.; VIANA, M.O.; CARVAJAL, E. Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por Mercurio e cromo. **Geochimica Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 36-42, 2014.

STORK, N.E.; EGGLETON, P. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. **American Journal Alternative Agriculture**. v. 7, p. 38-47, 1992.

THATOI, H. et al. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. **Journal of Environmental**, v 146, p 383-399, 2014.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA, P.Z; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.

TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Bacterial degradation and biorremediation of petroleum compounds. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 1027-1035, 2010.

TORREZANI, L.; OLIVEIRA, C.A.S.; CHICO, M. Índice de Geoacumulação de Mercúrio na bacia do Igarapé do Educandos (Manaus / Amazonas). v. 2, p. 161-170, 2016.

TRIPATHI, M.; GARG, S.K. Co-remediation of pentachlorophenol and Cr⁶⁺ by free and immobilized cells of native *Bacillus cereus* isolate: spectrometric characterization of PCP dechlorination products, bioreactor trial and chromate reductase activity. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 496-509, 2013.

UPADHYAY, N., VISHWAKARMA , K., SINGH, J., et al. Tolerance and Reduction of Chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 Isolated from Contaminated Coal Mining Soil. *Frontiers in Plant Science*, doi:10.3389/fpls.2017.00778, 2017.

VALLE, A.S. Os igarapés no contexto do espaço urbano de Manaus: Uma

visão ambiental. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Centro de Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Amazonas, 1999.

VALLE, C.M. Impacto Ambiental Urbano: Avaliação física e química dos solos da bacia do Igarapé do Quarenta (Manaus-AM). 1998. 90f. (Dissertação de Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 1998.

WENBO, Q.I et al. Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 5, p. 399-402.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; Guidelines for drinking water. 4. ed. World Health Organization: 2011.

WUANA, R.A.; OKIEIMEN, F.E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **International Scholarly Research Network Ecology**, v. 2011, 2011.

XINXIAN, L. et al. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, n. 5, p.1197-207, 2011.

YARZA, P. et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 12, p. 635- 645, 2014.

YU, Z. et al. The Shifts of sediment microbial community phylogenetic and functional structures during chromium (VI) reduction. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 1759-1770, 2016.

ZHITKOVICH, Z.A. Chromium in drinking water: sources, metabolism and cancer risk. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, p. 1617-1629, 2011.