

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS QUE
REMOVEM CROMATO DE SOLUÇÕES**

CLEIDE MATOS TRINDADE
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de concentração: Microbiologia
Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1998

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS QUE
REMOVEM CROMATO DE SOLUÇÕES**

CLEIDE MATOS TRINDADE

Aprovada em:

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sérgio Pascolatti

ESALQ/USP

Prof. Dr. Murilo de Mello

ESALQ/USP

Prof. MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS
Orientador

AGRADECIMENTOS

- À Deus pela saúde.
- Ao Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais pela orientação e amizade.
- Aos colegas do laboratório de Microbiologia do solo, Lúcia, Marco, Bete, Leandra, Winston, Heron e especialmente ao Fernando e Denise.
- Às colegas Cristiane, Patrícia e Lilian pelo apoio e amizade.
- Ao Sr. Durval Garcia Jr. pelo incentivo inicial e apoio.
- Aos amigos José Luís Duarte Coelho, Marjory e Jenniffer pela hospedagem e apoio que foram essenciais para a conclusão do trabalho.
- À Sílvia e Persival pelo incentivo e auxílio.
- À minha família, meus pais José e Egídia, minhas irmãs Cleusa e Fátima por torcerem e apoiarem as minhas iniciativas.
- Ao meu noivo Erickson um agradecimento especial, por me acompanhar desde o início, dando conforto e incentivo em todos os momentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 O cromo e a qualidade do ambiente	2
2.2 Mecanismos enzimáticos de remoção de metais de soluções.....	3
2.3 Processos não-enzimáticos.....	6
2.3.1 Biossorção.....	6
2.3.2 Precipitação por sulfeto.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Amostragem.....	12
3.2 Caracterização microbiológica na amostra de água de sistema de tratamento biológico de efluentes.....	12
3.2.1 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias totais.....	12
3.2.2 Contagem de Fungos Totais.....	13
3.2.3 Crescimento em meio levine EMB Agar.....	13
3.2.4 Crescimento em Agar para isolamento de Pseudomonas.....	14
3.2.5 Bactérias capazes de formar esporos.....	14
3.2.6 Cromo hexavalente.....	15

3.3	Isolamento de bactérias tolerantes ao cromato.....	15
3.4	Caracterização dos Isolados.....	16
3.4.1	Características morfológicas das colônias em meio sólido (MS).....	17
3.4.2	Características morfológicas ao microscópio.....	17
3.4.3	Características em meio líquido (ML).....	18
3.4.4	Crescimento em meio Levine EMB Agar (EMB).....	19
3.4.5	Crescimento em agar para isolamento de <i>Pseudomonas</i> (AIP).....	19
3.4.6	Bactérias capazes de formar esporos (ESP).....	19
3.4.7	Produção de ácidos em meio com CaCO ₃ (AC).....	20
3.4.8	Crescimento em CN contendo NaCl.....	20
3.4.9	Crescimento em CN com diferentes valores de pH.....	21
3.4.10	Crescimento em CN com diferentes temperaturas.....	21
3.4.11	Motilidade em meio de cultivo semi-sólido (AM).....	22
3.5	Teste de tolerância ao CrO ₄ ⁻²	22
3.6	Determinações das curvas de crescimento dos isolados bacterianos.....	23
3.7	Remoção do CrO ₄ ⁻² de soluções aquosas.....	23
3.8	Testes bioquímicos.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	Caracterização microbiológica na amostra de água de sistema de tratamento de efluentes.....	31
4.2	Isolamento de bactérias tolerantes ao CrO ₄ ⁻²	32
4.3	Caracterização dos isolados.....	32
4.4	Determinação das curvas de crescimento dos isolados bacterianos.....	41
4.5	Ensaio de tolerância ao CrO ₄ ⁻²	41
4.6	Remoção do CrO ₄ ⁻² de soluções aquosas.....	43
5	CONCLUSÕES.....	50
	ANEXO A: MEIOS DE CULTIVO.....	51
	ANEXO B: CHAVE DICOTÔMICA.....	67

ANEXO C: CURVA PADRÃO DE K_2CrO_4	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Curvas de Crescimento dos isolados 8, 14 e 21 em meio Caldo Nutriente.....	46
2 Crescimento dos isolados bacterianos em meios cultivo contendo diferentes concentrações de CrO_4^{-2}	47
3 Concentração de CrO_4^{-2} em meio de cultivo não-inoculado ou inoculado com os isolados 8, 14 e 21 em função do tempo de incubação.....	48
4 Variação percentual da concentração de CrO_4^{-2} em meio de cultivo inoculado com os isolados 8, 14 e 21 em função do tempo de incubação.....	49

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Características microbiológicas da amostra de água do tanque de aeração do sistema de tratamento de efluentes do curtume PODBOI- (Leme-SP).....	34
2 Concentrações de CrO_4^{2-} no meio de cultura VB para obtenção dos diferentes isolados bacterianos.....	34
3 Características das colônias de bactérias isoladas em meio Agar Nutritivo (AN).	35
4 Características das culturas isoladas em meio líquido Caldo Nutriente.....	36
5 Coloração de gram e características morfológicas das células bacterianas em análise microscópica.....	37
6 Características de crescimento dos isolados bacterianos em meios seletivos e diferenciais.....	38
7 Características de crescimento dos isolados bacterianos em diferentes valores de pH, salinidade e temperatura	39

8	Capacidades bioquímicas e morfologia dos isolados 8, 14 e 21.....	40
9	Crescimento dos isolados obtidos em meio de cultivo VB utilizando-se diferentes concentrações de CrO_4^{-2}	42

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS QUE REMOVEM CROMATO DE SOLUÇÕES

Autora: CLEIDE MATOS TRINDADE

Orientador: Prof. MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS

RESUMO

Devido aos grandes problemas ambientais causados pela utilização de metais pesados como o Cr(VI), foram realizados ensaios em laboratório com uma amostra coletada de curtume na região de Leme, SP com o objetivo de isolar e classificar bactérias aeróbias que removem CrO_4^{-2} de soluções. As caracterizações, ensaios de tolerância e remoção do CrO_4^{-2} foram feitos com base na literatura. Foram obtidos 21 isolados de bactérias aeróbias em meio de cultivo contendo concentrações crescentes de CrO_4^{-2} variando de 0, 10, 20, 40 e 80 mg L^{-1} . Três isolados (8, 9 e 21) se destacaram por tolerarem altas concentrações de cromato, crescendo em meio de cultivo contendo até 1.800 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} . Para os estudos posteriores utilizou-se um isolado obtido do meio sem cromato (isolado 14) e dois isolados tolerantes a altas concentrações de CrO_4^{-2} (isolados 8 e 21). Para a caracterização dos isolados elaborou-se com base na literatura, uma chave dicotômica ou chave de identificação e através da comparação dos resultados dos testes morfológicos e bioquímicos foi possível identificar que o isolado 8 pertence provavelmente ao gênero *Acinetobacter*, o isolado 14 pertence provavelmente ao gênero *Pseudomonas* e o isolado 21 pertence provavelmente ao gênero *Listeria*. Com os

resultados obtidos nos testes de tolerância e remoção, podemos concluir que o isolado 8 foi capaz de crescer em meio de cultivo com 1.800 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} e é altamente eficiente em remover cromato da solução com até 1.800 mg L^{-1} ; o isolado 14 não foi capaz de crescer em meio de cultivo com 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} entretanto, removeu cromato da solução com até 60 mg L^{-1} e o isolado 21 foi capaz de crescer em meio de cultivo com até 1.200 mg L^{-1} e removeu eficientemente cromato da solução com até 300 mg L^{-1} . A eficiência de remoção de cromato das soluções pela atividade microbiana aumentaram com o tempo de incubação e diminuiu com o aumento da concentração inicial de cromato no meio.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AEROBIC BACTERIA
CAPABLE TO REMOVE CROMATE OF SOLUTIONS**

Author: CLEIDE MATOS TRINDADE

Adviser: Prof. MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS

SUMMARY

Due to the great environmental problems caused by the use of heavy metals like Cr(VI), essays were accomplished in laboratory with a collected sample of tannery plant in Leme, SP, Brazil. In order to isolate and classify aerobic bacterias capable to remove CrO_4^{-2} of solutions. The characterizations, essays of tolerance and removal of the CrO_4^{-2} were made with base in the literature. Twenty one isolated of aerobic bacteria were obtained in culture media containing from 0, 10, 20, 40 and 80 mg L^{-1} CrO_4^{-2} . Three isolated (8, 9 and 21) they stood out for they tolerate high CrO_4^{-2} concentrations, growing in culture media contends 1.800 mg L^{-1} of CrO_4^{-2} . For the posterior studies one isolated obtained of the culture media without CrO_4^{-2} were used (isolated 14) and two isolated tolerant to high concentrations of CrO_4^{-2} (isolated 8 and 21). Based in the literature, it was elaborated an identification key in order to characterized the isolates and through comparison between the morphologic and biochemical tests results it was possible to

identify that the isolated 8 probably belongs to the *Acinetobacter* sp, the isolated 14 probably belongs to the *Pseudomonas* sp and the isolated 21 probably belongs to the *Listeria* sp. With the results obtained in the tests of tolerance and removal, we concluded that the isolated 8 were capable to grow in culture media with 1.800 mg L⁻¹ of CrO₄⁻² and it is highly efficient in removing CrO₄⁻² of the solution containing 1.800 mg L⁻¹; the isolated 14 were not capable to grow in the culture media with 60 mg L⁻¹ of CrO₄⁻² however, it removed cromato of the solution with to 60 mg L⁻¹ and the isolated 21 were capable to grow in the culture media with up to 1.200 mg L⁻¹ and it removed efficiently CrO₄⁻² in the solution with 300 mg L⁻¹. The efficiency of CrO₄⁻² microbial removal increased with the time of incubation and it decreased with the increase of the initial concentration of CrO₄⁻².

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, o cromo pode ser encontrado predominantemente em três estados de oxidação Cr (II) raro e instável, Cr (III) e Cr (VI). A forma hexavalente, é a mais solúvel em água e a mais tóxica.

Os compostos do Cr(VI) são oxidantes fortes, por essa razão, CrO_4^{2-} tem ampla utilização em processos de cromação (pintura para prevenção de corrosão), em curtumes no beneficiamento de peles de animais e pigmentos, gerando resíduos que exigem cuidados especiais para disposição final. Os processos para remoção do Cr(VI) de efluentes líquidos geralmente envolvem a precipitação química, com consequente produção de lodos de elevada complexidade.

Uma alternativa ao processo de precipitação química de Cr (VI) é a precipitação biológica. Várias bactérias tem sido utilizadas para esse processo, incluindo espécies de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* e *Micrococcus*.

O presente trabalho visa isolar e caracterizar bactérias aeróbias resistentes a altas doses de Cr(VI) e avaliar seu potencial para precipitar (remover da solução) essa espécie iônica, transformando-a em uma forma menos tóxica, minimizando dessa forma seu impacto ambiental. Apesar do (Cr) ser o enfoque do trabalho, serão abordados também, outros metais pesados pois importantes conceitos e idéias poderão ser reproduzidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cromo e a qualidade do ambiente

O (Cr) se enquadra na categoria de poluentes conhecida como metais pesados. São metais pesados, os elementos com gravidade específica de aproximadamente 5 g cm^{-3} ou maior. Incluem-se os metais da série de transição e grupos IIA, IIIB, IVB, VB e VIB da tabela periódica como: Sc, Y, La, Ac, Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, Cr, Mo, W, Mn, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Au, Ag, Zn, Cd e Hg (Lester, 1987).

Por mais de 50 anos, vários órgãos governamentais reconheceram que o Cr(VI) representava risco à saúde de trabalhadores. A exposição prolongada da poeira contaminada, causa câncer e ulcerações na mucosa nasal com possíveis perfurações. O National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) ou Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional, nos Estados Unidos fez uma diferenciação entre o Cr(VI) carcinogênico e o Cr(VI) não carcinogênico. Os CrO_4^{-2} e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ de hidrogênio, lítio, rubídio, cério e amônio, podem ser considerados como não carcinogênicos, enquanto todos os outros CrO_4^{-2} são carcinogênicos. O W.H.O europeu, adotou um limite máximo de Cr(VI) para águas potáveis de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, entretanto nos Estados Unidos, aceita-se $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ como um limite máximo. O Cr(III) é menos tóxico que o Cr(VI), pois a adição de lodo contaminado com Cr(VI) foi causadora de alta toxicidade em plantas em concentrações de aproximadamente $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Lodo contendo $4,4$ a $8,8 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr(III) foi aplicado como fertilizante e não afetou as plantas (Langard, 1980).

No Brasil, segundo portaria nº 56-BSD/MS de março de 1977, o ministério da saúde permite um valor máximo de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de (Cr) total em água potável e para águas minerais, um valor máximo de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr (VI), conforme resolução no. 25/76 do ministério da saúde de agosto de 1996, disposto na portaria ministerial nº 1003.

Várias formas de tratamento biológico de resíduos, vêm sendo desenvolvidas como alternativa para a recuperação de ambientes contaminados. Basicamente, os sistemas de tratamento biológico e os processos de bioremediação visam reduzir os níveis, ou transformar compostos tóxicos em compostos menos tóxicos. Atualmente, devido aos grandes níveis de compostos potencialmente tóxicos no ambiente, tem sido essencial o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento da água, do solo, do ar e de resíduos das indústrias e de agroindústrias utilizando microorganismos.

Existem várias formas de tratamento biológico de efluentes e de resíduos contaminados. Muitos microorganismos podem ser utilizados, e existem diferentes mecanismos capazes de remover compostos tóxicos de águas e solos. Esses mecanismos podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos (Lovley, 1994).

2.2 Mecanismos enzimáticos de remoção de metais de soluções

Vários mecanismos enzimáticos estão envolvidos na desintoxicação e resistência das bactérias aos metais pesados (Williams & Silver, 1984):

- a) Mercúrio redutase: reduz o Hg(II) a Hg(0). A enzima foi isolada de *Thiobacillus ferroxidans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*,
- b) Organomercúrio liase: capaz de romper a ligação do Hg com compostos orgânicos, como os radicais metil, etil e fenil, para formar Hg (II) acrescido de metano, etano ou benzeno, respectivamente. Foi isolada de *Escherichia coli* e *Pseudomonas*.
- c) Arsenito redutase: oxida o As(III) altamente tóxico, para As(V) que é 100 a 200 vezes menos tóxico. Foi isolada de *Alcaligenes fecalis*.

- d) Cromato redutase: reduz o Cr(VI) tóxico, para Cr(III) menos tóxico. Foi isolada de vários microrganismos, entre eles várias espécies de *Pseudomonas*.
- e) Ferro redutase: enzima responsável pela redução do Fe(III) em solos e sedimentos, presentes em *Thiobacillus ferrooxidans* (Lovley 1991;1994).

Existem algumas hipóteses a respeito dos mecanismos de redução do CrO_4^{-2} . Uma delas foi descrita pela primeira vez em *Pseudomonas ambigua* por Itoh et al.(1985). A cepa teria capacidade de incorporar CrO_4^{-2} como um análogo do SO_4^{-2} , via transporte ativo, e reduzir o Cr(VI) para Cr(V) e posteriormente para Cr(III) através de uma CrO_4^{-2} redutase dependente de NADPH ou NADH.

Outra hipótese, foi através da reação de Fenton. A bactéria teria a capacidade de fazer a reação do metal com redutores biológicos gerando Cr(V) e também radicais oxidrila livres, em presença de H_2O_2 (Shi & Dalal,1989).

Existe uma correlação entre o mecanismo enzimático, proteínas solúveis e a membrana celular.

Na caso da bactéria *Pseudomonas putida*, o íon CrO_4^{-2} é reduzido, por uma proteína solúvel dependente de NADPH ou NADH para máxima atividade e não existe nenhuma associação com a membrana celular (Ishibashi et al.,1990). Em enzimas livres de células, pode-se observar que a intensidade da redução do CrO_4^{-2} aumenta linearmente com o aumento da concentração de NADH ou NADPH e a presença da CrO_4^{-2} redutase solúvel foi detectada após romper células e separá-las do extrato celular. O inverso foi observado ao adicionar íons nitrato ou sulfato, tanto em restos celulares quanto em células intactas.

Campos et al. (1995) avaliaram a redução do Cr(VI) em presença e ausência de oxigênio utilizaram uma linhagem de *Bacillus* resistente ao metal. O experimento de Ishibaschi et al. (1990) descrito anteriormente, foi reproduzido e foram obtidos resultados

que acusaram também a presença de uma enzima solúvel no mecanismo de redução do CrO_4^{-2} .

Outros autores como Wang & Shen (1995) descreveram a atividade aeróbia da redução do Cr(VI) e relacionaram também essa atividade com proteínas solúveis e com NADH. No caso o Cr(VI) serve como doador de elétrons.

Komori et al. (1990a) com auxílio de um sistema de diálise e da bactéria *Enterobacter cloacae*, removeram até 96% de CrO_4^{-2} da solução. O sistema consistiu de duas câmaras de vidro, separadas por uma membrana semi-permeável, uma contendo meio de cultivo com diferentes concentrações do metal, e outra contendo cloreto de potássio e as bactérias. Comprovou-se que houve a produção de um composto solúvel pela célula bacteriana e uma vez que não ocorreu contato direto das células com o metal.

Em experimentos posteriores, Komori et al.(1990b), ainda trabalhando com *E. cloacae*, provaram que o oxigênio agia como inibidor da redução do CrO_4^{-2} . As culturas em condições contínuas de aeração não reduziram o CrO_4^{-2} . Da mesma forma, em presença do íon nitrato e ausência de oxigênio, as células gradualmente perderam a capacidade de reduzir o CrO_4^{-2} . *E. cloacae*, em anaerobiose, utilizou o íon CrO_4^{-2} como um receptor final de elétrons.

A bactéria *Escherichia coli* foi estudada por Shen & Wang (1993) com o objetivo de avaliar a redução enzimática do Cr(VI) na bactéria. Foi sugerido que a redução ocorreu fora da célula, pela atividade também de uma redutase solúvel, pois a maioria do Cr(III) formado, foi detectado no sobrenadante enquanto uma mínima porção estava na fração depositada.

Dvorak et al. (1992) e Fude et al. (1994), trabalhando com BSR (Bactérias Sulfato Redutoras) para precipitar metais como Zn, Ni, Cd, Al e Cr, em cultura pura ou em associação com outras bactérias, levantaram a hipótese de que a precipitação ou redução dos metais, especialmente do (Cr), era devido à produção de gás sulfídrico pelas bactérias, que ao reagir com os metais da solução, precipitavam na forma de sulfetos metálicos. Entretanto Lovley & Phillips (1992a,b; 1994a,b) e Lovley (1994), utilizando as

BSR, *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio desulfuricans*, demonstraram que a reação de redução dos metais Cr (VI), U(VI), Fe(III) e Mn(IV), ocorria simultaneamente à redução do sulfato, e que o processo ocorria por reações catalisadas por enzimas. Apenas uma pequena fração da precipitação era devido à reação com o gás sulfídrico.

2.3 Processos não-enzimáticos

Os processos não-enzimáticos para tratamento biológico de resíduos ricos em metais e/ou biorremediação de ambientes contaminados, foram descritos por Gadd & White (1993), podendo ser agrupados em: 1) biossorção e 2) precipitação por sulfeto.

2.3.1 Biossorção

Biossorção ou simplesmente sorção, é um mecanismo de aprisionamento de compostos tóxicos, através de células vivas ou mortas, via mecanismos físico-químicos como adsorção ou troca iônica (Gadd & White, 1993).

Vários microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) foram testados por Nakajima & Sakaguchi (1986) para verificar a capacidade em remover diferentes metais pesados de soluções através da sorção. Foram testados microrganismos de diferentes gêneros e espécies como *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Zooglea ramigera*. Ao todo, os autores testaram 32 bactérias, 15 leveduras, 16 fungos filamentosos e 20 actinomicetos. Foi observado que linhagens de *Bacillus subtilis*, *Actinomyces flavoviridis*, *Streptomyces obiraceus*, *S. albus*, *Streptomyces diastaticus*, *Streptomyces viridochromogenes* e *Mucor javanicus* adsorviam eficientemente Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb e U.

A seguir será descrito os mecanismos de biossorção em vários microrganismos especialmente bactérias.

A superfície das células bacterianas é aniônica e a parede celular também. Os poliânions da parede celular interagem com os cátions do meio aquoso, formando complexos relativamente estáveis, já que a parede celular de bactérias gram (+) são potentes agentes quelantes (Beveridge & Murray, 1980; Beveridge & Koval, 1981). Em *Pseudomonas*, a adsorção do U na superfície de célula, ocorre devido a fatores físico-químicos e não devido à atividade biológica. (Pons & Fusté, 1993).

Em *B. subtilis* os grupos carboxílicos dos peptidoglicanos são os mais potentes sequestrantes de metais da parede celular (Beveridge & Murray, 1980). Os autores afirmam que, nessa bactéria os envelopes celulares certamente estão envolvidos na remoção dos metais. Posteriormente, Beveridge & Koval (1981) determinaram que os metais interagem com a cabeça polar de fosfolipídeos, presentes nos sítios aniônicos dos lipopolissacarídeos e grupos ácidos de peptídeos expostos da parede celular de *E.coli*.

Os exopolímeros microbianos tem recebido muita atenção pela propriedade de se ligar aos metais. Esses exopolímeros estão geralmente associados aos microrganismos encapsulados ou aqueles capazes de formar muco. A maioria dos exopolímeros são compostas de polissacarídeos, glicoproteínas e lipopolissacarídeos. Geralmente a capacidade de seqüestrar metais está envolvida com alta carga aniônica.

Mullen et al. (1989) investigaram a sorção de metais pesados em bactérias gram (-) como *E. coli* e *P. aeruginosa* e gram (+) como *B. cereus* e *B. subtilis* com o objetivo de verificar as diferenças entre as ligações dos metais aos seus envelopes celulares. Foi observado que o metal adsorvido e o percentual de remoção da solução variavam em função do microrganismo e não somente da relação da parede celular.

Foram extraídos também polímeros ricos em cargas negativas de *Pseudomonas sp* com eficiência comprovada em acumular U (Marqués et al.,1990).

Ron et al. (1992) descreveram que *P. mirabilis* acumula Cd no envelope celular, e que apenas 20% é acumulado no citoplasma. Também foi verificado que *Alcaligenes eutrophus* acumula Cd no envelope celular. Falla & Block (1993) também estudaram a

biosorção e mostraram que os envelopes celulares isolados de *P. fluorescens* eram os responsáveis pela sorção de Cd (II), Ni(II), Cu(II) e Zn(II).

Trabalhando com duas linhagens de *Pseudomonas stutzeri*, uma bactéria desnitrificante, (Kong et al., 1992) testaram a redução do Cr (VI) sob condições limitantes de carbono, estas adsorveram 10 a 15% mais crômio do que células não estressadas. Células em fase de declínio ou morte também adsorveram mais cromo. Existe uma relação entre as mudanças microestruturais na parede que ocorrem durante o envelhecimento das células bacterianas e a adsorção de metais.

Posteriormente Mattuscha & Straube (1993) estudaram os mecanismos de sorção e dessorção de Ag, Cr, Pb, Cu, Zn, Cd, Co e Ni, à biomassa viva de *Streptomyces noursei*, derivado de um processo de fermentação. Os autores verificaram que a bactéria foi eficiente na remoção de Co, Hg, Cr e Pb por adsorção à biomassa viva.

Foi observado o mecanismo de biossorção em bactérias desnitrificantes por Johnstone et al. (1993) observaram que a quantidade de Cr(VI) adsorvido segue uma variabilidade em função do tempo, seguindo um modelo exponencial crescente. Após 15 horas de incubação, atinge-se o equilíbrio e também a eficiência máxima de remoção do metal da solução.

Mesmo com todas as vantagens do uso de bactérias nos processos de remoção de metais, em alguns casos foram comprovados que isso não é uma regra. Trabalhando com biomassa de *P. aeruginosa* para biossorção de Hg (II), Chang & Hong (1994) inativaram as células por esterilização a vapor, para eliminar a interferência da redução do Hg devido às enzimas intracelulares, e compararam com a sorção de uma resina de troca iônica. Observaram que, quando temos uma variedade muito grande de íons na suspensão, não é aconselhável o uso de processos biológicos de sorção, já que a eficiência de remoção de íons diminui.

Outro experimento de biossorção, descrito por Bender et al. (1995), utilizou um complexo microbiológico produzido por diferentes microrganismos e cianobactérias. O complexo foi imobilizado em lã de vidro e soluções aquosas dos metais, foram usadas. A

passagem das soluções através do complexo imobilizado reduziu rapidamente grandes concentrações de Cd, Pb, Cr, Se e As. Esse complexo microbiológico era composto de polissacarídeos carregados negativamente, com massa molecular acima de 200.000 Da e com alta atividade floculante.

Alguns autores, preocupados com o descarte de lixo tóxico radioativo, especialmente U, fizeram alguns importantes estudos com esse metal. Marqués et al. (1990) por exemplo, testaram o acúmulo de U por *Pseudomonas sp.* O aprisionamento do metal é rápido e pode ser influenciado pelo pH, mas não é afetado pela temperatura, por inibidores metabólicos, tempo da cultura e presença de cátions e ânions na solução. A localização de sítios de acúmulo de U, através de microscopia eletrônica, mostrou que o U se acumula intracelularmente, como fibrilas em forma de agulha.

Um exemplo de estudos de biosorção feitos em escala mais ampla, foi descrito por Gopalan & Veeramani (1994), os quais estudaram a redução do CrO_4^{-2} por *Pseudomonas sp.* em cultura aeróbia contínua. Foram avaliados nesses ensaios, as eficiências de remover o CrO_4^{-2} por biomassa sedimentada e por células em suspensão. Ambos casos foram capazes de reduzir o CrO_4^{-2} e a eficiência do processo variou em relação ao nível de CrO_4^{-2} inicial. Remoções superiores a 80 a 90 % ocorreram em períodos de 60 a 72 h.

Bactérias do gênero, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e o isolado VMC-2 (provavelmente *Camamonas testosteroni*), isoladas de torres de resfriamento foram estudadas por Cooke et al. (1995). O isolado VMC-2 removeu 95 % do CrO_4^{-2} de uma solução 20 mM de K_2CrO_4 em 45 min de incubação.

Bhide et al. (1996) testaram, em escala piloto, a remoção de CrO_4^{-2} de efluentes contaminados utilizando um isolado de *Pseudomonas mendocina*. Eles obtiveram eficiência de >99,9 % na remoção de CrO_4^{-2} em concentrações de 25 a 100 mg L^{-1} . Segundo os autores, a redução não foi afetada pelo uso de biocidas.

A biossorção por biomassa imobilizada também tem sido utilizada como alternativa para a remoção de metais de meios aquosos (Gadd & White, 1993). Na imobilização, a biomassa é encapsulada ou revestida com compostos como agar, celulose, alginatos, etil acrilatos (etileno glicol e dimetilacrilato), poliacrilamidas ou sílica gel. A biomassa pode ser utilizada tanto em seu estado natural ou modificada. Por exemplo, o uso de tratamento alcalino melhora a eficiência da biossorção de vários metais. Se o objetivo é utilizar o sistema em grande escala, a biomassa imobilizada deverá ter propriedades, como tamanho da partícula e resistência a agentes químicos, semelhantes a outros compostos adsorventes comercialmente disponíveis.

2.3.2 Precipitação por sulfeto

Em condições anaeróbicas e em presença de SO_4^{-2} , bactérias sulfato redutoras tais como *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S), como produto da oxidação de compostos orgânicos simples. O H_2S reage com muitos metais formando sulfetos insolúveis que precipitam (e.g, ZnS , CdS , CuS e FeS).

Essas reações foram descritas por Dvorak et al. (1992):



(1) Reação efetuada por bactérias sulfato redutoras

(2) Reação de precipitação dos metais onde: (M) é íon metálico e (X) sua valência.

Fude et al. (1994) testaram a remoção de CrO_4^{-2} por uma associação de bactérias sulfato redutoras, resistentes a concentrações do metal superiores a 2500 mg L^{-1} .

Segundo os autores, a remoção ocorreu devido às concentrações de sulfeto produzidas, já que a adição de molibdênio, inibidor da redução, diminuía a eficiência do processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foi coletada uma amostra do tanque de aeração no dia seis de abril de 1996. O local da coleta foi o curtume PODBOI na cidade de Leme no Estado de São Paulo.

Retirou-se a amostra da superfície utilizando-se um frasco estéril de 1,0 L de capacidade e até a execução dos testes, manteve-se a mesma sob refrigeração. Os testes foram efetuados dentro de 24 horas após a coleta.

3.2 Caracterização microbiológica na amostra de água de sistema de tratamento biológico de efluentes

Foram efetuados testes microbiológicos para determinar qualitativamente e quantitativamente, a presença de microrganismos na amostra. Foram detalhados a seguir.

3.2.1 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias totais

Fez-se a diluição em série da amostra em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada esterilizada em autoclave. Adicionou-se 1,0 mL da amostra no primeiro tubo de ensaio contendo a água estéril, obteve-se dessa forma a diluição 1/10 ou 10^{-1} .

Com auxílio de uma pipeta estéril, retirou-se 1,0 mL e transferiu-se para um segundo tubo, obteve-se dessa forma, a diluição 1/100 ou 10^{-2} . Repetiu-se esse procedimento até alcançar a diluição 1/1.000.000 ou 10^{-6} .

Plaqueou-se a amostra diluída em profundidade no meio TGEA - Triptona-Glicose-Extrato de Carne - Agar. (ver A1)

A técnica de plaqueamento em profundidade consistiu em coletar e colocar 1,0 mL da amostra diluída na base de uma placa de Petri estéril, adicionou-se aproximadamente 15 mL de meio de cultivo liquefeito, mantido a 45°C. Homogeneizou-se em movimentos circulares e esperou-se secar. Fez-se três placas para cada diluição, isto é triplicatas. Incubou-se na posição invertida em estufa a 37°C por 48 horas.

3.2.2 Contagem de Fungos Totais

Diluiu-se a amostra em série e plaqueou-se como citado anteriormente, mudou-se somente o meio de cultivo, utilizou-se o meio de cultivo BDA-Batata-Dextrose-Agar (ver A2), acidificado com 1,0 mL da solução esterilizada em autoclave de ácido tartárico a 100 g L^{-1} para cada 100 mL de meio, propiciando dessa forma um pH ótimo para o crescimento dos fungos. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas.

3.2.3 Crescimento em meio levine EMB Agar

Foi utilizada a amostra diluída da mesma forma que nos casos anteriores. A técnica de plaqueamento utilizada foi plaqueamento em superfície, que consistia em coletar-se uma alíquota de 0,1 mL da amostra diluída e adicionar-se na superfície da placa de Petri contendo o meio de cultivo solidificado Levine EMBA- Levine-Eosina-Azul de Metileno-Agar (ver A3).

Espalhou-se a amostra na superfície do meio com o auxílio de um bastão de vidro em “L” esterilizado por flambagem.

A observação do crescimento na superfície do meio de cultivo, de colônias escuras ou negras, era um indicativo da presença de bactérias *Enterobacter aerogenes* e de colônias com um brilho verde metálico, bactérias *Escherichia coli*. Para que a diferenciação não fosse prejudicada, utilizou-se o a técnica plaqueamento em superfície citada, ao invés de profundidade.

3.2.4 Crescimento em Agar para isolamento de Pseudomonas

Utilizou-se um meio de cultivo seletivo e diferencial para bactérias do gênero *Pseudomonas*, o AIP- Agar para Isolamento de *Pseudomonas* (ver A4), que possuía em sua composição um agente antimicrobiano que é ineficaz somente contra esse gênero. A fonte de carbono, Glicerol, também excluiu as bactérias incapazes de crescer tendo somente essa fonte de carbono.

Pode-se diferenciar as espécies nesse meio de cultivo, pela produção de um pigmento de cor avermelhada produzido por *P. aeruginosa* e um pigmento de cor verde azulada produzido por *P. fluorescens*.

A amostra foi diluída conforme descrito no item 3.2.1 e semeada na superfície do meio de cultivo. As placas contando o inóculo ou inoculadas, foram incubadas a 30°C por 72 horas.

3.2.5 Bactérias capazes de formar esporos

Uma alíquota de 3,0 mL da amostra foi aquecida em banho-maria a 80°C por 15 minutos, dessa forma, morreram todas as bactérias incapazes de formar esporos. Diluiu-se

posteriormente a amostra aquecida em água estéril, como indicado nos métodos anteriores e plaqueou-se em profundidade no meio de cultivo TGEA (ver A1). Incubou-se as placas em estufa a 37^oC por 48 horas. Dessa forma, pudemos selecionar somente as bactérias formadoras de esporos.

As bactérias do gênero *Bacillus* são aeróbias e capazes de formar esporos, portanto efetuar esse teste, nos deu um indicativo da presença ou ausência dessas bactérias na amostra.

3.2.6 Cromo hexavalente

A metodologia utilizada foi baseada em WATER (1997). Utilizou-se o espectrofotômetro modelo DR-2010 da HACH Company. Seguiu-se o método número 8023 ou método de difenilcarboidrazida.

Colocou-se a amostra da água em duas cubetas de 10,0 mL de capacidade. Em uma delas, adicionou-se o conteúdo de uma embalagem do reagente ChromaVer3. Homogeneizou-se bem e aguardou-se um período de reação de 5 minutos. A outra cubeta foi utilizada como controle ou branco, portanto não adicionou-se nada.

Zerou-se o aparelho com a prova em branco. Fez-se a leitura dos resultados no visor do aparelho DR-2010 a 540 nm de comprimento de onda. O resultado foi expresso em mg de Cr(VI) por litro de amostra.

3.3 Isolamento de bactérias tolerantes ao cromato

Para selecionar bactérias resistentes, foram utilizados os meios de cultivo VB-Vogel-Bonner (ver A5); CL-Caldo Luria (ver A6); CN-Caldo Nutritivo (ver A7) ; AN-Agar Nutritivo (ver A8); CNM-Caldo Nutritivo Manutenção (ver A9) e ANM-Agar

Nutritivo contendo 100 mg L^{-1} de K_2CrO_4 (ver A10). Utilizou-se também os meios de cultivo VB e CL na forma sólida, nesses casos, foi utilizado Agar-Agar a 1,5% (Boop et al., 1983).

Inicialmente, foram preparados e esterilizados 10 erlenmeyers contendo 45 mL de meio de cultivo VB. Foi adicionado asceticamente o cromato de potássio (K_2CrO_4) na forma de solução aquosa previamente esterilizada em autoclave, em proporções que adicionadas ao meio, resultaram em concentrações finais de 0, 10, 20, 40 e 80 mg L^{-1} de cromato. O teste foi feito em duplicata.

Cada frasco, foi inoculado asceticamente com 5,0 mL da amostra do curtume. A incubação foi feita sob agitação a 30°C por um período de 5 dias.

Após esse período, verificou-se o crescimento dos microrganismos pela turbidez dos meios. Dos tubos turvos isto é, que apresentaram crescimento, foram retirados asceticamente com auxílio de uma pipeta estéril, 0,1 mL da amostra e foram plaqueados em superfície no meio ANM. As placas foram incubadas por 3 dias a 30°C .

As colônias que cresceram apresentando características morfológicas diferentes, foram retiradas e transferidas, pela técnica de estrias de esgotamento, para outras placas de Petri contendo meio ANM. Foram feitas transferências por estrias de esgotamento até obtenção de colônias puras ou isolados, isto é, até que todas as colônias da placa possuíssem as mesmas características morfológicas.

Os isolados foram mantidos viáveis por transferências mensais em ANM e armazenados refrigerados.

3.4 Caracterização dos Isolados

Os objetivos dos ensaios de caracterização foram preservar as características iniciais, determinar se existia entre as bactérias isoladas, os gêneros *Pseudomonas*,

Enterobacter, *Escherichia*, *Bacillus* e selecionar bactérias de fácil manipulação, crescimento e que pudessem ser utilizadas em ensaios posteriores “in loco”.

3.4.1 Características morfológicas das colônias em meio sólido (MS)

Após crescimento das bactérias em placas de Petri contendo (ANM), observou-se as colônias com auxílio de um estereoscópio. Foram observadas as seguintes características: cor, forma e borda.

Ao transferir as bactérias mensalmente, para preservá-las, foi possível manter as características morfológicas originais, ou melhor controlar o aparecimento de bactérias contaminantes e excluí-las. Se isso não fosse efetuado, poderíamos no final do experimento ter avaliado uma bactéria contaminante do ar e não a isolada do ambiente de interesse.

3.4.2 Características morfológicas ao microscópio

Foram feitas observações das bactérias por montagem úmida e coloração de gram.

a) Para a montagem úmida, foi coletada uma pequena porção da colônia da placa de Petri crescida de 24 horas e esta foi depositada sobre uma gota de solução salina a 0,9% estéril. Espalhou-se na lâmina com auxílio de uma alça de platina e cobriu-se com a lamínula. Fez-se observação ao microscópio óptico no aumento de 1.000 vezes. Foram observadas por essa técnica motilidade, forma e arranjo das células. Para observar o movimento das células, foi desconsiderado o fluxo da partículas.

b) A coloração de gram foi feita com células crescidas de 24 horas, fixadas na lâmina com calor e submetidas à coloração diferencial segundo Pelczar et al. (1981).

Pudemos diferenciar as bactérias gram positivas das gram negativas, o que nos auxiliou muito na caracterização ou identificação dos gêneros dos isolados.

3.4.3 Características em meio líquido (ML)

Os isolados foram crescidos em meio CN (ver A7) na presença e ausência de oxigênio. Inoculou-se com uma alça de platina uma colônia no tubo de ensaio contendo CN.

Após inoculação, foram criadas duas condições, na primeira os tubos inoculados foram selados com parafina esterilizada e liqüefeita, que ao secar impediu o transporte do oxigênio do ar para o meio de cultivo, tampou-se com tampão de algodão para evitar contaminação. Na segunda condição, o tubo foi tampado apenas com o tampão de algodão, que permitiu a passagem do oxigênio. Incubou-se ambos tubos por 48 horas a 30°C. Após esse período, observou-se além da presença ou ausência de crescimento em ambas condições, o crescimento superficial (formação de película e anel) e formação de depósito (no fundo do tubo).

A forma de crescimento é um fator determinante para saber se a bactéria é aeróbia estrita, microaerófila, anaeróbia facultativa ou anaeróbia.

Segundo Canhos (1990) bactéria anaeróbia facultativa: o crescimento seria tanto em presença quanto em ausência de oxigênio. Aeróbia estrita: o crescimento seria no tubo aberto, concentrado na superfície do meio. Microaerófila: o crescimento no tubo aberto seria em toda a extensão do meio e formaria um depósito. Em alguns casos, as bactérias microaerófilas podem crescer também no tubo sem oxigênio. Anaeróbia estrita: cresceria somente no tubo sem oxigênio.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são aeróbias estritas, *Enterobacter* e *Escherichia coli*, são anaeróbias facultativas.

3.4.4 Crescimento em meio Levine EMB Agar (EMB)

Os isolados foram transferidos por estrias de esgotamento. Com auxílio de uma alça de platina, coletou-se uma colônia bacteriana e transferiu-se para o meio de cultivo EMB (ver A3). Na transferência, foram feitas estrias ou listas verticais e horizontais na superfície do meio de cultivo. Incubou-se a 37°C por 24 horas.

Verificou-se a presença ou ausência de crescimento dos isolados testados nas placas de EMB. Crescimento positivo indicou a presença de bactérias entéricas do grupo coliforme e as características das colônias diferenciou as bactérias *E. coli* de *E. aerogenes* (DIFCO, 1994).

3.4.5 Crescimento em agar para isolamento de *Pseudomonas* (AIP)

Foram transferidas colônias dos isolados por estrias de esgotamento no meio AIP (ver A4), conforme apresentado anteriormente em 3.4.4. Incubou-se as placas a 30°C por 72 horas.

A presença de crescimento nas placas, foi considerado como resultado positivo. Colônias que produziram pigmentos avermelhados podem ser diferenciadas como *P. aeruginosa* e colônias com pigmentos verde-azulados, *P. fluorescens* (DIFCO, 1994).

3.4.6 Bactérias capazes de formar esporos (ESP)

As bactérias isoladas foram transferidas das placas para o meio líquido CN (ver A7) e levadas ao banho-maria a 80°C por um período de 15 minutos. Deixou-se um tubo sem inóculo como controle, incubou-se os tubos em estufa por 48 horas a 30°C.

O aparecimento de turbidez nos meios foi considerado como crescimento positivo, porque a bactéria analisada foi capaz de produzir esporos e crescer após o aquecimento.

3.4.7 Produção de ácidos em meio com CaCO₃ (AC)

Foi preparado um meio de cultivo muito utilizado para crescimento de bactérias acéticas AC (ver A11), contendo uma fonte de carbono como glicose, fonte de nitrogênio e macro e micronutrientes como extrato de levedura e extrato de carne, o carbonato de cálcio como o agente para detecção da produção de ácidos e agar para solidificar o meio (BERGEY'S,1984). Os isolados foram inoculados através de estrias na superfície do meio. Foram anotadas as características de crescimento e a produção de ácidos através da formação de halos incolores ao redor das colônias crescidas em estufa por 48 horas a 30°C.

Utilizou-se esse meio de cultivo para diferenciar as bactérias entéricas gram negativas aeróbicas, das bactérias acéticas, que crescem muito e produzem ácidos nesse meio de cultivo.

3.4.8 Crescimento em CN contendo NaCl

Foram preparados meios de cultivo CN (ver A7) contendo 8, 10, 20 e 100 mg L⁻¹ de NaCl e esterilizados em autoclave. Foi transferido para cada tubo, uma colônia bacteriana com auxílio de uma alça de platina. Incubou-se por 48 horas a 30°C. Após esse período, observou-se o aparecimento de crescimento pela turbidez dos meios comparando-se com uma prova em branco (sem inóculo) de cada concentração.

Quanto maior a resistência à salinidade, indica que pode-se trabalhar com os isolados em ambientes salinos e pode-se diferenciar os gêneros de bactérias gram (-).

3.4.9 Crescimento em CN com diferentes valores de pH

Preparou-se os meios de cultura CN e ajustou-se o pH para 4,0; 6,0 e 8,0 com NaOH e HCl a 1 mol L^{-1} ou $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Transferiu-se com uma alça de platina uma colônia dos isolados para os tubos e incubou-se por 48 horas a 30°C . Determinou-se o crescimento positivo pela turbidez dos meios comparando-se com uma prova em branco ou controle sem inóculo, para cada concentração.

Quanto maior a disposição das bactérias em crescer em condições adversas, maiores as possibilidades de sobrevivência no meio ambiente.

3.4.10 Crescimento em CN com diferentes temperaturas

Semeou-se três tubos de ensaio contendo o meio de cultivo NA com uma colônia da bactéria isolada. Cada um dos tubos foi incubado em uma temperatura diferente: 4 , 37 e 42°C por 48 horas. Observou-se o aparecimento ou não de crescimento, anotando-se os resultados como positivo ou negativo.

As espécies de *Pseudomonas* podem ser diferenciadas pela capacidade em crescer nessas temperaturas. Por exemplo *P. aeruginosa* pode crescer a 42°C e não a 4°C , mostrando mais uma vez a capacidade desse gênero de crescer em diferentes ambientes.

3.4.11 Motilidade em meio de cultivo semi-sólido (AM)

Foi utilizado o meio de cultivo AM- Agar motilidade (ver A12). Não inclinou-se os tubos. Fez-se a semeadura aseticamente por punção no meio de cultivo. Os tubos foram incubados por 48 horas a 30°C. Após esse período, foram consideradas móveis as bactérias que possuíam crescimento difuso ou espalhado nas proximidades da linha de inoculação. A ausência dessa característica foi considerada como motilidade negativa.

3.5 Teste de tolerância ao CrO_4^{-2}

O experimento foi conduzido segundo Bopp et al. (1983). Para cada bactéria analisada, utilizou-se 25 tubos de ensaio contendo 5,0 mL de meio de cultivo VB (ver A5). Foram utilizadas três repetições e cinco diferentes concentrações de CrO_4^{-2} : 0, 300, 600, 1.200 e 1.800 mg L^{-1} . Transferiu-se posteriormente 50 μL de inóculo padrão para cada tubo de ensaio.

O inóculo padrão foi obtido transferindo-se uma colônia da bactéria isolada para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de CL (ver A6). Incubou-se por 48 horas a 30°C. Esse inóculo de 10^7 UFC mL^{-1} , garantiu que todos os tubos testados tivessem a mesma proporção celular. A contagem das células foi feita indiretamente através da obtenção da curva de crescimento citada em 3.6, onde relacionou-se a absorbância com o contagem de bactérias aeróbias totais obtidas por plaqueamento em profundidade. As absorbâncias dos inóculos padrão foram obtidas em espectrofotômetro a 600 nm. O valor das absorbâncias dos inóculos iniciais foram: isolado 21 = 0,025; isolado 14 = 0,059 e isolado 8 = 0,090.

3.6 Determinações das curvas de crescimento dos isolados bacterianos

Foram utilizados somente três dos 21 isolados. A seleção foi feita tomando-se como base a facilidade de crescimento, resistência ao Cr(VI), perfil de semelhança com bactérias capazes potencialmente de reduzir cromato como *Enterobacter* e *Pseudomonas*, que tivessem características morfológicas diferentes.

Para o ensaio, foram utilizados 4 erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio CN tampados com tampão de algodão e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C.

Preparou-se o inóculo padrão conforme descrito anteriormente no item 3.5. Cada erlenmeyer recebeu 0,5 mL da solução bacteriana padrão, representando uma concentração final de inóculo de 10 g L⁻¹. Incubou-se os erlenmeyers a 30°C.

Utilizou-se espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda para fazer as determinações da absorbância do CrO₄⁻². Para a contagem do número de células bacterianas, utilizou-se a técnica do plaqueamento em profundidade em meio de cultivo AN. Para cada tempo analisado retirou-se alíquotas de aproximadamente 3,0 mL da amostra dos frascos.

As curvas de crescimento foram obtidas para os intervalos de tempo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 24, 48 e 72 horas.

3.7 Remoção do CrO₄⁻² de soluções aquosas

Para cada unidade experimental, foram utilizados frascos erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 50,0 mL do meio de cultivo CN. Acrescentou-se ao meio a solução de cromato de potássio e 5,0 mL de inóculo padrão contendo aproximadamente

10^7 UFC mL⁻¹ das bactérias 8, 14 e 21. As concentrações de cromato testadas foram 0, 60, 300, 600, 1.200 e 1.800 mg L⁻¹.

Foi feita a leitura da densidade ótica da remoção do cromato, em espectrofotômetro a 382 nm de comprimento de onda após centrifugar as amostras a 10.000 g e filtrar o sobrenadante em filtro Millipore de 0,45 µm de porosidade.

Para obter o valor da concentração de cromato em mg L⁻¹, foi construído anteriormente ao ensaio de remoção, uma curva padrão para o K₂CrO₄ no meio de cultivo CN, variando-se o cromato de potássio de 10 em 10, partindo-se de 0 até 100 mg L⁻¹, em seis repetições. Fez-se a análise de regressão, obteve-se o r^2 e a equação da regressão. (Apêndice 1). Com base nessa equação foram calculados os valores de CrO₄⁻² do experimento.

Para o crescimento celular, coletou-se 1,0 mL da amostra e fez-se a leitura da densidade ótica diretamente no espectrofotômetro a 600 nm. Utilizou-se metodologia descrita em Boop & Erhlich (1988).

3.8 Testes bioquímicos

Os testes selecionados a seguir tiveram como objetivo identificar o gênero dos isolados para verificar se pelo menos um entre os três isolados, pertencia ao gênero *Pseudomonas*. Utilizamos também testes que diferenciavam bactérias entéricas gram negativas. Foi elaborada uma chave dicotômica a partir das referências citadas acima para a identificação dos isolados (ver B1). Baseou-se na metodologia descrita por Canhos (1990), DIFCO (1994) e BERGEY'S (1974;1984).

Enzimas respiratórias terminais

Foi verificada a presença ou ausência das enzimas catalase e oxidase. Diferenciam para bactérias gram negativas aeróbias obrigatórias e das anaeróbias facultativas ou anaeróbias estritas.

Teste de Catalase

Retirou-se uma colônia de bactéria da placa contendo meio de cultivo NA. As células foram crescidas por 24 horas a 30°C. Espalhou-se a mesma sob uma lâmina de microscópio limpa e estéril. Adicionou-se uma gota de água oxigenada a 30 g L⁻¹. O resultado positivo foi observado pelo desprendimento de bolhas de ar. Foi utilizada a metodologia descrita em Canhos (1990)

Teste de Oxidase

Utilizou-se tiras de papel de filtro esterilizadas impregnadas com soluções a 10 g L⁻¹ de tetrametil-parafenilenediamino-dihidrocloreto. Retirou-se uma colônia crescida de uma placa contendo células de 48 horas de crescimento e diluiu-se em 1,0 mL de água destilada esterilizada em autoclave, o papel de teste foi embebido na amostra diluída. O resultado positivo foi observado pela mudança da cor do papel em 30 segundos de branco para azul-púrpura (DIFCO,1994).

Oxidação ou fermentação de glicose (OF)

Esse teste determinou o tipo de metabolismo, pelo qual a glicose foi utilizada pelo microrganismo. Foram semeados tubos de ensaio contendo meio basal de oxidação e fermentação OF (ver A13). Para evitar a entrada de oxigênio, um dos tubos foi selado com parafina e o outro permaneceu aberto. Incubou-se por 14 dias a 30°C.

Foi observada a mudança de coloração do meio de cultivo de verde-azulado para amarelo, devido a produção de ácidos, que abaixaram o pH e mudaram a cor do indicador.

Foi considerado que a bactéria tinha metabolismo oxidativo quando a mudança de cor ocorreu somente no tubo aberto, e metabolismo fermentativo o crescimento no tubo selado com parafina ou em ambos tubos. Em alguns casos não foi notada nenhuma mudança de cor, isso foi considerado como inalterado, ou seja, a bactéria não produziu ácidos à partir da glicose e não é oxidativa nem fermentativa.

Esse teste auxiliou a diferenciar *Pseudomonas* que têm metabolismo oxidativo.

Teste de Voges-Proskauer

Foram inoculadas as culturas em tubos de ensaio contendo meio MR-VP glicose e fosfato (ver A14) e incubados a 30°C por 48 horas. Após incubação, foram adicionados para cada 1 mL de meio, 0,5 mL da solução de KOH a 400 g L⁻¹. Adicionou-se também 1 gota de solução de alfa Naftol a 50 g L⁻¹ para acelerar a reação. Observou-se o aparecimento de uma coloração vermelha em 15 a 60 segundos.

Esse teste auxilia na diferenciação de gêneros de bactérias entéricas.

Utilização de diferentes fontes de carbono

Este ensaio determinou quais fontes de carbono as bactérias são capazes de utilizar. As fontes foram selecionadas de acordo com as descrições de bactérias *Pseudomonaceae* e *Enterobacteriaceae*.

Foi preparado e esterilizado o meio de cultura VF-Agar base vermelho de fenol (ver A15). Distribuiu-se asepticamente, 5,0 mL em tubos de ensaio pequenos. Separadamente esterilizou-se em filtros Millipore de 0,22 μm , as soluções a 100 g L⁻¹ das fontes de carbono. Adicionou-se 50 μL ao meio de cultura basal, obteve-se uma concentração final de 10 g L⁻¹. A mudança na coloração do meio para amarelo ou laranja indicou teste positivo para a fonte de carbono testada.

As fontes de carbono testadas foram: maltose, adonitol, salicina, arabinose, inositol, sorbitol, sacarose, manitol, acetamida, malonato, rafinose, acetato. Os tubos foram semeados por punção, isto é introduzindo-se uma agulha de platina esterilizada por flambagem nos tubos contendo o meio de cultivo. Incubou-se por 48 horas a 30°C.

Degradação de uréia

A degradação da uréia na bactéria é feita com o auxílio da enzima urease formando da decomposição, duas moléculas de amônia.

Utilizou-se o meio de cultura UAB-Uréia Agar Base (ver A16). Incubou-se por 14 dias a 30°C. A degradação da uréia foi indicada pela alcalinização do meio e mudança na coloração de rósea a vermelha, indicando teste positivo.

Crescimento em meio para bactérias desnitrificantes

Foi preparado meio de cultivo CNI-Caldo Nitrito (ver A22) em tubos de ensaio, contendo a fonte de nitrogênio como o nitrito de sódio. Foram introduzidos tubos de fermentação ou Durhan invertidos antes da esterilização.

Semeou-se os meios com os isolados e incubou-se por 72 horas a 37°C. O crescimento positivo foi considerado pela produção de gás N₂, observada por bolhas de ar no interior dos tubos de Durhan.

A capacidade de reduzir o nitrito para nitrogênio pode ser observada em *Pseudomonas* sp.

Crescimento em meio para bactérias nitrificantes

Utilizou-se um meio de cultivo específico para bactérias nitrificantes N- Caldo Nitrato (A17). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 25°C por 10 dias.

Após esse período, foi feito um teste em placas sulcadas de porcelana para determinar se houve a reação de redução do nitrato para nitrito ou oxidação no nitrito para nitrato, utilizando-se duas soluções específicas contendo naftilamina e ácido sulfanílico (soluções 1 e 2 ver A17).

Coletou-se com auxílio de uma pipeta, 0,5 mL do meio de cultivo e colocou-se em placas sulcadas. Foi adicionado 1 gota de cada uma das soluções. A oxidação ou redução dos compostos nitrogenados, foi observada pela mudança na cor do meio contendo a bactérias crescida. Mudanças na coloração dos meios de incolor a rosa e vice-versa, indicaram resultado positivo para bactérias nitrificantes (DIFCO, 1994).

Teste descarboxilação de aminoácidos (lisina-LDC, arginina-ADH e ornitina-ODC)

Com esse teste mediu-se a capacidade enzimática de um microrganismo em descarboxilar um aminoácido para formar uma amina, resultando portanto em alcalinidade. O meio de cultura utilizado foi o meio basal de Moller decarboxilase-MBMD (ver A23) contendo o aminoácido a ser testado (lisina-ornitina-arginina) em concentrações de 10 g L⁻¹.

Semeou-se os tubos com os isolados e deixou-se um controle ou branco (sem inoculo). Cobriu-se todos os tubos com óleo mineral estéril e incubou-se a 30°C por 96 horas. O resultado positivo foi observado por mudança da cor do meio de cultivo para púrpura escuro devido à reação alcalina e o resultado negativo foi considerado nos tubos amarelos devido a produção de ácidos. As reações positivas foram devido às enzimas atuantes: arginina decarboxilase, lisina decarboxilase ou orinitina decarboxilase (DIFCO,1994).

Teste de indol

Utilizou-se o meio de cultura caldo de triptona a 10 g L⁻¹ e reagente de Kovacs. Os isolados foram semeados no CT-Caldo triptona (ver A18) e incubados a 30-32°C por 48 horas. Após o crescimento, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Kovacs. Observou-se a presença ou ausência de indol pela formação de um anel vermelho na superfície do meio. O indol detecta a presença da enzima triptofanase (DIFCO, 1994).

Teste de citrato

Foi utilizado o meio de cultivo ACS-Agar Citrato Simmons (ver A19). Dispensou-se o meio em placas de Petri estéreis e semeou-se os isolados na superfície do meio através da técnica de estrias de esgotamento. Incubou-se as placas por 48 horas a 30°C. O teste positivo foi indicado pela mudança na coloração do meio de verde para azul, devido ao aumento do pH.

Teste de produção de H₂S

Preparou-se o meio de cultivo APF- Agar Peptona Ferro (ver A20) e semeou-se os isolados por punção. Os tubos foram incubados a 30°C por 24 a 48 horas. A produção de H₂S ou reação positiva, foi determinada pelo desenvolvimento de coloração preta do meio de cultura, devido à formação de sulfeto férrico (DIFCO,1994).

Teste de atividade proteolítica

Utilizou-se a formulação do meio de cultivo NG-Nutriente Gelatina (ver A21). Após esterilização, os meios já resfriados na temperatura ambiente, foram semeados com os isolados em teste. Incubou-se a 30°C por 48 horas. Após crescimento, os tubos foram mantidos em refrigeração a 4°C por um período de 8 horas. Observou-se os tubos que não estavam solidificados, ou melhor que estavam liquefeitos. A liquefação foi devido à enzima proteolítica ou protease presentes em bactérias do gênero *Pseudomonas*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização microbiológica na amostra de água de sistema de tratamento de efluentes

Vários fatores influenciaram na escolha da amostra para isolamento de microrganismos capazes de remover cromato de solução aquosa, dentre eles: 1) presença de um grande número de bactérias heterotróficas aeróbias; 2) crescimento em ambiente contaminado com altas concentrações de Cr(VI); 3) ambiente com alta concentração de matéria orgânica.

Os ensaios de caracterização foram direcionados especialmente à detecção de bactérias entéricas como *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* e *Bacillus*, já que essas bactérias têm sido apontadas como eficientes para a remoção de metais pesados de soluções (Ohtake et al. (1987); Bopp & Ehrlich (1988); Ishibashi et al (1990); Komori et al. (1990); Pons & Fusté (1993); Shen & Wang (1993); Gopalan & Veeramani (1994); DeLeo & Ehrlich (1994); Lovley (1994); Itoh et al.(1995); Shen & Wang (1995); e Cifuentes et al. (1996); Walsh & O'halloran (1996a;b).

Na caracterização da amostra contendo 68,4 mg L⁻¹ de Cr(VI), foram encontradas bactérias heterotróficas aeróbias, fungos, bactérias capazes de crescer em meio específico para *Pseudomonas* e em meio de cultivo para bactérias entéricas, como pode ser visto na tabela 1. A amostra apresentou um grande número de bactérias potencialmente úteis e foram utilizadas para o isolamento, bactérias potencialmente úteis e foram utilizadas nos ensaios de remoção de CrO₄⁻².

4.2 Isolamento de bactérias tolerantes ao CrO_4^{-2}

Após incubação por 5 dias, todos os meios de cultura inoculados com a amostra de água do tanque aerado do sistema de tratamento de efluentes do curtume apresentaram crescimento positivo.

Desses meios de cultura, foram isolados e purificados de diferentes concentrações de cromato, 21 bactérias. Essas colônias foram diferenciadas por sua forma e coloração em meio sólido. Na tabela 2, são apresentados os isolados bacterianos obtidos e as concentrações de cromato nas quais eles foram selecionados.

A quantidade de isolados bacterianos obtidos foram 3, 4, 3, 2, e 9 em meios de cultivo contendo 0, 10, 20, 40 e 80 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} , respectivamente.

O fato dos isolados 8, 10 e 13 terem sido selecionados em meio sem cromato, não representa necessariamente que os mesmos sejam sensíveis ao metal, já que o ambiente de onde foram obtidos apresentava aproximadamente 70 mg L^{-1} de Cr(VI). Além disso, as bactérias cresceram no meio de cultivo de manutenção ANM contendo 40 mg L^{-1} de Cr(VI). Provavelmente a deficiência de nutrientes do meio de cultivo VB, impossibilitou o desenvolvimento das culturas em presença de CrO_4^{-2} (Turick et al., 1996). Devido a esse fator foi utilizado nos experimentos posteriores o meio de cultivo CN.

4.3 Caracterização dos isolados

Os isolados 8, 14 e 21 foram multiplicados e preservadas através de transferências mensais no meio de cultivo de manutenção ANM contendo 40 mg L^{-1} de cromato. Os resultados dos ensaios de caracterização morfológica e bioquímica podem ser vistos nas tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Para identificar o gênero dos isolados, utilizou-se a chave dicotômica elaborada segundo BERGEY (1974) e as características dos gêneros (ver anexo B1). Com base nos resultados dos testes bioquímicos e morfologia das células bacterianas, e utilizando-se a chave dicotômica descrita, foi possível identificar o isolado 8 como homólogo às bactérias do gênero *Acinetobacter*, o isolado 14 ao gênero *Pseudomonas* e o isolado 21 ao gênero *Listeria*.

Todas os ensaios foram muito importantes para a diferenciação dos gêneros, as características morfológicas ao microscópio e a reação de gram foram decisivas. Os isolados 8 e 21, por exemplo apresentaram características dúbias ao microscópio, especialmente em relação à forma e coloração de gram. Segundo Krieg & Holt (1984), podemos considerar as células com mudanças na reação de gram como variável e na forma como pleomórficas. O isolado 14 não gerou dúvidas, pois em todas as observações foi possível determinar as mesmas características (bastonetes gram negativos). O isolado 21 apresentou reação de gram variável, pois 24 horas a reação foi gram positiva e após 8 dias, gram negativa. Pelas descrições do gênero no manual BERGEY,1984. O isolado 8 apresentou a forma de bastonetes em 24 horas e em 48 horas, bastonetes cocóides.

Tabela 1 - Características microbiológicas da amostra de água do tanque de aeração do sistema de tratamento de efluentes do curtume PODBOI- (Leme-SP).

Parâmetros analisados	UFC mL ⁻¹⁽²⁾
Bactérias Heterotróficas Aeróbias Totais	7,0 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹
Fungos Totais	1,0 x 10 ² UFC mL ⁻¹
Crescimento em meio Levine EMB agar	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ⁽¹⁾	< 10 UFC mL ⁻¹
<i>Enterobacter aerogenes</i> ⁽¹⁾	6,0 x 10 ² UFC mL ⁻¹
Crescimento em Agar para isolamento de Pseudomonas	2,3 x 10 ² UFC mL ⁻¹
Bactérias capazes de formar esporos	5,0 x 10 ² UFC mL ⁻¹

⁽¹⁾ Bactérias identificadas pelas características de crescimento no meio de cultivo Agar Levine eosina azul de metileno (Levine EMB-Agar).

⁽²⁾ UFC = Unidade Formadora de Colônia.

A concentração de Cr(VI) na amostra foi de 68,4 mg L⁻¹.

Tabela 2 - Concentrações de CrO₄⁻² no meio de cultura VB para obtenção dos diferentes isolados bacterianos.

CrO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	Identificação do isolados
0	8, 10 e 13
10	6, 7, 14 e 16
20	11, 15 e 20
40	9 e 19
80	1, 2, 3, 4, 5, 12, 17, 18 e 21

Tabela 3 - Características das colônias de bactérias isoladas em meio Agar Nutritivo (AN).

Identificação do isolado	Meio sólido		
	Cor	forma	Borda
1	laranja	irregular ⁽¹⁾	ondulada ⁽²⁾
2	laranja	irregular	ondulada
3	laranja	irregular	ondulada
4	branca	circular	lisa ⁽³⁾
5	branca	circular	lisa
6	branca	circular	lisa
7	branca	circular	lisa
8	branca	circular	lisa
9	branca	circular	lisa
10	branca	circular	lisa
11	translúcida	irregular	ondulada
12	branca	circular	lisa
13	translúcida	circular	lisa
14	translúcida	irregular	ondulada
15	translúcida	irregular	ondulada
16	translúcida	circular	lisa
17	laranja	circular	lisa
18	laranja	irregular	ondulada
19	branca	circular	lisa
20	translúcida	irregular	ondulada
21	branca/amarela	circular	lisa

⁽¹⁾ forma irregular = qualquer forma diferente da circular

⁽²⁾ borda ondulada = borda da colônia em forma de ondas

⁽³⁾ borda lisa = borda da colônia inteiramente lisa

Tabela 4 - Características das culturas isoladas em meio líquido Caldo Nutriente.

Identifi- cação do isolado	Crescimento			
	Aeróbio	Anaeróbio	Superficial	Depósito ⁽¹⁾
1	+	+	-	+
2	+	+	-	+
3	+	+	-	+
4	+	-	-	+
5	+	-	-	+
6	+	-	+	+
7	+	-	-	+
8	+	-	-	+
9	+	-	-	+
10	+	-	-	+
11	+	-	+	-
12	+	-	-	+
13	+	-	-	+
14	+	-	+	-
15	+	-	+	-
16	+	+	+	-
17	+	-	+	-
18	+	-	-	+
19	+	-	-	+
20	+	-	+	-
21	+	-	-	+

(1) Depósito = precipitação de massa celular no fundo do tubo.

(+) = Crescimento presente e (-) = Crescimento ausente.

Tabela 5 – Coloração de gram e características morfológicas das células bacterianas em análise microscópica.

Identificação dos isolados	Morfologia		
	Gram	forma	extremidades
1	+	bastonetes	arredondadas
2	+	bastonetes	arredondadas
3	+	bastonetes	arredondadas
4	-	bastonetes	pontiagudas
5	-	bastonetes	pontiagudas
6	+	bastonetes	arredondadas
7	-	bastonetes	arredondadas
8	-	bastonetes/ cocos	arredondadas
9	-	bastonetes	arredondadas
10	+	bastonetes	pontiagudas
11	-	bastonetes	arredondadas
12	-	bastonetes	arredondadas
13	-	bastonetes	arredondadas
14	-	bastonetes	arredondadas
15	-	bastonetes	arredondadas
16	+	cocos	circulares
17	+	cocos	circulares
18	+	cocos	circulares
19	+	bastonetes	arredondadas
20	-	bastonetes	arredondadas
21	±	bastonetes	arredondadas

(±) reação de gram variável.

Tabela 6 - Características de crescimento dos isolados bacterianos em meios seletivos e diferenciais.

Identificação dos isolados	Crescimento				
	EMB	PIA	OF	ESP	AC
1	+	-	F	-	-
2	-	-	F	-	-
3	-	-	F	-	-
4	-	-	I	+	-
5	-	-	I	-	-
6	-	-	I	-	+
7	-	-	I	-	+
8	+	-	I	-	-
9	+	-	I	-	-
10	+	-	I	+	-
11	+	+	I	-	+
12	-	-	I	-	-
13	+	-	F	+	-
14	-	+	O	-	+
15	-	-	I	-	-
16	-	-	I	-	-
17	-	-	I	-	-
18	-	-	I	-	-
19	-	-	O	-	-
20	+	-	I	-	+
21	+	-	F	-	-

EMB = Agar levine eosina azul de metileno; AIP= Agar para isolamento de Pseudomonas; OF=Meio basal de oxidação e fermentação; ESP=Capacidade de formar endosporos; AC = Meio para produção de ácidos; O= Oxidativo; F= Fermentativo; I = Inalterado; (+) presença de crescimento ou reação positiva; (-) ausência de crescimento ou reação negativa.

Tabela 7 - Características de crescimento dos isolados bacterianos em diferentes valores de pH, salinidade e temperatura.

Identificação dos isolados	Temperaturas (°C)			pH			NaCl (g L ⁻¹)			
	4	37	42	4,0	6,0	8,0	8	10	20	100
1	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
2	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
3	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
4	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
5	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
6	-	+	F	+	+	+	+	+	+	-
7	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
8	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
9	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
10	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
12	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
13	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
14	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-
15	-	+	F	-	+	+	+	+	+	+
16	-	+	F	-	+	+	+	+	+	+
17	-	+	F	F	+	+	+	+	+	-
18	-	+	F	F	+	+	+	+	+	-
19	-	+	F	-	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	F	+	+	+	+	+	-
21	-	+	F	-	+	+	+	+	+	-

F= crescimento fraco; (+)= presença de crescimento avaliada pela turbidez no meio(-)= ausência de crescimento. As bactérias foram cultivadas em meio CN.

Tabela 8 – Capacidades bioquímicas e morfologia dos isolados 8, 14 e 21.

Testes bioquímicos ou forma	ISOLADO 8	ISOLADO 14	ISOLADO 21
1. Catalase	+	+	+
2. Oxidase	-	+	+
3. Hugh-Leifson (OF)	I	O	F
4. Voges-Proskauer	-	-	-
5. Urease	-	+	-
6. Desnitrificação	-	+	-
7. Nitrificação	-	-	-
8. Lisina Descarboxilase	-	-	-
9. Ornítina Descaboxilase	-	-	-
10. Arginina Descarboxilase	-	+	-
11. Indol	-	-	-
12. Citrato	-	+	-
13. H ₂ S	-	-	-
14. Liquefação Gelatina	-	+	-
15. Motilidade	-	+	+
16. Maltose	-	+	-
17. Adonitol	-	-	-
18. Salicilato	-	-	-
19. Arabinose	+	+	+
20. Inositol	-	-	-
21. Sorbitol	-	-	-
22. Sacarose	+	-	+
23. Manitol	-	-	-
24. Rafinose	-	-	-
25. Malonato	+	-	+
26. Esculina	+	-	+
21. Arginina	-	+	-
22. Acetato	+	+	-
23. Gram	-	-	±
24. Forma	Bastonete	Bastonete	Bastonete

F= Fermentativo; I= Inalterado; O= Oxidativo; (+)=reação positiva (-)=reação negativa e (±)=reação gram variável.

Os ensaios foram conduzidos segundo Canhos (1990).

4.4 Determinação das curvas de crescimento dos isolados bacterianos

As curvas de crescimento obtidas mostraram que o isolado 8 (*Acinetobacter* sp) apresentou uma fase lag menor do que os isolados 14 (*Pseudomonas* sp) e 21 (*Listeria* sp). No que diz respeito à fase de declínio ou morte, esta não foi observada para os isolados de número 8 e 21 após 72 horas de cultivo em meio CN. O isolado 14, entrou na fase de declínio após 48 horas de crescimento (Apêndice 1).

Com a curva de crescimento, foi possível estimar o número de células em suspensão para o preparo do inóculo padrão a ser utilizado no restante do experimento.

4.5 Ensaio de tolerância ao CrO_4^{-2}

Foi observado etapa que os isolados com maior capacidade de crescimento em meio de cultivo contendo Cr(VI) toleram concentrações muito elevadas até 1.800 mg L^{-1} CrO_4^{-2} (Tabela 9). Os autores Bopp & Ehrich (1988); Bopp et al. (1983); Campos et al.(1995) isolaram bactérias tolerantes a até 1500 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} .

O isolado 8 e 21 toleraram doses de CrO_4^{-2} de 1.800 e 1.200 mg L^{-1} , respectivamente.

O isolado 14 não cresceu em meio com 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} , e foi utilizado nos demais experimentos como uma linhagem de baixa tolerância ao metal, ou seja, tolera doses inferiores a 40 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} .

Os isolados 4, 5, 7 e 12 toleram até 600 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} , enquanto o isolado 6 tolerou até 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} e os demais isolados (1, 2, 3, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20) não toleram a dose mínima de 60 mg L^{-1} .

Foi observado que apesar de não terem tolerado 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} , os isolados 1, 2, 3, 4, 5, 12, 17 e 18 toleraram concentrações de 80 mg L^{-1} no meio para isolamento.

Segundo Turick et al. (1996) algumas bactérias são mais eficientes em resistir e remover o Cr(VI) quando estão em associadas a outras bactérias, pois pode estar ocorrendo mutualismo.

Tabela 9 - Crescimento dos isolados obtidos em meio de cultivo VB utilizando-se diferentes concentrações de CrO_4^{-2} .

Identificação dos isolados	Doses de CrO_4^{-2} (mg L^{-1})					
	0	60	300	600	1.200	1.800
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-	-
6	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+	-

(1) Abreviações: (+) = presença de crescimento (turbidez) em meio CN após 72 horas;

(-) ausência de crescimento (turbidez) em meio CN após 72 horas.

4.6 Remoção do CrO_4^{-2} de soluções aquosas

O crescimento bacteriano obtido nas diferentes concentrações de CrO_4^{-2} pode ser observado na Figura 2. Os dados são apresentados como A600 determinada após de vários tempos de incubação. A relação entre A600 e o número de células está expressa no Anexo C1.

Para o isolado 8, não foram observadas diminuição no crescimento da bactéria em função do aumento das concentrações de CrO_4^{-2} . No meio de cultivo sem CrO_4^{-2} , observou-se que a bactéria cresceu menos que nas demais concentrações (Figura 2A). No caso desse isolado, o Cr(VI) melhorou o crescimento celular e nas figuras 2B e 2C, pode-se observar somente que a fase lag da bactéria aumentou em função do aumento da concentração de CrO_4^{-2} . Em doses de 0 e 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} obteve-se crescimento imediatamente após inoculação e 1 dia após inoculação, respectivamente. Nas demais concentrações, o crescimento foi maior após 4 dias de incubação. Observou-se também que nas menores concentrações (0 e 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2}) após dois dias, o isolado 14 entrou na fase de declínio.

O isolado 8 removeu mais CrO_4^{-2} , seguido pelo isolado 21 e por último o isolado 14. Observou-se também uma taxa de crescimento também maior para o isolado 8.

Na figura 3 pode-se notar que no meio “sem inoculação” ocorreu uma redução na concentração de cromato, independente da concentração de cromato. Por exemplo, 60 mg L^{-1} em 16 dias foram reduzidos para aproximadamente 30 mg L^{-1} . Segundo Wang & Shen (1995) isso se deve ao fato de que os meios de cultivo contendo extrato de levedura e caldo nutritivo, possuem compostos orgânicos com grupamentos sulfidril.

A Figura 4A e 4E apresenta a variação percentual de CrO_4^{-2} em solução em relação ao controle sem inoculação. Com base nesses dados, podemos dizer que o isolado 8 foi o mais eficiente na remoção do CrO_4^{-2} da solução, retirando 100% do metal após 3 dias de incubação na presença de 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} inicial (Figura 4A). Nas doses mais elevadas, remoções de 100% foram obtidas somente após 16 dias de incubação.

A eficiência de remoção do cromato diminuiu com o aumento da concentração inicial em solução (Figura 4A-E). Essa diminuição de eficiência foi bastante evidente nos meios inoculados com os isolados 14 e 21. Isso teve uma correlação direta com o nível de resistência das bactérias.

O isolado 21 gram negativo, além de ser resistente ao CrO_4^{-2} , removeu até 100% do metal da solução. Tem sido proposto que a resistência ao metal pesado está associada à capacidade que a mesma tem em remover ou reduzir o metal da solução (Boop & Erhlich, 1988; Wang & Shen, 1995).

De acordo com Turick et al. (1996); Ron et al. (1992), o crescimento dos isolados 1, 2, 3, 4, 5, 12, 17 e 21 a 80 g L^{-1} no teste de isolamento e a incapacidade dos mesmos em resistir a 60 mg L^{-1} no teste de resistência, pode ser explicada pela presença dos outros isolados. Por exemplo, o isolado 21 teria removido o metal da solução possibilitando o desenvolvimento das outras bactérias e possivelmente a associação das outras bactérias teriam fornecido outros nutrientes ao isolado 21.

Em bactérias gram negativas, por exemplo, o isolado 14 ou *Pseudomonas*, reduziu em torno de 70% do CrO_4^{-2} somente na concentração de 60 mg L^{-1} e produziu muito muco no meio de cultivo em concentrações de 0 e 60 mg L^{-1} . Segundo Marqués et al., 1990; Marqués et al., 1991; Falla & Block, 1993; Ohtake et al., 1987, o mecanismo de redução de metais das bactérias do gênero *Pseudomonas* é através do aprisionamento ou bio-sorção dos metais pela produção de polímeros extracelulares.

A metodologia utilizada, analisou somente a fração solúvel e não o sedimento. Análises de Cr(VI) nesse muco ou depósito poderão ser conduzidas em experimentos posteriores para verificar se a remoção foi devido ao mecanismo de sorção, devido a produção de polímeros extracelulares.

O isolado 8 ou *Acinetobacter*, gram negativa, cresceu em ambiente contendo $68,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr(VI), tolerou 1.800 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} e removeu até 100% do metal da solução após 3 dias.

Segundo Falla & Block, a parede celular de bactérias gram negativas, geralmente são compostas de exopolissacarídeos, outra membrana, peptídeo glicano e a membrana citoplasmática e estas são capazes de ligar íons metálicos. Exopolissacarídeos também podem ser contaminados por proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que são capazes por sua vez de se ligar a altas concentrações de íons metálicos. A outra membrana também é capaz de remover metais por ligações com nos fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos. Existe portanto uma grande habilidade das células gram negativas remover metais de soluções pelo mecanismo de biossorção.

Células gram positivas como o isolado 21, não possuem a outra membrana mas possuem uma espessa camada de peptidoglicanos e algumas formam cápsula (Pelczar, 1984). Apesar de células gram positivas serem potencialmente capazes de efetuar a remoção do (Cr) por mecanismos de biossorção, é mais evidente que seja por enzimas. Como por exemplo, Campos et al.(1995) avaliou espécies de *Bacillus* (gram positivo) e observou que a redução do Cr(VI) para o Cr(III) estava ligada a mecanismos enzimáticos ou redutases solúveis dependentes de NADH.

Existe um interesse muito grande no uso de bactérias aeróbias não patogênicas capazes de remover metais de soluções para a propósitos de biorremediação (Lovley, 1994; Cervantes et al., 1990). O baixo custo do tratamento e a facilidade de manuseio tornam o processo possível de ser viabilizado em grande escala. As únicas variáveis seriam, o substrato necessário para o desenvolvimento das mesmas, que pode ser o próprio resíduo do efluente, como é o caso dos curtumes e as células viáveis.

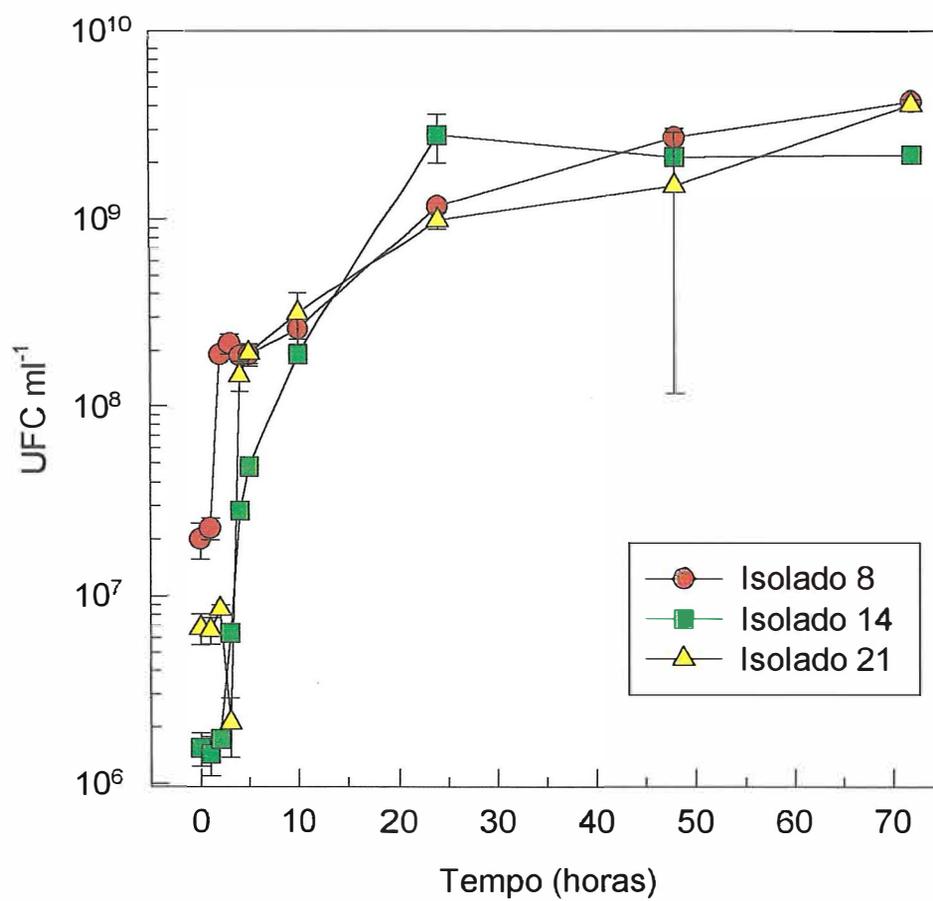


Figura 1- Curvas de Crescimento dos isolados 8, 14 e 21 em meio Caldo Nutriente. Dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão da média.

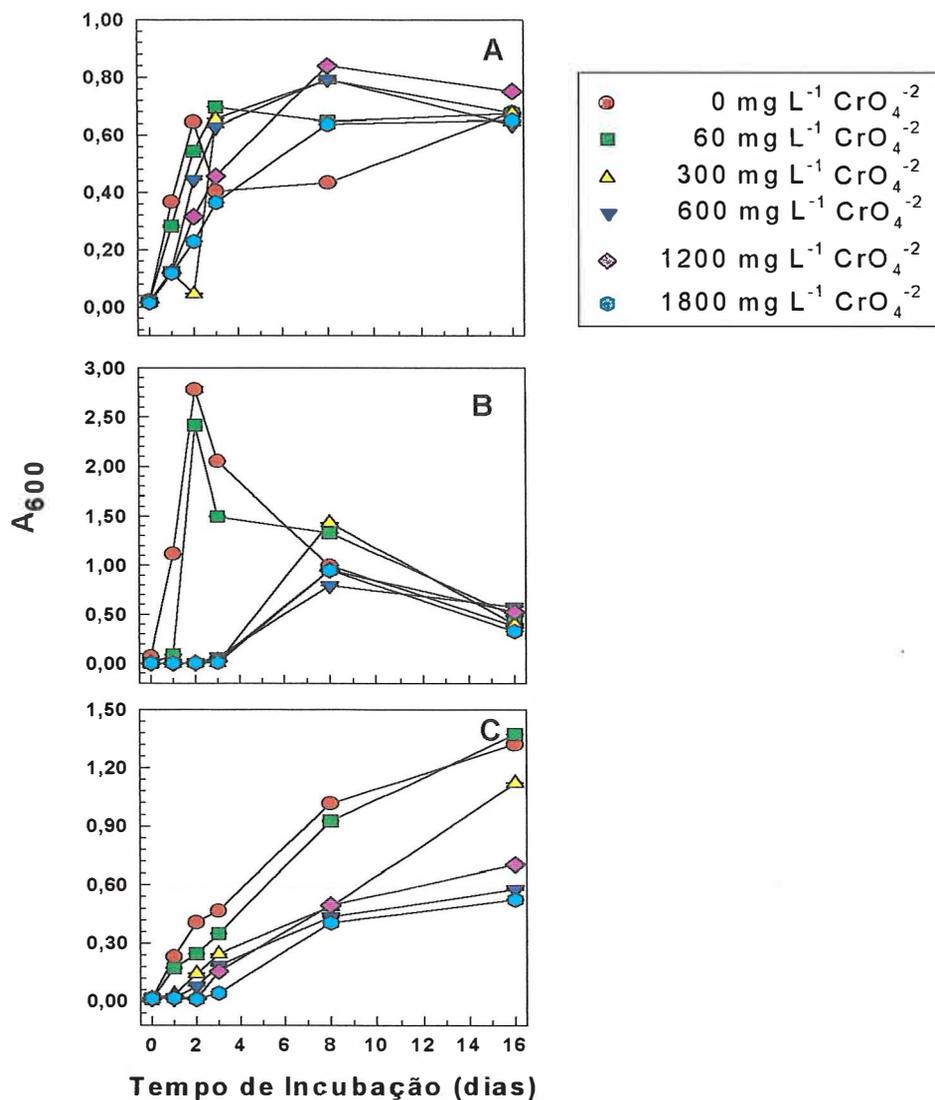


Figura 2 - Crescimento dos isolados bacterianos em meios cultivo contendo diferentes concentrações de CrO₄⁻². Os dados são médias de 3 repetições ± desvio padrão da média. A= Isolado 8, B = isolado 14, e C = isolado 21

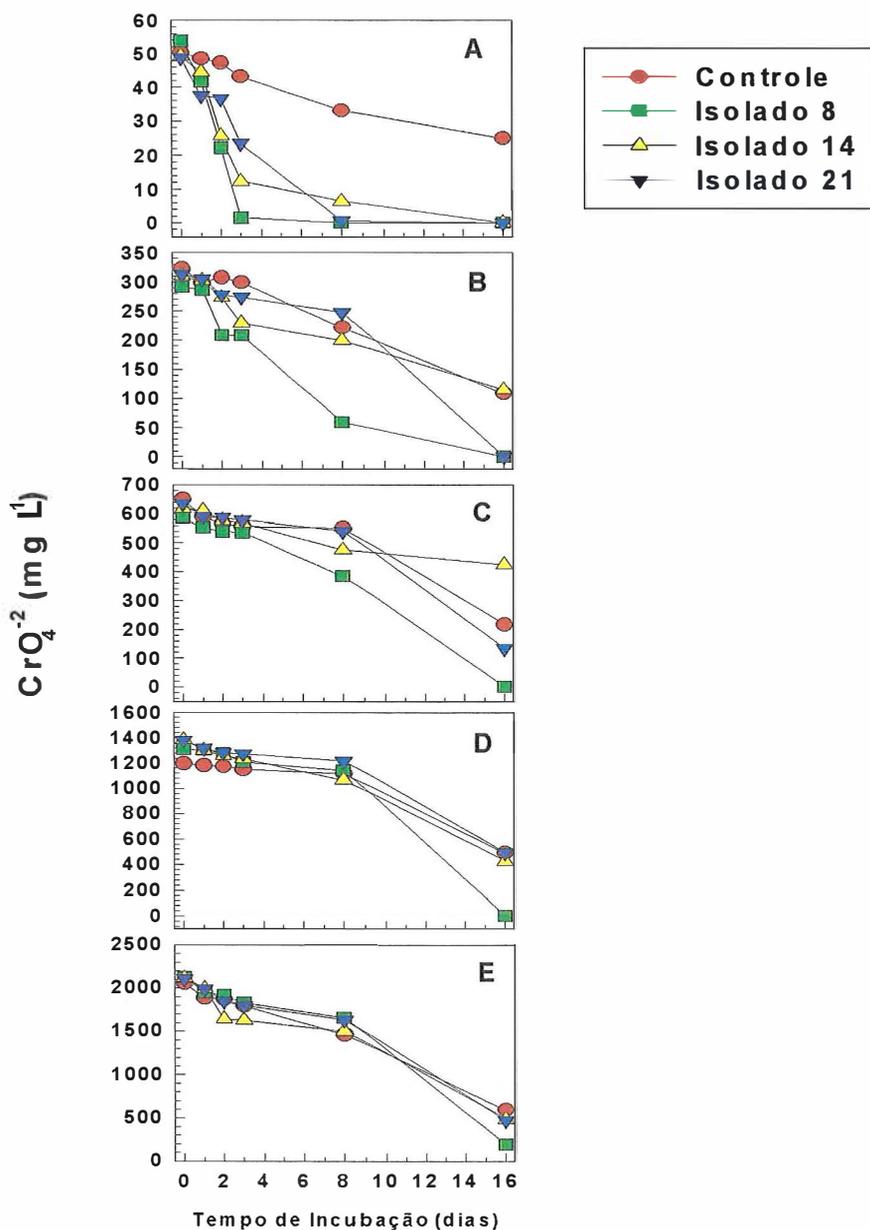


Figura 3 - Concentração de CrO_4^{2-} em meio de cultivo não-inoculado ou inoculado com os isolados 8, 14 e 21 em função do tempo de incubação. Concentrações iniciais de cromato foram: 60(A), 300(B), 600(C), 1200 (D) e 1800(E) mg L^{-1} de CrO_4^{2-} . Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão da média.

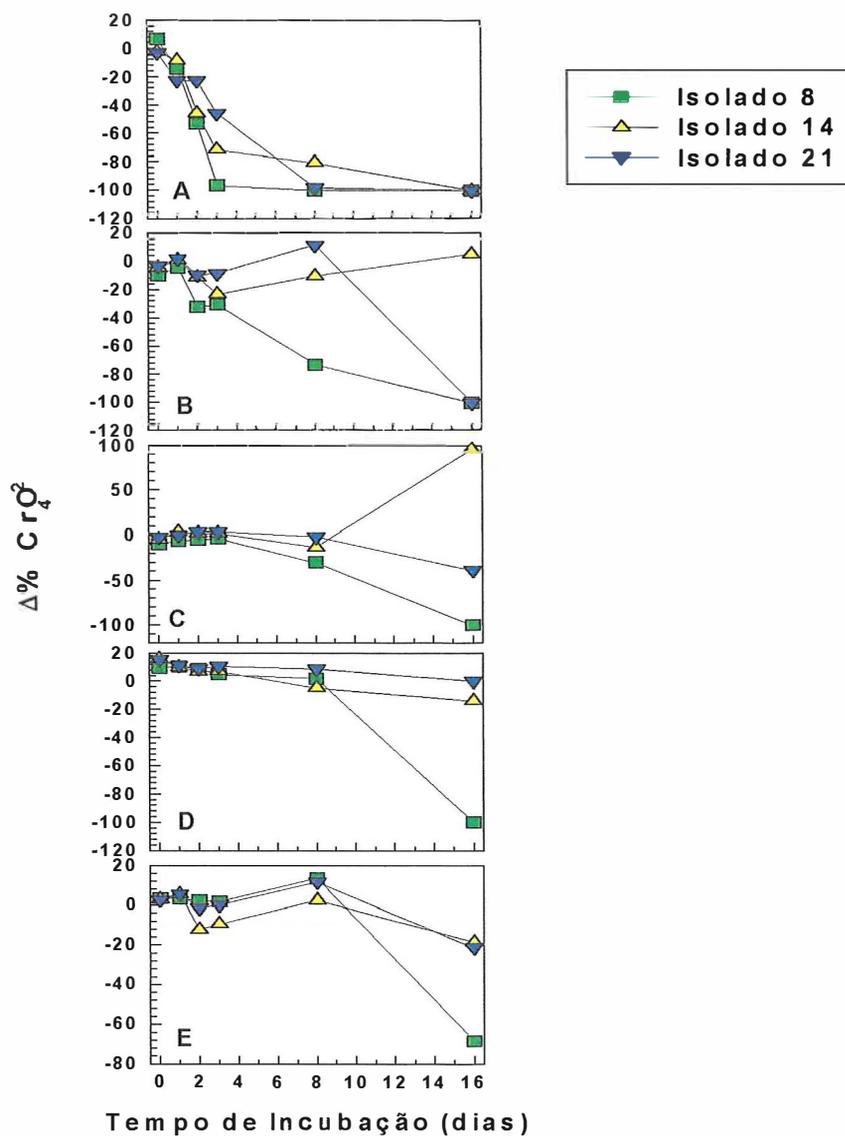


Figura 4 - Variação percentual da concentração de CrO_4^{2-} em meio de cultivo inoculado com os isolados 8, 14 e 21 em função do tempo de incubação. Concentrações iniciais de cromato foram: 60(A), 300(B), 600(C), 1200 (D) e 1800(E) mg L^{-1} de CrO_4^{2-} . Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão da média.

5 CONCLUSÕES

- Foram purificados e caracterizados morfológica e bioquimicamente 21 isolados bacterianos de amostra de água do tanque aerado do sistema de tratamento de efluentes de um curtume.
- O isolado 8 pertence provavelmente ao gênero *Acinetobacter*, cresce em meio com 1.800 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} e é altamente eficiente em remover cromato do meio de cultivo com até 1.800 mg L^{-1} .
- O isolado 14 pertence provavelmente ao gênero *Pseudomonas*, não cresce em meio de cultivo com 60 mg L^{-1} de CrO_4^{-2} e remove cromato do meio de cultivo com até 60 mg L^{-1} .
- O isolado 21 pertence provavelmente ao gênero *Listeria*, cresce em meio de cultivo com até 1.200 mg L^{-1} e remove cromato de meio de cultivo com até 300 mg L^{-1} eficientemente.

ANEXO A: MEIOS DE CULTIVO

A1. TRIPTONA-DEXTROSE-EXTRATO CARNE-AGAR-TGE

Difco 0002-01-07

Formulação:

Extrato de carne	3 g
Triptona	5 g
Dextrose	1 g
Agar	15 g
Água destilada.....	1 l

pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C .

A2. AGAR DEXTROSE-BATATA -BDA

Difco 0013-01-04

Formulação:

Infusão de batatas.....	200 g
Dextrose.....	20 g
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1 l

pH final $5,6 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C . Adicionar 1,0 ml de ácido tartárico em solução a 100 g L^{-1} esterilizada separadamente em autoclave para cada 100 mL do meio de cultivo.

A3. LEVINE EOSINA AZUL DE METILENO AGAR -EMB

Difco 0005-01-04

Formulação:

Lactose.....	10 g
Peptona	5 g
Fosfato de potássio.....	2 g
Agar	15 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno.....	0,065 g
Água destilada.....	1 L

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

A4. AGAR PARA ISOLAMENTO DE PSEUDOMONAS-AIP

Difco 0927-01-09

Formulação:

Peptona	20 g
Cloreto de magnésio.....	1,4 g
Sulfato de potássio.....	10 g
Irgarsan®	0,025 g
Agar	13,6 g
Água destilada.....	1 l

pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes citados acima em 980 ml de água destilada, adicionar 20 mL de glicerol. Aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

A5. VOGGEL-BONNER -VB

Bopp et al. (1983).

Formulação:**Concentrado VB:**

Fosfato de potássio dibásico.....	500 g
Na (NH ₄) HPO ₄ . 4H ₂ O.....	175 g
Ácido cítrico.....	100 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	10 g
Água destilada.....	1 L

Solução de glicose:

D-glicose.....	25 g
Água destilada.....	100 mL

Meio VB:

Concentrado VB	10 mL
Solução de glicose	10 mL
*Agar	15 g
Água destilada.....	480 mL

* Opcional

Preparar separadamente os soluções diluindo em água destilada e esterilizando em autoclave. Para o preparo do meio VB, utilizar 10 ml do concentrado VB esterilizado em autoclave, 10 ml da solução de glicose e água destilada. Homogeneizar e distribuir em frascos ou tubos esterilizados.

A6. CALDO LURIA-CL

Bopp et al. (1983)

Formulação:

Extrato de levedura.....	2,5 g
Triptona.....	5 g
NaCl.....	2,5 g
Glicose.....	0,5 g
* Agar	15 g
Água destilada.....	1 L

* Opcional

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C .

A7. CALDO NUTRITIVO-CN

Difco 0003-01-06

Formulação:

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl.....	8 g
Água destilada.....	1 l

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C .

A8. AGAR NUTRITIVO-AN

Difco 0001-01-08

Formulação:

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl.....	8 g
Agar	15 g
Água destilada.....	1 l

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C .

A9. CALDO NUTRITIVO MANUTENÇÃO-CNM**Formulação:****Meio basal:**

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl.....	8 g
Agar	20 g
Água destilada.....	1 L

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C **Solução de cromato:**

K_2CrO_4	10 g
Água destilada	100 mL

Para o meio basal, diluir os ingredientes em água, homogeneizar completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C . Para a solução de cromato, secar o K_2CrO_4 em estufa a 110°C por 2 horas, manter em dessecador até esfriar, pesar a quantidade indicada, diluir em água destilada e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C . Para obter 1 L do meio de manutenção, acrescentar ao meio basal, 1,0 mL da solução de cromato. Concentração final obtida: 40 mg L^{-1} de cromato ou 100 mg L^{-1} de cromato de potássio.

A10. AGAR NUTRITIVO MANUTENÇÃO-ANM

Difco 0003-01-06

Formulação:**Meio basal:**

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl.....	8 g
Agar	20 g
Água destilada.....	1 L

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C **Solução de cromato:**

K_2CrO_4	10 g
Água destilada	100 mL

Para o meio basal, diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C . Para a solução de cromato, secar o K_2CrO_4 em estufa a 110°C por 2 horas, manter em dessecador até esfriar, pesar a quantidade indicada, diluir em água destilada e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C . Para obter 1 L do meio de manutenção, acrescentar ao meio basal, 1 mL da solução de cromato. Concentração final obtida: 40 mg L^{-1} de cromato ou 100 mg L^{-1} de cromato de potássio.

A11. MEIO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO - AC

Bergey's Manual (1984)

Formulação:

Glicose	100 g
Extrato de Levedura.....	10 g
CaCO ₃	20 g
Agar	15 g
Água destilada.....	1 l

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir todos os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

A12. AGAR MOTILIDADE-AM**Formulação:**

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl.....	8 g
Agar	1 g
Água destilada.....	1 l

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

A13. MEIO BASAL OXIDAÇÃO/FERMENTAÇÃO-OF

Difco 0688-01-08

Formulação:

Triptona.....	2 g
Fosfato de potássio	0,3 g
NaCl.....	5 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Glicose a 10%	10 ml
Água destilada.....	1 l

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Adicionar 10 ml de glicose em solução a 10% esterilizada em filtro Millipore de 0,22 µm de porosidade.

A14. MEIO MR-VP

Difco 0016-01-1

Formulação:

Peptona tamponada.....	7 g
Fosfato de potássio dibásico.....	5 g
Dextrose.....	5 g
Água destilada.....	1 l

pH final $6,9 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir todos os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Para o teste Voger-Proskauer distribuir 5,0 ml do meio em tubos de ensaio e semear com a amostra pura. Adicionar 5,0 mL de uma solução aquosa a 100 g L^{-1} de KOH (peso/volume) e 1,0 mL de 3,0 mL de solução alcoólica de alfa Naftol 50 g L^{-1} (peso/volume de álcool etílico 95%).

A15. AGAR BASE VERMELHO DE FENOL-VF

Difco 0092-01-8

Formulação:

Proteose peptona n° 3.....	10 g
Extrato de carne.....	1 g
NaCl.....	5 g
Vermelho de fenol	0,018 g
Solução esterilizada a 100 g L ⁻¹ da fonte de carbono.....	10 mL
Agar	15 g
Água destilada.....	1 L

pH final 7,4 ± 0,2 a 25°C

Diluir os ingredientes, com exceção da fonte de carbono em água, aquecer para dissolver completamente, distribuir 5 mL do meio em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Preparar as soluções aquosas a 100 g L⁻¹, esterilizar separadamente por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm de porosidade. Acrescentar asepticamente 50 µL da solução da fonte de carbono esterilizada.

A16. URÉIA AGAR BASE - UAB

Difco 0283-34-8

Formulação:Meio Base

Peptona	1 g
Dextrose.....	1 g
NaCl	5 g
Fosfato de potássio monobásico.....	2 g
Ureia	20 g
Vermelho de fenol	0,012 g
Água destilada	100 mL

pH final $6,8 \pm 0,1$ a 25°C

Diluir todos os ingredientes em água, homogeneizar bem e esterilizar por filtração membrana de $0,22 \mu\text{m}$. NÃO AUTOCLAVAR.

Agar

Agar	15 g
Água destilada	900 mL

Dissolver todos os ingredientes em água por aquecimento e esterilizar em autoclave por 15 min a 121°C . Resfriar a 50°C e adicionar 100 mL do meio base. Misturar bem e distribuir em tubos estéreis. Fazer tubos inclinados.

A17. CALDO NITRATO - N

Difco 0268-01-6

Formulação:**Meio**

Extrato de carne.....	3 g
Peptona	5 g
Nitrato de potássio.....	1 g
Água destilada	1 L

pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C **Solução 1**

Ácido sulfanílico	8 g
Ácido acético 5N.....	1 L

Solução 2

Alfa naftilamina	5 g
Ácido acético 5 N	1 L

Para o meio, diluir todos os ingredientes em água, homogeneizar bem, dispensar 5,0 mL do meio em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C . Para as soluções 1 e 2 dissolver o ácido sulfanílico e o alfa naftilamina no ácido acético separadamente e armazenar em frasco âmbar.

A18. CALDO TRIPTONA-CT

Difco 0123-01-1

Formulação:**Meio basal:**

Triptona.....	10 g
Água destilada.....	1 L

Reagente de Kovacs:

Difco BTR 004

p-dimetilaminobenzaldeído.....	3 g
álcool butírico ou amílico	75 mL
HCl concentrado	25 mL

Meio basal: Diluir a triptona na água destilada, dispensar 5 mL do meio em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Reagente de Kovacs: Dissolver o aldeído em álcool a 50-55°C, resfrie e adicione o ácido. Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração.

A19. AGAR CITRATO SIMMONS - ACS

Difco 0091-01-9

Formulação:

Sulfato de magnésio.....	0,2 g
Fosfato diidrogênio fosfato.....	1 g
Fosfato de potássio dibásico.....	1 g
Citrato de sódio	2 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Agar	15 g
Água destilada	1 L

pH final $6,8 \pm 0,1$ a 25°C

Diluir todos os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente. Distribuir em tubos de ensaio esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C e preparar os tubos inclinados.

A20. AGAR PEPTONA FERRO - APF

Difco 0089-17-5

Formulação:

Peptona.....	15 g
Proteose peptona.....	5 g
Citrato férrico amoniacal.....	0,5 g
Glicerofosfato de sódio	1 g
Tiosulfato de sódio	0,08 g
Agar	15 g
Água destilada	1 L

pH final $6,7 \pm 0,1$ a 25°C

Diluir todos os ingredientes em água, aquecer para dissolver completamente. Distribuir em tubos de ensaio esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C .

A21. NUTRIENTE GELATINA-NG

Difco 0011-01-06

Formulação:

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agar	15 g
Água destilada.....	1 l

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Diluir os ingredientes em água, aquecer a 50°C para dissolver completamente e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Manter o meio à temperatura ambiente.

A22. CALDO NITRITO -CNI

Difco 0268-01-6

Formulação:**Meio**

Extrato de carne.....	3 g
Peptona	5 g
Nitrito de sódio.....	1 g
Água destilada	1 L

pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Para o meio, diluir todos os ingredientes em água, homogeneizar bem, dispensar 5,0 mL do meio em tubos de ensaio, colocar um tubo de Durhan (fermentação) invertido e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

A23. MEIO BASAL DE MOELLER DECARBOXILASE -MBMD

Difco 0890-02-1

Formulação:Meio

Extrato de carne.....	5 g
Peptona	5 g
Dextrose	0,5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Vermelho de cresol	0,005 g
Piridoxal	0,005 g
Amino ácido (L-lisina, L-arginina ou L-ornitina) ...	10 g
Água destilada	1 L

pH final $6,0 \pm 0,2$ a 25°C

Para o meio, diluir todos os ingredientes em água, aquecer para dissolver os ingredientes completamente. Adicionar 10 g do aminoácido em estudo. Homogeneizar bem, dispensar 5,0 mL do meio em tubos de ensaio com tampa rosqueável e esterilizar em autoclave por 10 minutos a 121°C . Se corrigir o pH utilizar NaOH.

ANEXO B: CHAVE DICOTÔMICA

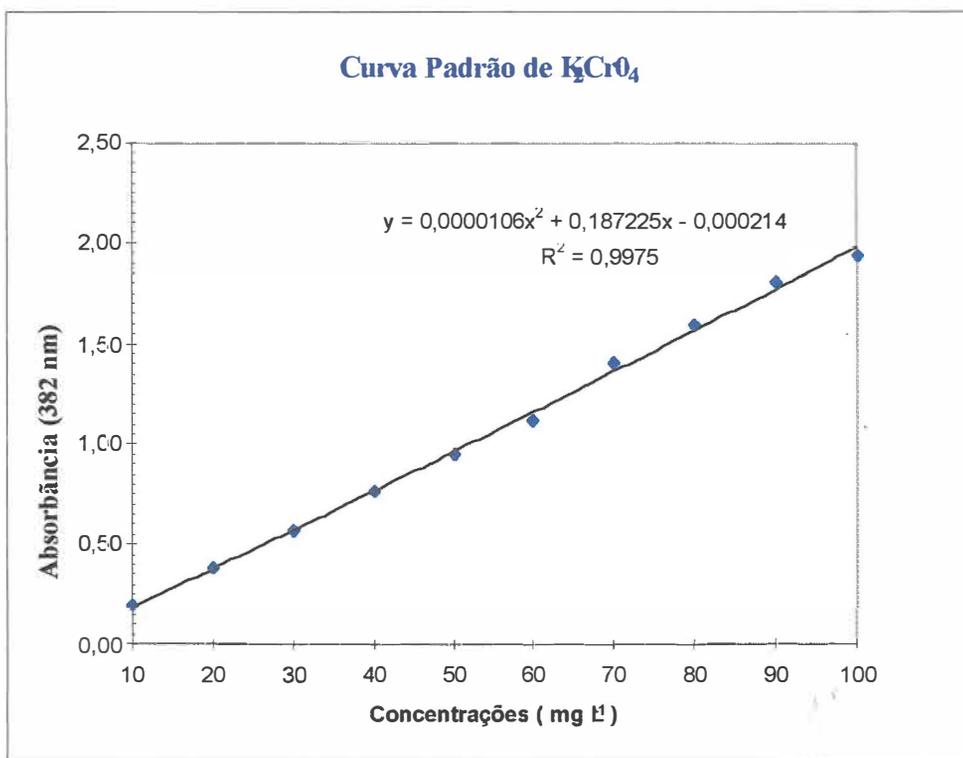
CHAVE DICOTÔMICA

- 1) Bastonete em forma de pera.....2
 Não como acima.....3
- 2) Motilidade positiva*Blastobacter*
 Não como acima*Pasteuria*
- 3) Célula possui bacterioclorofila ou pigmento carotenóide (vermelho, marrom ou
 púrpura)*Rhodopseumonas, Chromatium e Thiosarcina*
 Não como acima.....4
- 4) Reação de Gram positiva5
 Não como acima.....14
- 5) Aeróbia ou microaerófila 6
 Não como acima*Desulfotomaculum e Clostridium*
- 6) Capaz de formar endosporos7
 Não como acima 8
- 7) Reação de catalase positiva*Bacillus*
 Não como acima.....*Sporolactobacillus*
- 8) Célula bifurca..... 9
 Não como acima.....10
- 9) Presença de micélio*Bacterionema, Franchia, Mycobacterium e Actinomyces*
 Não como acima*Sporothrya*
- 10) Motilidade positiva.....11
 Não como acima*Mycobacterium, Arthrobacterium, Cellulomonas,*
Erisipelothrix, Lactobacillus, Microbacterium.
- 11) Isolado como patógeno de plantas.....12
 Não como acima13

- 12) Cor da colônia amarela ou rosa *Corynebacterium*
 Não como acima *Erwinia*
- 13) Produz ácido de carboidratos, oxidando e fermentando glicose. Reação de indol e urease negativas, gelatina não liquefeita e catalase positiva *Listeria*
 Não como acima *Kurthia*
- 14) Crescimento em meio de cultivo contendo extrato de carne como: AN (Agar Nutritivo) e TGEA (Triptona-Glucose-Extrato de carne-Agar)..... 19
 Não como acima 15
- 15) Oxida amônia para nitrito *Nitrossomonas*
 Não como acima 16
- 16) Cor da colônia amarela a vermelha..... *Nitrosolobus*
 Não como acima 17
- 17) Oxida nitrito a nitrato..... *Nitrobacter*
 Não como acima..... 18
- 18) Oxida ferro ferroso e enxofre inorgânico *Thiobacillus*
- 19) Célula pleomórfica *Calymmatobacterium, Wolbachia e Thermus*
 Não como acima..... 20
- 20) Isolado de nódulos de plantas *Rhizobium*
 Não como acima..... 21
- 21) Célula não forma esporos e cresce em meio de cultivo contendo glicose, sacarose ou manitol..... 27
 Não como acima 22
- 22) Utiliza e oxida acetato como fonte de carbono 23
 Não como acima *Methylomonas*
- 23) Célula em forma de pena *Zymomonas*
 Não como acima 24
- 24) Produz pigmentos cor púrpura *Chromobacterium*
 Produz pigmentos vermelhos *Serratia*
 Não como acima 25
- 25) Cresce em presença de 100 mg L⁻¹ de NaCl *Halobacterium*
 Não como acima 26

- 26) Reação de oxidase positiva e metabolismo oxidativo*Pseudomonas*
 Não como acima*Acinetobacter*
- 27) Célula em forma de bastonete com extremidade arredondada28
 Não como acima29
- 28) Cresce em meio de cultivo com pH 4,0 e pH 8,0 e reação de catalase positiva
 *Beijerinckia*
 Não como acima*Derxia*
- 29) Célula ovóide grande e produz cistos.....*Azotobacter*
 Célula ovóide que não produz cistos*Azomonas*

ANEXO C: CURVA PADRÃO DE K_2CrO_4



Anexo C1 - Curva padrão de K_2CrO_4 .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENDER, J. ; LEE, R. F.; PHILLIPS, P. Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 113-118, 1995.

BERGEY'S. **Manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974. 967p.

BHIDE, J. V.; DHAKEPHALKAR, P. K.; PAKNIKAR, K. M. Microbiological process for the removal of Cr (VI) de chromate-bearing cooling tower effluent. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 6, p. 667-672, jun. 1996.

BOPP, L.H. & EHRLICH, H. L. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. **Archives in Microbiology**, v. 150, p. 426-431, 1988.

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

- CAMPOS, J.; MARTINEZ-PACHECO, M.; CERVANTES, C. Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp strain. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 203-208., 1995.
- CERVANTES, C.; OHTAKE, H.; CHU, L.; MISRA, T.K.; SILVER, R. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid PUM505. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 287-291, jan. 1990.
- CIFUENTES, F.R.; LINDERMANN, W.C; BARTON, L.L. Chromium sorption and reduction in soil with implication to bioremediation. **Soil Science**, v. 161, n.4, p. 232-241, apr. 1996.
- CHANG, J. -S. & HONG, J. Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU 21 (Rip64). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 999-1006, 1994.
- COOKE, V. M.; HUGUES, M. N.; POOLE, R. K. Redution of chromate by bacteria isolated from cooling water of an eletricity generation station. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 323-328, 1995.
- DIFCO, **Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiology**. Michigan: Difco Laboratories, 1994. 1400 p.

- DeLEO, P. C.; EHRICH, H. L. Redution of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB 300 in bath and continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 756-759, ago. 1994.
- DVORAK, D. H.; HELDIN, R. S.; EDENBORN, H. M.; McINTIRE, P. E. Treatment of metal contaminated water using bacterial sulfate reduction: Results from pilot-scale reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 609-616, mai. 1992.
- FALLA, J. & BLOCK, J. C. Binding of Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2} by isolated envelops of *Pseudomonas fluorescens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, p. 347-352, 1993.
- FUDE, L.; HARRIS, B.; URRUTIA, M. M.; BEVERIDGE, T. J. Reduction of Cr (VI) by a sulfate-reducing bacteria (SRB III). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1525-1531, mai. 1994.
- GADD, G. M. & WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 353-359, ago. 1993.
- GARNHAN, G. W. & GREEN, M. Chromate (VI) uptake by and interactions with cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 247-251, 1995.
- GOPALAN, R. & VEERAMANI, H. Studies on microbial chromate redution by *Pseudomonas* sp in aerobic continuous suspended groth cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 471-476, 1994.

GUAN, L.; PETERSEN, J. N.; JONHSTONE, D. L.; YONGE, D. R.; BROUNS, T. M.
Sorption rates for the uptake of Cr⁺⁶ by a consortia of denitrifying bacteria.
Biotechnology Letters, v. 15, n. 7, p. 733-376, jul. 1993.

ISHIBASCHI, Y.; CERVANTES, C.; SILVER, S. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.7, p. 2268-2270, jul. 1990.

ISHIBASHI, Y.; CERVANTES, C.; SILVER, S. Chromium redution in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2268-2270, jul. 1990.

ITOH, M. ; NAKAMURA, M.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZANA, K. Mecanism of chromium (VI) toxixity in *Escherichia coli* : Is hydrogen peroxide essential in Cr (VI) toxicity? **Journal of Biochemistry**, v. 117, p. 780-786, 1995.

JOHNSTONE, D.L.; YONGE, D. R.; GUAN, L.; PETERSEN, J. N.; BROUNS, T. M.
Sorption reates for the uptake of Cr(VI) by a consortia of denitrifying bacteria.
Biothechnology Letters. v. 15, n. 7, p. 733-736, Jul.1993.

KOMORI, K.; RIVAS, A. TODA, K. OHTAKE, H. Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 951-954, jan. 1990(a).

- KOMORI, K.; TODA, K.; OHTAKE, H. Effects of oxygen stress on chromate reduction in *Enterobacter cloacae* strain H01. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, n. 1, p. 67-69, 1990(b).
- KONG, I. C.; HUBBARD, J. S.; JONES, W. J. Metal induced inhibition of anaerobic metabolism of volatile fatty acids and hydrogen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 396-402, abr. 1994.
- KONG, S.; YONGE, D. R.; JONHSTONE, D. L.; PETERSEN, J.N.; BROUNS, T. M. Chromium distribution in subcellular componets between fresh and starved subsurface bacterial consortium. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 6, p. 521-524, jun. 1992.
- LANGARD, S. Chromium. In: WALDRON, H. A.(ed.) **Metals in the environment**. New York: Academic Press, 1980. cap.4, p.111-129.
- LLOVERA, S.; BONET, R. ; SIMON-PUJOL, M. D.; CONGREGADD, F. Chromate redution by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-5028. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 406-410, fev. 1991.
- LOSI, M. E.; AMRHEIN, C. ; FRANKENBERGER, W. T. Jr. Bioremediation of chromate groundwater by reduction and precipitation in surface soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 23, p. 1141-1150, nov-dez. 1994.
- LOVLEY, D. R. Dissimilatory Fe (III) e MN (IV) redution. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 259-287, jun. 1991.

- LOVLEY, D. R. Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. **Advances in Agronomy**, v. 54, p. 175-231, 1994.
- LOVLEY, D. R. & PHILLIPS, E. J. P. Reduction of Uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 850-856, mar. 1992(a).
- LOVLEY, D. R. & PHILLIPS, E. J. P. Bioremediation of Uranium contamination with enzymatic uranium reduction. **Environmental Sciences and Technology**, v. 26, n. 11, p. 2228-2234, 1992(b).
- LOVLEY, D. R. & PHILLIPS, E. J. P. Novel model of microbial energy metabolism: organics oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1472-1480, jun. 1988.
- LOVLEY, D. R. & PHILLIPS, E. J. P. Novel processes for anaerobic sulfate production from sulfur by sulfate-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2394-2399, jul. 1994(a).
- LOVLEY, D. R. & PHILLIPS, E. J. P. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 726-728, fev. 1994.
- MARQUÉS, A. M.; BONET, R.; PUJOL, M. D.; FUSTÉ, M. C.; CONGREGADO, F. Removal of uranium by a exopolysaccharide from *Pseudomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 429-431, 1990.

- MATTUSCHKA, B. & STRAUBE, G. Biosorption of metals by a waste biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 58, p. 57-63, 1993.
- McGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M.; GILLER, K. E. Long-term effects of metals in sawage sludge on soils, microorganisms and plants. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 94-104, 1995.
- MULLEN, M. D., WOLF, D. C.; FERRIS, F. G., BEVERIDGE, T. J.; FLEMMING, C. A.; BAILEY, G. W. Bacterial sorption of heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3143-3149, dez. 1989.
- NAKAJIMA, A. & SAKAGUCHI, T. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 59-64, 1986.
- OHTAKE, H.; CERVANTES, S. C.; SILVER, S. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 8, p. 3853-3856, ago. 1987.
- PONS, M. P.; FUSTÉ, M. C. Uranium uptake by immobilized cells of *Pseudomonas* strain EPS 5028. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 661-665, 1993.
- RON, E. Z.; MINZ, D.; FINKELSTEIN, N. P.; ROSENBERG, E. Interactions of bacteria with cadmium. **Biodegradation**, v. 3, p. 161-170, 1992.

TURICK, C.E.; APEL, W.A. ; CARMOL, N.S. Isolation of hexavalent chromium-reducing anaerobes from hexavalent-chromium contaminated and noncontaminated environments. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 44, p. 683-688, 1996.

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

SHEN, H. & WANG, Y. Simultaneous chromium reduction and phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 e *Pseudomonas putida* DMP-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2754-2758, jul. 1995.

SHI, X. & DALAL, N.S. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 277, p. 342-350, 1990.

STOPPEL, R. D. & SCHLEGEL, H. G. Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-percolated ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2276-2285, jun. 1995.

TURICK, C.E.; APEL, W. A.; CARMOL, N. S. Isolation of hexavalent chromium reducing anaerobes from hexavalent-chromium contaminated and noncontaminated environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 683-688, 1996.

WALSH, A. R. ; O'HALLORAN, J. Chromium speciation in tannery effluent – I. an assessment of the techniques and the role of organic Cr(III) complexes. **Water Resources**, v. 30, n.10, p. 2393-2400, Out. 1996.

WALSH, A. R. ; O'HALLORAN, J. Chromium speciation in tannery effluent – II. Speciation in the effluent and in a receiving estuary. **Water Resources**, v. 30, n.10, p. 2401-2412, Out. 1996.

WANG, Y. -T. & SHEN, H. Bacterial reduction of hexavalent chromium. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 159-163, 1995.

WATER Analysis Handbook. Colorado: Hach Company, 1997. p.560.

WILLIAMS, J. W. & SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 6, p. 530-537, dez. 1984.