

BIORREMEDIAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE ATRAVÉS DA *EXIGUOBACTERIUM ACETYLICUM* ISOLADA DA MACRÓFITA *HYDROCOTYLE*

DOI: <http://dx.doi.org/10.55449/congea.15.24.I-015>

Amanda Garcia da Cunha*, Luiza Beatriz Gamboa Araújo Morselli, Josiane Pinheiro Farias, Robson Andrezza, Simone Pieniz

*Universidade Federal de Pelotas (UFPel), amandagarciadc@gmail.com

RESUMO

O cromo (Cr) é um dos contaminantes de sistemas aquáticos mais comuns devido ao seu uso frequente em indústrias metalúrgicas, de galvanoplastia e curtumes. A biorremediação é um processo viável ambiental e economicamente, na qual organismos vivos são utilizados para reduzir ou remover contaminantes do ambiente. A rizorremediação é uma técnica de biorremediação, que, ao utilizar bactérias, se torna um dos mais ecológicos e eficientes métodos de descontaminação de solos e ambientes aquáticos. Contudo, o sucesso desta técnica depende que os microrganismos sejam resistentes e tolerantes à metais e apresentem eficácia em diferentes condições ambientais. Neste sentido, avaliou-se o potencial de remoção de cromo hexavalente pela bactéria *Exiguobacterium acetylicum*, presente na rizosfera da macrófita da espécie *Hydrocotyle ranunculoides* localizadas no arroio Santa Bárbara, na cidade de Pelotas-RS, capaz de bioissorver o metal cromo, bem como conhecer as condições ambientais ótimas para a eficiência da remediação. A espécie foi testada quanto à sua capacidade de crescimento e remoção em meio com Cr(VI). Os resultados indicam que o isolado demonstrou capacidade de adaptação diante das variáveis ambientais estudadas, apresentando excelente viabilidade e taxas de remoção do metal (~100%) em concentrações 10, 25 e 50 mg L⁻¹ de Cr(VI). Desta forma, a rizorremediação demonstrou ser uma técnica eficiente de remediação de ambientes aquáticos contaminados, bem como a espécie bacteriana estudada demonstra ser um micro-organismo com grande potencial para estudos posteriores, visando sua aplicação em processos de biorremediação.

PALAVRAS-CHAVE: Rizoremediação, Cr(VI), Bioissorção, Biorremoção.

INTRODUÇÃO

Os metais pesados podem ser persistentes no meio ambiente, devido à sua natureza não degradável, desencadeando em uma ameaça à flora e aos microrganismos, impactando a biocenose e afetando a integridade do ecossistema (ARYAL, 2024; PUSHKAR et al., 2021). Com o aumento da contaminação do meio ambiente por metais pesados, aumentam as chances de exposição humana e o consequente risco dos efeitos tóxicos dos mesmos (PUSHKAR et al., 2021). Um dos metais pesados mais comuns em meios aquáticos é o cromo, que pode estar em diferentes estados de oxidação: Cr(0), Cr(III) e Cr(VI), sendo o último, o mais prejudicial ao ser humano e ao meio ambiente por ser extremamente tóxico e altamente solúvel (CHEN et al., 2022).

A biorremoção é o processo no qual poluentes como metais, são degradados por materiais de origem biológica. Através da biorremediação é possível utilizar plantas e/ou microrganismos como bactérias e fungos para a redução ou remoção de contaminantes como cromo do ambiente. A fitorremediação de ambientes aquáticos é uma técnica de biorremediação sustentável que faz uso de plantas como macrófitas para o tratamento de águas contaminadas (ANSARI et al., 2020; DEMARCO et al., 2023b).

As macrófitas aquáticas possuem grande facilidade de adaptação e amplitude ecológica, fato que possibilita que uma mesma espécie seja capaz de colonizar diferentes tipos de ambientes. Diversas macrófitas aquáticas presentes no arroio Santa Bárbara foram identificadas em outros trabalhos, são elas: *Sagittaria montevidensis*, *Lemna valdiviana*, *Pistia stratiotes*, *Enydra anagallis*, *Hymenachne grumosa* e *Hydrocotyle ranunculoides* (DEMARCO, 2016; 2023a). A macrófita *Hydrocotyle ranunculoides* consegue remover naturalmente metais pesados como um biofiltro, além de ser tolerante ao cromo hexavalente (Cr(VI)) (DEMARCO et al., 2023a).

A rizosfera é a região ao redor das raízes, entre 1 e 3 mm, onde há interação entre planta, solo e microrganismos, sendo uma zona rica em nutrientes e compostos orgânicos liberados pelas raízes por meio de exsudação, secreção e rizodeposição. A comunidade microbiana da rizosfera pode variar de acordo com fatores ambientais, como tipo de solo, espécie de planta, estado nutricional, idade, estresse, entre outros. A atividade microbiana presente na rizosfera das plantas pode contribuir significativamente para a biorremediação de metais pesados em formas menos nocivas, pois liberam exsudados radiculares que estimulam o microbioma a agir como limpadores naturais (ARYAL, 2024). Diversas bactérias vêm sendo estudadas para a biorremediação de metais pesados, entretanto o seu sucesso é dependente de

diversos fatores, como temperatura, pH, concentrações do contaminante, resistência e tolerância das bactérias aos metais (ARYAL, 2024; DEMARCO et al., 2023a).

Considerando a importância da interação planta-micróbio na eficácia de iniciativas de limpeza ambiental, formando uma interação sinérgica na rizorremediação (ARYAL, 2024), objetivou-se isolar bactérias de forma natural, da macrófita *Hydrocotyle ranunculoides*, presente no arroio Santa Bárbara (Pelotas/RS). O corpo hídrico estudado se trata de um ambiente já contaminado por cromo, de acordo com pesquisas anteriores (DEMARCO et al., 2018; 2023a), com concentrações de $4,61 \text{ mg L}^{-1}$, indicando uma concentração muito acima do que a permitida pela legislação brasileira ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) (BRASIL, 2005), aumentando a probabilidade de sua tolerância à situações de estresse pela presença do metal. Desta forma, avaliou-se o potencial de remoção de cromo hexavalente pela bactéria *E. acetylicum*.

METODOLOGIA

A área de pesquisa deste estudo é o arroio Santa Bárbara, localizado no município de Pelotas, região sul do Rio Grande do Sul. Este é o principal responsável pelo escoamento hídrico da cidade e afluente para o canal São Gonçalo e deste, até a Lagoa dos Patos. Além disso, a bacia do arroio Santa Bárbara forma a barragem Santa Bárbara, sendo responsável pelo abastecimento hídrico de grande parte da população, chegando a fornecer em média 40 milhões de litros de água ao dia.

A coleta da macrófita aquática flutuante *H. ranunculoides*, pertencente à família *Araliaceae*, foi feita no arroio Santa Bárbara (Figuras 1 A e 1 B) na posição geográfica de $31^{\circ}45'18''$ de latitude sul e $52^{\circ}21'26''$ de longitude oeste, ficando às margens da Avenida Presidente João Goulart (Figura 2).



Figura 1: Macrófita *Hydrocotyle ranunculoides* no arroio Santa Bárbara no dia de coleta (A) e em laboratório após coleta (B). Fonte: Autores.

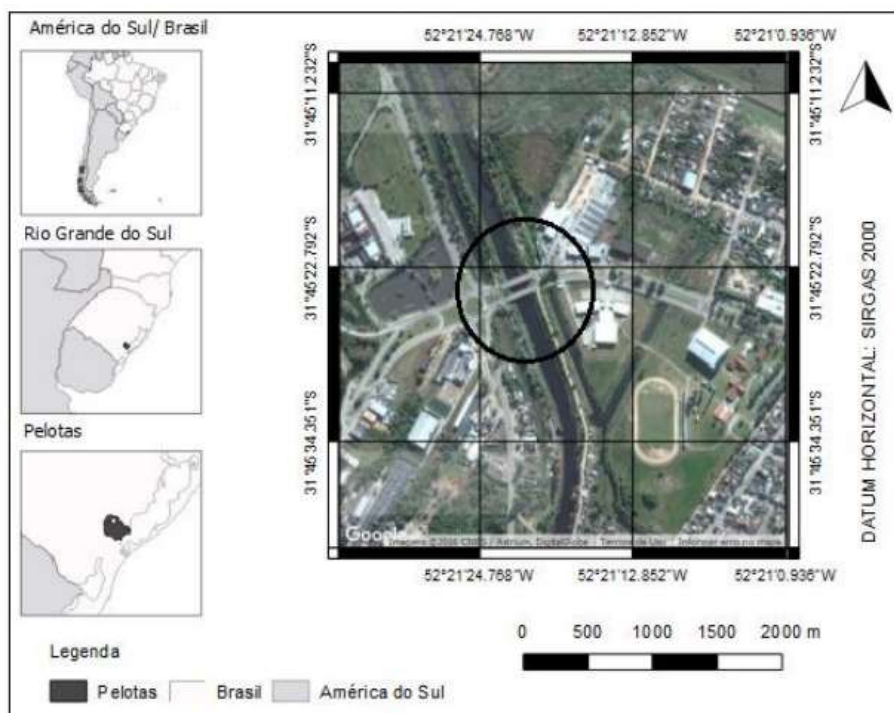


Figura 2: Localização do ponto de coleta no arroio Santa Bárbara, no município de Pelotas. Fonte: DEMARCO (2016).

A *E. acetylicum* foi isolada da macrófita *H. ranunculoides* e cultivada em placa Petri contendo meio de cultura ágar nutriente suplementado com Cr(VI) a 50 mg L⁻¹ e pH 7. Após incubação de 30°C por 24 h, a partir do inóculo inicial, foram retiradas alíquotas de 100 µL, depositadas em novos inóculos preparados em triplicata contendo meio líquido com caldo nutriente suplementado com Cr(VI) em diferentes concentrações: 10 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹. Após incubação, mensurou-se o crescimento de biomassa, medido pela DO600 nm em equipamento de espectrofotometria (UV-VIS). Para avaliar a capacidade de biorremediação, utilizou-se o método colorimétrico da difenilcarbazida, adaptado da norma brasileira NBR 13738 (ABNT, 1996).

A determinação de Cr(VI) total foi feita com a diluição de 10% das amostras com adição da solução de 1,5-difenilcarbazida e ajuste do pH a 1,0 ± 0,3, com solução de ácido sulfúrico 0,2 N. As amostras foram misturadas e aguardou-se cerca de 5-10 min para o completo desenvolvimento da cor. Por fim, mediu-se a absorbância sob o comprimento de onda de 540 nm espectrofotômetro UV-VIS.

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey, com níveis de significância maiores que 95% (p < 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições de cultivo utilizadas nesse estudo (pH 7,0, incubação em estufa a 30°C por 24h) mostraram-se satisfatórias e próximas de outras pesquisas com bactérias para remoção de Cr(VI) (CHEN et al., 2022; OKEKE, 2008). Verificou-se uma excelente capacidade de crescimento do isolado em um período de 24 h, não diferindo significativamente entre as três concentrações de cromo analisadas (Figura 3).

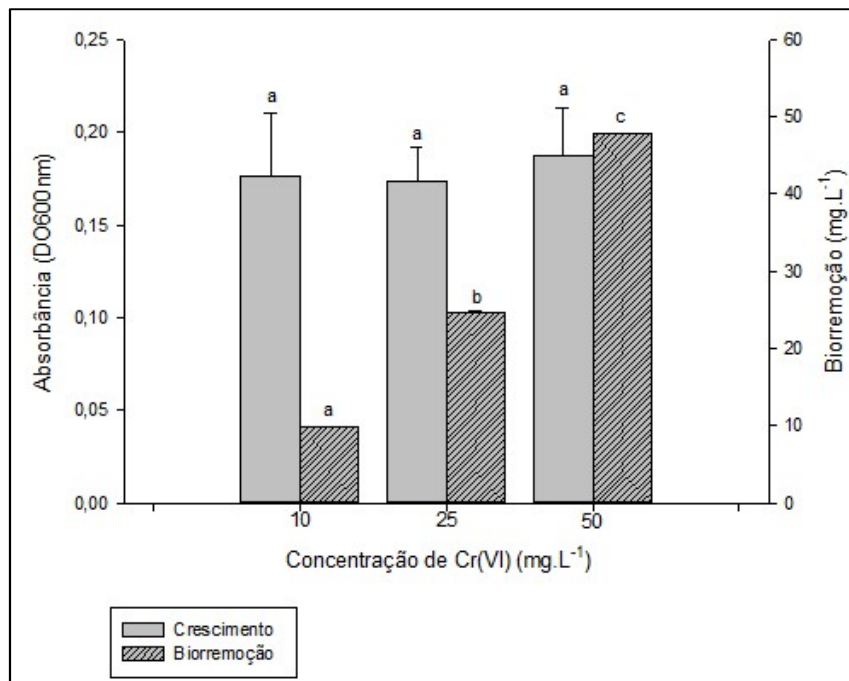


Figura 3: Absorbância (DO600nm) e biorremissão de Cr (VI) pelo isolado *E. acetylicum* em diferentes concentrações de Cr(VI). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente no nível de confiança de 95% (Teste de Tukey). Fonte: Autores.

O isolado apresentou ótimas taxas de remoção de Cr(VI): 98,3%, 98,9% e 95,4% nas concentrações de 10, 25 e 50 mg L⁻¹, respectivamente. Sendo assim, o isolado pode apresentar capacidade de crescimento em concentrações superiores às analisadas e, em um tempo mais longo de incubação, há a possibilidade de remoção total do metal, conforme indicam os resultados. Como foi o caso do estudo de Banguero *et al.* (2020), os quais utilizaram a *E. acetylicum* para reduzir Cr(VI) a uma concentração de 10 mg L⁻¹, obtendo uma redução de 60% da concentração nas primeiras 6 horas de crescimento, tendo atingido 100% da redução do metal em 11 h. Os autores ainda relataram que esse fenômeno está diretamente associado às fases de crescimento bacteriano, uma vez que na fase exponencial há um aumento de remoção do Cr(VI), assim como são os processos metabólicos geradores de crescimento populacional bacteriano.

A concentração com maior remoção no presente trabalho foi de 25 mg L⁻¹, diferindo do estudo de (OKEKE, 2008), o qual observou um crescimento substancial até a concentração de 75 mg L⁻¹ com bactérias do gênero *Exiguobacterium sp.* GS1 na remoção de Cr(VI) em meio aquoso. Okeke (2007) observou diminuições significativas de viabilidade a partir da concentração 100 mg L⁻¹, até a concentração de 200 mg L⁻¹.

Os resultados de remoção de cromo corroboram com o trabalho de Peral-Filho *et al.* (2014), os quais, visando conhecer a capacidade de biorremissão de Cr(VI) de uma cultura mista de microrganismos obtida a partir de resíduos de lodo de curtume, encontraram taxas de remoção acima de 96% para concentrações iniciais de 80, 120 e 150 mg L⁻¹.

Os resultados do presente estudo para remoção de Cr(VI) são próximos da total remoção de Cr(VI) obtida pela bactéria *Stenotrophomonas sp.*, também coletada de área contaminada, em condições de pH 7,0, razão de inoculação de 5% em 72 h de contato com concentração inicial de 50 mg L⁻¹ de cromo, na pesquisa de Chen *et al.* (2022).

Os resultados de OD600 nm não demonstraram variação significativa entre os tratamentos com diferentes concentrações de Cr(VI), o que sugere variação de densidade microbiana insignificante (Figura 2). O mesmo ocorreu na pesquisa de ZHANG *et al.*, (2023), ao utilizar a bactéria *Leersia hexandra* para remoção de 5, 10 e 20 mg L⁻¹ de Cr(VI), onde os resultados de análise de OD600 nm apresentaram variação insignificante em comparação a densidade microbiana inicial.

Em alguns estudos com uso de bactérias, houve redução do cromo hexavalente para o cromo trivalente, o qual pode ser quelado pelas plantas (ZHANG *et al.*, 2023) ou fixado nas células bacterianas (CHEN *et al.*, 2022), o que demonstra que a interação planta-bactéria é eficaz e pode ampliar biorremediação do metal.

CONCLUSÃO

A rizobactéria isolada *E. acetylicum*, em concentrações distintas (10, 25 e 50 mg L⁻¹) de cromo hexavalente, em pH 7,0 e temperatura de incubação de 30°C, apresentou ótimas condições de crescimento e alta taxa de remoção do metal (~100%). A aplicação desse gênero bacteriano em processos de biorremediação, apresenta-se como uma alternativa eficiente para descontaminação de meios aquáticos.

Considerando a presença de espécies com capacidade de remoção de Cr(VI) no arroio Santa Bárbara, pode-se dizer que o corpo hídrico já passa por processo de atenuação natural do contaminante. Ainda assim, é importante conhecer a técnica de biorremediação *in situ* mais adequada para cada local, levando em consideração diversos fatores como quantidade de contaminante, condições de crescimento de plantas e microrganismos, efeitos de pH e da temperatura.

Trabalhos futuros podem ser feitos *in situ* no arroio Santa Bárbara, com análise de remediação de cromo e outros contaminantes ou outras espécies de macrófitas ou bactérias, visando a gestão ambiental mais adequada, eficiente e econômica para o meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT. NBR13738. Água - Determinação de cromo hexavalente - Método colorimétrico da difenilcarbazida, 1996.
2. ANSARI, Abid Ali; NAEEM, M.; GILL, Sarvajeet Singh; ALZUAIBR, Fahad M. Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 371–376, 2020. DOI: 10.1016/j.ejar.2020.03.002.
3. ARYAL, Mahendra. Rhizomicrobiome dynamics: A promising path towards environmental contaminant mitigation through bioremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 112221, 2024. DOI: 10.1016/j.jece.2024.112221.
4. BANGUERO, R.S.L.; COLLAZOS, A.M.; LIZCANO-VALBUENA, W.H.; BENÍTEZ-CAMPO, N. Actividad electroquímica de la cepa bacteriana CrLIM26 acoplada a la reducción de Cr (VI). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, v. 36, n. 3, p. 555-565, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.20937/rica.53405>.
5. BRASIL (2005) Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional.
6. CHEN, Wenfang; LI, Wenbo; WANG, Tiankuo; WEN, Yujuan; SHI, Weiwei; ZHANG, Wenjing; GUO, Bing; YANG, Yuesuo. Isolation of functional bacterial strains from chromium-contaminated site and bioremediation potentials. *Journal of Environmental Management*, [S. l.], v. 307, n. October 2021, p. 114557, 2022. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.114557.
7. DEMARCO, C.F. Seleção de macrófitas aquáticas com potencial de fitorremediação no arroio Santa Bárbara, município de Pelotas/RS. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
8. DEMARCO, C.F.; AFONSO, T.F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M.S.; CAMARGO, F.A.O.; ANDREAZZA, R. In situ phytoremediation characterization of heavy metals promoted by *Hydrocotyle ranunculoides* at Santa Bárbara stream, an anthropogenic polluted site in southern of Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 28, p. 28312-28321, out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
9. DEMARCO, Carolina Faccio; BONEMANN, Daisa Hakbart; RIBEIRO, Anderson Schwingel; CADAVAL, Tito Roberto Sant Anna; GELESKY, Marcos Alexandre; GODINHO, Marcelo; QUADRO, Maurizio Silveira; PIENIZ, Simone; ANDREAZZA, Robson. Resistance mechanisms of *Hydrocotyle ranunculoides* to Cr(VI): A biofilter plant. *Journal of Cleaner Production*, [S. l.], v. 405, n. March, p. 136721, 2023. a. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.136721.
10. DEMARCO, Carolina Faccio; QUADRO, Maurizio Silveira; SELAU CARLOS, Filipe; PIENIZ, Simone; MORSELLI, Luiza Beatriz Gamboa Araújo; ANDREAZZA, Robson. Bioremediation of Aquatic Environments Contaminated with Heavy Metals: A Review of Mechanisms, Solutions and Perspectives. *Sustainability*, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 1411, 2023. b. DOI: 10.3390/su15021411.
11. OKEKE, Benedict C. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium sp.* GS1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, [S. l.], v. 35, n. 12, p. 1571–1579, 2008. DOI: 10.1007/s10295-008-0399-5.
12. PERAL-FILHO, P.P.; SILVA, N.R.; TERRA, N.M.; CARDOSO, V.L.; RESENDE, M.M. Biorremediação de diferentes concentrações iniciais de Cr (VI) com uso de cultura mista. In: XIX JORNADA EM ENGENHARIA QUÍMICA, 2014, Uberlândia. Anais eletrônicos [...]. Universidade Federal de Uberlândia, 2014. Disponível em: <http://www.peteq.feq.ufu.br/jorneq/anais2014/trabalhos/A74.pdf>.
13. PUSHKAR, Bhupendra; SEVAK, Pooja; PARAB, Sejal; NILKANTH, Nikita. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, [S. l.], v. 287, n. February, p. 112279, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112279.

14. ZHANG, Xuehong; ZHANG, Yuanyuan; ZHU, Dan; LIN, Zhiyi; SUN, Na; SU, Chang; LIN, Hua; ZHENG, Junjian. Chromium phytoextraction and physiological responses of the hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz to plant growth-promoting rhizobacterium inoculation. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2023. DOI: 10.1007/s11783-023-1609-0.