

# **Comunidade de microorganismos do solo: tolerância ao cromo em áreas com poluição industrial na baixada fluminense, Rio de Janeiro, RJ.**

**Jacqueline L. C. Xavier**

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia Ambiental, Univercidade

**Silvia G. Egler**

Orientadora, Bióloga, M. Sc.

**Andréa C. L. Rizzo**

Co-orientadora, Eng<sup>a</sup>. Química, M.Sc.

## **Resumo**

O cromo é um elemento essencial, porém também tóxico para o ser humano, ocorrendo nas formas oxidadas: cromo (0), cromo (III) e cromo (VI). O Cromo (III) é natural no meio ambiente e o cromo (VI) e cromo (0) são geralmente produzidos por processos industriais, principalmente, na fabricação de aços inoxidáveis e outras ligas metálicas. Em altas concentrações, os metais tóxicos afetam o crescimento, morfologia e metabolismo dos microorganismos, tornando-os o primeiro grupo afetado pela poluição. Este estudo avaliou a tolerância dos microorganismos extraídos de uma amostra de sedimento da Baía de Guanabara, a concentrações conhecidas de Cr (VI) e Cr(III) . Após extração em solução salina e isolamento em meio orgânico-TSA, cinco bastonetes e uma levedura foram inoculados em meio orgânico-TSA com concentrações de Cr(VI) e Cr(III) conhecidas. No meio com Cr(VI), uma cepa e a levedura apresentaram crescimento em 400 mg/kg e as demais entre 200 e 300 mg/kg. No meio com Cr(III), quatro cepas e a levedura apresentaram crescimento em 600 mg/kg.

## **1. Introdução**

Além das origens litogênicas, como resultado da intemperização do material de origem, a presença de metais tóxicos no solo tem como fonte diferentes atividades humanas: mineração, metalurgia, queima de combustíveis fósseis, disposição de resíduos sólidos ou líquidos, resíduos animais, fertilizantes agrícolas. Uma vez incorporados no solo, permanecem por períodos muito longos de tempo, podendo ser utilizada sua concentração total como indicador de poluição. Porém, sua biodisponibilidade depende de fatores como pH, matéria orgânica, capacidade de troca catiônica, espécie e origem (Dai et al., 2004).

O cromo é um elemento essencial, porém também tóxico para o ser humano. Este elemento químico se encontra naturalmente no solo, na poeira e gases de vulcões. No meio ambiente são três os números de oxidação do metal: cromo (0), cromo (III) e cromo (VI). O Cromo (III) tem ocorrência natural no meio ambiente, enquanto o cromo (VI) e cromo (0) são geralmente produzidos por processos industriais. O elemento químico cromo é empregado principalmente para fazer aços inoxidáveis e outras ligas metálicas. O cromo na forma trivalente Cr(III) tem sido considerado um elemento estável no solo. Entretanto, alguns estudos com amostras de solo

coletado e mantido com umidade natural indicam que o Cr(III) pode ser oxidado a Cr(VI) (Milacic & Stupar, 1995).

Os metais tóxicos, Zn, Cu, Ni, Co, Cd e Cr, em pequenas quantidades são necessários para o crescimento dos microrganismos, enquanto que Hg e Pb não apresentam funções biológicas. Quando em altas concentrações, os metais tóxicos afetam o crescimento, morfologia e metabolismo dos microrganismos, desnaturando suas proteínas ou destruindo a integridade de suas membranas celulares. Desta forma, os microrganismos são o primeiro grupo de organismos que são afetados pela poluição do solo. Os procarióticos, bactérias e actinomicetes, são mais sensíveis do que os eucarióticos, fungos, sendo as bactérias os organismos que apresentam maior sensibilidade à poluição do solo por metais tóxicos (Doelman et al., 1994). Como consequência da diminuição do tamanho e da diversidade da comunidade microbiana, algumas atividades como mineralização da matéria orgânica, nitrificação e decomposição da serapilheira ficam prejudicadas (Kelly et al., 2003). Porém, alguns mecanismos de aclimatação ou adaptação permitem que os microrganismos do solo aumentem sua tolerância a altas concentrações de metais. Entre eles estão mudanças: fenotípicas a nível individual, na estrutura da comunidade ou genotípicas, através do desenvolvimento de plasmídeos resistentes (Rusk et al., 2004). Dependendo de suas respostas, e dos processos de transformação que realizam (oxidação e redução nas formas inorgânicas, e conversão nas orgânicas), os microrganismos podem ser divididos em três grupos distintos: sensíveis, tolerantes e resistentes a metais tóxicos.

## **2. Objetivo**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a tolerância dos microrganismos extraídos de uma amostra de sedimento da Baía de Guanabara contaminada por metais tóxicos, a diferentes concentrações conhecidas de cromo Cr(VI) e Cr(III).

## **3. Material e Métodos**

Foram selecionados dois pontos, GN-020 e GN-040, monitorados pela FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente) na Baía de Guanabara para a realização das coletas. O critério para seleção dos pontos foi a contaminação de metais tóxicos obtida no relatório do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara (FEEMA, 1998).

As coletas foram realizadas em agosto de 2005, dos pontos coletados foi escolhido para este estudo o GN-020, situado próximo ao galpão da VARIG e REDUC, em área de remanso e muita sedimentação, com profundidade de 2 m. Para a coleta de sedimento de fundo foi utilizada draga Petersen. Foram coletados aproximadamente 5 Kg de amostra composta, manuseada com espátula de polietileno, acondicionadas em saco plástico resistente, lacradas e codificadas em campo. Após a coleta de material para medição de pH e umidade (EMBRAPA, 1997), foi armazenada em câmara fria a 4°C, de modo a evitar perdas de elementos voláteis e limitar atividades biológicas. Durante a coleta foram realizadas medições de condutividade, salinidade e temperatura com o equipamento Orion mod. 142 e transparência da água, com Disco de Secchi.

Cerca de 1000 gramas da amostra do sedimento GN-020 permaneceu resfriado in natura, o restante foi secado em estufa a 35°C por 13 dias para eliminação da umidade, desagregado em almofariz de porcelana, e homogeneizado por quarteamento. Posteriormente, peneirado em peneira de malha 1,70 mm (10 mesh), granulação indicada para extração de microorganismos e 75 µm (< 200 mesh), granulação indicada para análises da concentração de metais. Dados relacionados a estimativa de Cr no sedimento superficial da Baía de Guanabara em Junho de 1997 indicam 20 µg Cr/g em FEEMA (1998). Uma estimativa de matéria orgânica por perda ao fogo a 450°C, foi realizada pela COAM/CETEM. O ensaio granulométrico foi feito pelo método de pipetagem, de acordo com a norma descrita em EMBRAPA (1997).

Antes do início do processo de extração de microrganismos, foi elaborado um protocolo com os procedimentos empregados e meios utilizados. A extração foi realizada seguindo Ururahy (1998), utilizada para a quantificação de heterotróficos totais e posterior isolamento de microrganismos. Adiciona-se 5g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl 0,9%), após colocar por uma hora em agitador tipo Shaker à 25°C e 150 rpm. A partir da extração, foram feitas diluições seriadas fator 10, até 10<sup>-6</sup>. Em seguida, realizou-se o plaqueamento em placas de Petri com meio orgânico-TSA pela técnica de *Pour-plate*, adicionando 0,1 mL das diferentes diluições seriadas nas respectivas placas identificadas, e incubadas por 48 horas em estufa a 30°C. A contagem das unidades formadoras de colônia foi realizada em 48 horas, com auxílio de um contador de colônias, sendo os resultados expressos em UFC/g solo. Cada tipo de colônia, diferenciado pela forma e cor, foi isolada em placas de Petri com meio orgânico-TSA e incubadas por 48 horas em estufa a 30°C. Este procedimento foi repetido a cada 15 dias para a manutenção do potencial de crescimento das cepas isoladas. Para identificação, as cepas isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio orgânico – TSA inclinado e encaminhadas para a Sra. Marcia Lima Festivo do Laboratório de Enterobactérias, do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz. A identificação e classificação dos microrganismos realizadas no Laboratório de Enterobactérias foram através de análises morfo-tintoriais pela coloração de Gram.

Em cada tipo de colônia isolada nas placas de Petri foi realizado teste de tolerância ao Cr (VI), utilizando o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), e ao Cr (III), utilizando o cloreto de cromo hexahidratado (CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O). Ao meio orgânico-TSA foi adicionado 1 mL de solução com concentrações seqüenciais começando em 10, 25, 50, 75 e 100 mg/kg, seguindo a mesma seqüência de concentrações intermediárias por cada aumento de 100 mg/kg até 400 mg/kg com meios com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e 600 mg/kg com CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O.

#### **4. Resultados e Discussão**

Segundo a análise granulométrica (Tabela 1), o sedimento é arenoso, tendo a fração de areia fina mais representativa, e com pH alcalino.

Tabela 1. Características granulométricas e físico-químicas do sedimento coletado no ponto GN020 na Baía de Guanabara.

Parâmetro	Teor no solo
Areia fina	17,5%
Areia grossa	51,9%
Areia total	69,4%
Silte	30,2%
Argila	0,4%
pH	10
Umidade	26%
Matéria orgânica	22,35%

Os dados de condutividade, salinidade e temperatura da água (Tabela 2), apontam pequena variação entre a superfície e o fundo.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água, no ponto de coleta do sedimento na Baía de Guanabara, obtidos com o equipamento Orion mod. 142

Características	Superfície ( 0,10 m)	Fundo ( 2,0 m )
Salinidade	28,3	31,0
Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	43,8	47,7
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	24	23,2
Disco de Sechhi ( m)	0,10	

Das seis cepas identificadas, três são bastonetes positivos, um negativo e uma levedura (Tabela 3). O bastonete B05 não apresentou crescimento no quarto repique de manutenção em meio sólido, sendo repicado para meio líquido, na tentativa de recuperação do potencial de crescimento. Não houve resposta e a cepa não pode ser testada para tolerância ao Cr(III).

Tabela 3. Identificação dos microrganismos presentes no sedimento estudado da Baía de Guanabara.

Cepas	Coloração	Classificação	Classificação gram
B01	Amarela	Bastonete	+
B02	Rosa	Bastonete	+
B03	Branca leitosa	Levedura	-----
B05*	Vermelha	Bastonete	+
B06	Amarela	Bastonete	-
B07	Branca leitosa	Bastonete	+

\* Cepa perdida durante repique de manutenção.

A cepa B01 e a levedura B03 apresentaram crescimento na maior concentração testada de meio contendo Cr(VI) (Figura 1). As B02, B05 e B07 apresentaram crescimento abaixo de 300 mg/kg e a B06 até 200 mg/kg (Figura 1). A maior capacidade de tolerância observada em B01 e B03 pode estar relacionada com a capacidade que certos microrganismos tem em reduzir o Cr(VI) para Cr(III) de menor toxicidade ( Ross et. al., 1981).

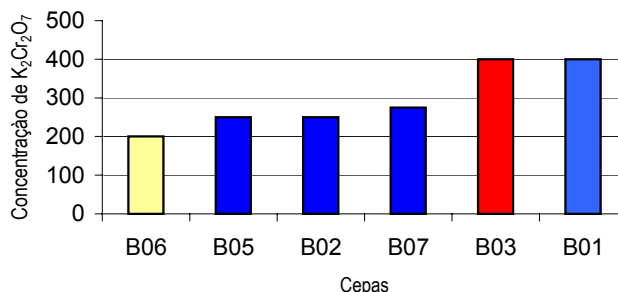


Figura 1 . Acompanhamento do crescimento dos microrganismos em meio contendo Cr(VI). Azul - bastonetes gram +, B01, B02, B05 e B07, Amarelo - gram -, B06 e Vermelho - levedura, B03.

Todas as cepas apresentaram crescimento na maior concentração testada no meio contendo Cr(III) (Figura 2). Porém, a B02 já apresentou diminuição no crescimento nesta concentração. Mais testes serão necessários para a identificação das concentrações toleradas, detectadas através da ausência de crescimento em placas com concentrações maiores do que 600 mg/kg.

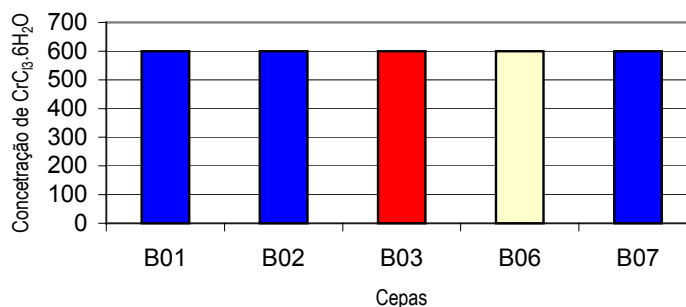


Figura 2 . Acompanhamento do crescimento dos microrganismos em meio contendo Cr<sup>+3</sup>. Azul - bastonetes gram +, B01, B02 e B07, Amarelo - gram -, B06 e Vermelho - levedura, B03.

O cromo, na forma trivalente, é requerido por um limitado grupo de microrganismos em alguns processos metabólicos específicos. As principais funções estão ligadas ao metabolismo da glicose e ativação enzimática (Mertz, 1969). Os efeitos tóxicos e mutagênicos dos cromatos hexavalentes em microrganismos foram constatados por Ross et al. (1981), observando que a suplementação de 10-12 mg de Cr(VI)/L foi inibitória para bactérias de solo em meio líquido, enquanto a mesma dose, na forma de Cr(III), não afetou o crescimento. Francisco et. al. (2002) e Camargo et. al. (2004), constaram que diversos grupos bacterianos, em especial bactérias gram positivas, apresentam maior tolerância ao Cr(VI) do que as gram negativas. Nos meios orgânico - TSA contendo Cr(VI) o bastonete gram negativo (B06) foi o que apresentou menor tolerância, e em mesma ou maior concentração de Cr(III) não teve seu crescimento afetado. Em processos de biorremediação, bactérias com habilidade de redução e tolerância ao cromo (VI) podem ser aplicadas a solos contaminados com este metal (Camargo et. al. , 2004).

## 5- Conclusão

Os resultados obtidos no testes de tolerância, realizados em meios com concentrações conhecidas de Cr(III) e Cr(VI), mostraram que a maioria das bactérias gram + e a levedura, extraídas de amostras de sedimento da Baía de Guanabara, apresentaram menor crescimento quando em presença do Cr(VI), em relação aos testes realizados com Cr(III). Este comportamento pode estar associado à capacidade de redução ou tolerância das cepas presentes, sugerindo uma potencial utilização em estudos de biorremediação.

## 6. Agradecimentos

Ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica do CETEM – PIBIC/CNPq pela bolsa concedida. À minha orientadora, Silvia Gonçalves Egler, pela eterna pré-disposição, paciência e ensinamentos, à co - orientadora Andréa Rizzo e a todos do Centro de Tecnologia Mineral - CETEM, pelo suporte dado para realização desse trabalho da JIC XIV.

## 7 . Referencias Bibliográfica

- DAI, J.; BECQUER, T.; ROUILLER, J.H.; REVERSAT, G.; BERNHARD-REVERSAT, F.; LAVELLE, P. Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn- Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils. **Appl.Soil Ecol.**, 25, p. 99-109, 2004.
- DOELMAN, P.; JANSEN, E.; MICHELS, M.; VAN TIL, M. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. **Biol.Fertil.Soils**, 17, p. 177-184,1994.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solo**, 2º ed.: EMBRAPA, 1997.
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE. **Qualidade de água da Baía de Guanabara 1990-1997** – Programa de Despoluição da Baía de Guanabara,. Rio de Janeiro, RJ: FEEMA, 1998.
- CAMARGO F.A.O.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; FRANKENBERGER, W.T.. Diversity of chromium – resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Appl.soil.ecology.**, 29, p.193-202, 2004.
- FRANCISCO, R.; ALPOLIM, M.C.; MORAIS, P.V.. Diversity of chromium-resistant and reducing bacteria in chromium contaminated activated sludge. **J. Appl. Microbiol.**, 25, p. 335-347, 2002.
- KELLY, J.J.; HÄGGBLUM, M.M.; TATE, R.L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. **Biol.Fertil.Soils**, 38, p. 65- 71, 2003.
- MERTZ, W.E. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiology Reviews**, Baltimore, 49, p. 163-239, 1969.
- MILACIC, R.; STUPAR, J. Fractionation and oxidation of chromium in tannery waste and sewage sludge-amended soils. **Environmental Science and Technology**, Easton, 29(2), p. 506-514, 1995.
- ROSS, D. S.; SJODREN R. E.; BARTLETT, R.J. Behavior of chromium in soils: IV. Toxicity to microorganisms. **Journal of Environmental Quality**, Madison, 10(2), p. 145-148, 1981.
- RUSK, J.A.; HAMON, R.E.; STEVENS, D.P.; MCLAUGHLIN, M.J. Adaptation of soil biological nitrification to heavy metals. **Environmental Science and Technology**, 38, p. 3092-3097, 2004.
- URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo**. Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 1998. 344 pp.