

CRESCIMENTO DO ISOLADO DE *Ensifer meliloti* LBMP-C02 EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO CRÔMIO HEXAVALENTE

Bianca Henrique Gabriel¹

Daiane Silva Bonaldi²

Alinec Laura Modesto Lima³

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos⁴

Luciana Maria Saran⁵

Química Ambiental

Resumo

O acúmulo de elementos potencialmente tóxicos (EPTs), como o crômio hexavalente, Cr(VI), no ambiente é considerado um problema grave na atualidade, pois alguns destes EPTs, mesmo em baixíssimas concentrações, são tóxicos para os seres vivos. Neste cenário, a bioacumulação, um processo no qual organismos vivos são empregados para remover EPTs do ambiente, pode ser usada para a remoção de Cr(VI) de efluentes industriais. Comparada a processos convencionais de tratamento, demanda menos energia, é ambientalmente mais amigável e mais econômica. Para tal finalidade, as rizobactérias se apresentam como opção promissora, pois possuem alta capacidade metabólica, se adaptam em diversos ambientes e produzem exopolissacarídeos (EPSs). Tendo em vista o exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a tolerância do isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02 ao Cr(VI) e obter as curvas de crescimento deste isolado em meio de cultivo contendo este EPT. Para tanto, foram determinadas a concentração mínima inibitória (CMI) do Cr(VI) para o isolado em questão e as curvas de crescimento bacteriano em meio de cultivo YMA modificado na presença e na ausência de Cr(VI). O isolado demonstrou comportamento semelhante ao controle na presença de 2,6; 5,2 e 10,4 mg Cr(VI) L⁻¹. A CMI do Cr(VI) foi 15,6 mg Cr(VI) L⁻¹. Estes resultados sinalizam que isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02 tem potencial para a bioacumulação de Cr(VI).

Palavras-chave: Elemento potencialmente tóxico; Metal pesado; Bioacumulação; Rizobactéria.

¹Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Departamento de Tecnologia, bianca.h.gabriel@unesp.br.

²Doutoranda em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Departamento de Tecnologia, daianesb.ufla@gmail.com.

³Graduanda em Engenharia Agrônoma, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Departamento de Tecnologia, alinec.laura@unesp.br.

⁴Prof^a. Titular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Departamento de Tecnologia, eliana.lemos@unesp.br.

⁵Prof^a. Dr^a., Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Departamento de Tecnologia, lm.saran@unesp.br.



INTRODUÇÃO

O aumento da concentração do crômio (Cr) no ambiente está associado principalmente ao despejo de efluentes de indústrias metalúrgicas, químicas e de refratários. O Cr lançado no ambiente, oriundo de atividades antrópicas, ocorre principalmente na forma hexavalente, Cr(VI) (TCHOUNWOU et al., 2012).

A remoção de EPTs, como o Cr(VI), de soluções aquosas, empregando-se organismos vivos (plantas, fungos e bactérias) é conhecida como bioacumulação. Este processo, comparado a processos convencionais comumente usados para a remoção de EPTs, mostra-se ambientalmente mais amigável e mais vantajoso do ponto de vista econômico (ABDOLALI et al., 2014). Há relatos na literatura da biossorção/bioacumulação de EPTs, dentre os quais Cr(VI) e Cr(III), por diversos microrganismos (ALAM; AHMAD, 2011; RAAMAN et al., 2012; XIE et al., 2013; MORETTO, 2014).

Dentro deste contexto, o emprego de rizobactérias se mostra uma alternativa interessante, pois não são patogênicas, não geram metabólitos secundários causadores de danos à saúde humana e a outros organismos, além de produzirem EPSs. Os EPSs promovem proteção natural às células, dificultando a ação tóxica de EPTs durante o processo de bioacumulação (MORETTO et al., 2014).

Considerando o exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a tolerância do isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02 ao Cr(VI) e determinar as suas curvas de crescimento celular em meio de cultivo acrescido de Cr(VI), visando à aplicação futura do isolado como bioacumulador de Cr(VI) em processos de biorremediação.

METODOLOGIA

O isolado empregado neste estudo pertence à ordem Rhizobiales, foi classificado em nível de espécie como *Ensifer meliloti* LBMP-C02 e pertence à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV – UNESP, campus de Jaboticabal. O crescimento do microrganismo foi realizado em meio de cultivo YMA modificado, composto de

MgSO₄·7H₂O 0,2 g L⁻¹, NaCl 0,1 g L⁻¹; extrato de levedura 0,4 g L⁻¹ e manitol 10,0 g L⁻¹, preparado pela dissolução destes reagentes em água deionizada, sendo o pH da solução resultante ajustado para 6,8. O meio de cultivo foi autoclavado a 121 °C e 1 atm, durante 20 min.

Para a determinação da CMI do Cr(VI) para o isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02, foi usada solução padrão estoque de K₂Cr₂O₇ 0,05 mol L⁻¹, como fonte de Cr(VI), autoclavada a 121 °C e 1 atm, durante 20 min. O isolado foi incubado em erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo líquido sem Cr(VI), à 30 °C e 150 rpm, por 48 h. Uma alíquota da cultura (10 µL) foi inoculada em placas de Petri contendo meio sólido enriquecido com as seguintes concentrações de Cr(VI): 2,6; 5,2; 10,4; 15,6; 20,8; 26,0; 31,2; 36,4; 83,2; 125; 260 e 520 mg Cr(VI) L⁻¹. Como controle foi usado meio de cultivo sem adição de Cr(VI). As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias até que o crescimento fosse observado. A CMI foi determinada como a menor concentração de Cr(VI) que inibiu completamente o crescimento do isolado bacteriano na placa de Petri.

Para a obtenção das curvas de crescimento celular, a bactéria foi inoculada em 100 mL de meio de cultivo líquido previamente enriquecido com 2,6; 5,2; 10,4; 15,6 e 20,8 mg Cr (VI) L⁻¹, a uma densidade ótica em 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1. Como controle foi utilizado meio líquido sem adição de Cr(VI). Todos os frascos foram incubados em shaker horizontal a 150 rpm e 30 °C. As amostras foram coletadas em intervalos de 24 h por um período de 96 h, submetidas a diluições seriadas e inoculadas em meio YMA sólido sem Cr(VI), pela técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas em BOD à 30 °C por 48 h e o crescimento foi determinado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para todos os ensaios foram realizadas três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado demonstrou comportamento semelhante ao controle na presença de 2,6; 5,2 e 10,4 mg Cr(VI) L⁻¹. Em meio de cultivo contendo 15,6 mg Cr(VI) L⁻¹ o crescimento do isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02 foi inibido, sinalizando que este microrganismo



é sensível à concentrações superiores a $10,4 \text{ mg Cr(VI) L}^{-1}$. Para este isolado, cultivado em meio YMA modificado, a CMI do Cr(VI) foi $15,6 \text{ mg Cr(VI) L}^{-1}$.

Na curva de crescimento controle é possível observar as quatro fases de crescimento do isolado (lag, log, estacionária e de declínio) bem definidas, o que não ocorre quando o microrganismo é exposto à diferentes concentrações de Cr(VI) (Figura 1). Quando uma bactéria é inoculada em meio de cultivo contendo EPTs, suas células são danificadas devido à toxicidade do EPT e o microrganismo direciona sua energia para reparar os danos celulares e adaptar sua via enzimática a esta nova condição (ABBAS et al., 2014).

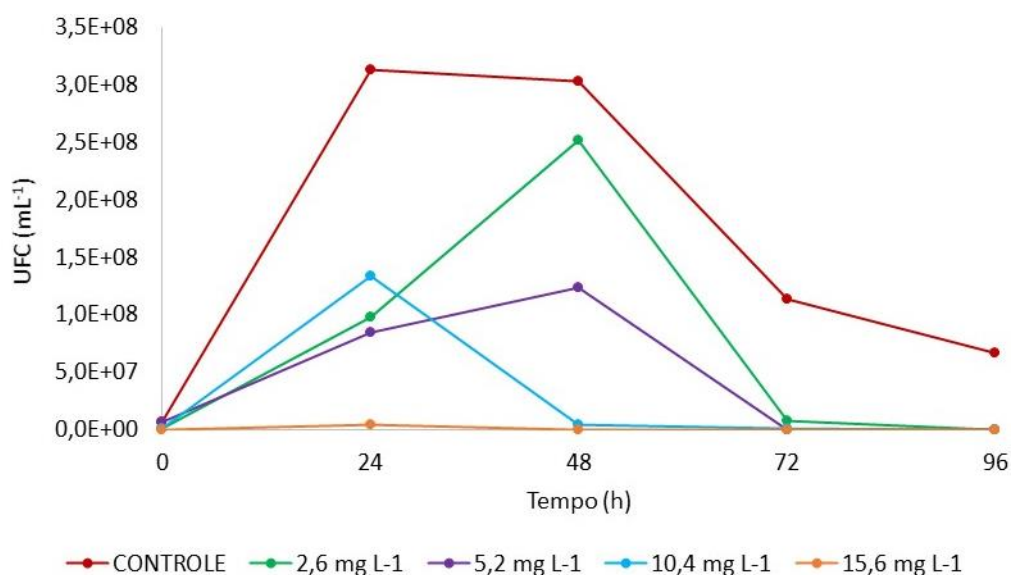


Figura 1. Curvas de crescimento do isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02 em meio YMA modificado, sem Cr(VI) (controle) e na presença de 2,6; 5,2; 10,4 e 15,6 mg Cr(VI) L⁻¹.

Para as concentrações 2,6 e 5,2 mg Cr(VI) L⁻¹ observa-se uma fase de latência com maior duração (Figura 1), que pode ser resultado do desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência eficazes em resposta às concentrações de Cr(VI) no meio de cultivo. Tais mecanismos podem ser bioquímicos, fisiológicos ou genéticos e interferem na especiação e na mobilidade do íon metálico (BENGHAIT, 2019).

CONCLUSÕES

Conclui-se que para o isolado de *Ensifer meliloti* LBMP-C02, cultivado em meio

YMA modificado, a CMI do Cr(VI) é 15,6 mg Cr(VI) L⁻¹ e o isolado é capaz de crescer na presença de até 10,4 mg de Cr(VI) L⁻¹. Tais resultados sinalizam que o isolado tem potencial para a bioacumulação do Cr(VI).

A AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe) da UNESP pela bolsa de iniciação científica concedida.

R REFERÊNCIAS

ABBAS, S. Z.; RAFATULLAH, M.; ISMAIL, N.; LALUNG, J. Isolation, identification, and characterization of cadmium resistant *Pseudomonas* sp. M3 from industrial wastewater. **Journal of Waste Management**, ID 160398, 2014.

ABDOLALI, A.; NGO, H. H.; GUO, W. S.; LEE, D. J.; TUNG, K. L.; WANG, X. C. Development and evaluation of a new multi-metal binding biosorbent. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 98-106, 2014.

ALAM, M. Z.; AHMED, S. Chromium removal through biosorption and bioaccumulation by bacteria from tannery effluents contaminated soil. **Clean - Soil, Air Water**, v. 39, n. 3, p. 226-237, 2011.

BENGHAIT, Y. Responses of bacteria to heavy-metal-stress and its influence on the antioxidant enzymes activity. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 13, n. 3, p. 142-149. 2019.

BIONDI, E. G.; TATTI, E.; COMPARINI, D.; GIUNTINI, E.; MOCALI, S.; GIOVANNETTI, L.; BAZZICALUPO, M.; 197 MENGONI, A.; VITI, C. Metabolic capacity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* strains as determined by phenotype 198 microarray analysis. **American Society for Microbiology**. v. 75, n. 16, 2009.

MORETTO, C. **Potencial biotecnológico de rizóbios como bioemulsificante e biossorvente de cobre e cromo**. 2014. 107 f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória(CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 02, 2008.

RAAMAN, N.; MAHEDRAN, B.; JAGANATHAN, C.; SUKUMAR, S.; CHANDRASEKARAN, V. Removal of chromium using *Rhizobium leguminosarum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 627-636, 2012.

RATHNAYAKE, I. V. N.; MEGHARAJ, M.; KRISHNAMURTI, G. S. R.; BOLAN, N. S.; NAIDU, R. Heavy metal toxicity to bacteria – are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? **Chemosphere**. v. 90, n. 3, p.1195-1200, 2013.

TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G.; PATLOLLA, A. K.; SUTTON, D. J. Heavy metals toxicity and the environment. **National Institutes of Health**, v. 101, p. 133-164, 2012. XIE, P., HAO, X.; MOHAMAD, O. A.; LIANG, J.; WEI, G. I. Comparative study of chromium biosorption by *Mesorhizobium amorphae* strain ccnws0123 in single and binary mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 570–587, 2013.