

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Engenharias
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais



Dissertação de Mestrado

**Efeitos de exposição ao cromo hexavalente (Cr(VI)) e resposta da defesa
antioxidante em *Exiguobacterium indicum* HG8: estresse oxidativo e potencial
de bioacumulação**

Dienifer Aline Braun Bunde

Pelotas, 2022

Dienifer Aline Braun Bunde

Efeitos de exposição ao cromo hexavalente (Cr(VI)) e resposta da defesa antioxidante em *Exiguobacterium indicum* HG8: estresse oxidativo e potencial de bioacumulação

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, do Centro de Engenharias, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Andreazza

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B942e Bunde, Dienifer Aline Braun

Efeitos de exposição ao cromo hexavalente (Cr(VI)) e resposta da defesa antioxidante em *Exiguobacterium indicum* HG8 : estresse oxidativo e potencial de bioacumulação / Dienifer Aline Braun Bunde ; Simone Pieniz, orientadora ; Robson Andreazza, coorientador. — Pelotas, 2022.

80 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Enzimas antioxidantes. 2. *Exiguobacterium indicum*. 3. *Hymenachne grumosa*. 4. Cromo. 5. Peroxidação lipídica. I. Pieniz, Simone, orient. II. Andreazza, Robson, coorient. III. Título.

CDD : 363.7

Dienifer Aline Braun Bunde

Efeitos de exposição ao cromo hexavalente (Cr(VI)) e resposta da defesa antioxidante em *Exiguobacterium indicum* HG8: estresse oxidativo e potencial de bioacumulação

Dissertação de Mestrado apresentado como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, do Centro de Engenharias, da Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa da dissertação de mestrado: 08/07/2022

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz (Orientadora)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Robson Andreazza (Co-orientador)

Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior (Membro titular)

Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Rio Grande

.....
Prof^a. Dr^a. Pathise Souto Oliveira (Membro titular)

Doutora em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof^a. Dr^a. Marília Lazarotto (Suplente)

Doutora em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria

Resumo

BUNDE, Dienifer Aline Braun. **Efeitos de exposição ao cromo hexavalente (Cr(VI)) e resposta da defesa antioxidante em *Exiguobacterium indicum* HG8: estresse oxidativo e potencial de bioacumulação.** Orientadora: Simone Pieniz. 2022. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Áreas contaminadas com cromo (Cr) representam um risco para a biodiversidade dos ecossistemas e para a sustentabilidade, exigindo, portanto, a aplicação de processos de remediação para sua recuperação e garantia da segurança ambiental. Bactérias resistentes ao cromo hexavalente (Cr(VI)) demonstram potencial para aplicação na biorremediação devido ao desenvolvimento de diversos mecanismos de resistência que podem ser usados para a remoção de Cr. No presente estudo, a rizobactéria HG8 identificada com 99,88% de similaridade pelo gene 16S rRNA como *Exiguobacterium indicum* (KY439921.1) foi isolada da macrófita aquática *Hymenachne grumosa*, coletada no canal Santa Bárbara de Pelotas, ambiente poluído por metais pesados, incluindo o Cr. Os aspectos estudados foram a capacidade de remoção de Cr(VI) e a resposta de biomarcadores de estresse oxidativo (superóxido dismutase – SOD; catalase – CAT; glutathione peroxidase – GPx e produção de malondialdeído – MDA) sob meio de cultura suplementado com 50, 100, 200 e 300mg L⁻¹ de Cr(VI), a concentração inibitória mínima de crescimento (CIM), além das condições ótimas de pH e temperatura para máxima remoção de Cr(VI). A CIM do isolado foi de 400mg L⁻¹ de Cr(VI) e os resultados demonstraram que *E. indicum* HG8 foi capaz de crescer e remover Cr em uma ampla faixa de temperaturas de incubação (20-45°C) e de pH (5,0-9,0), evidenciando sua capacidade de adaptação a diferentes condições. As condições ideais de cultivo e remoção de Cr(VI) foram verificadas em pH 6,0 e temperatura de incubação de 30°C. *E. indicum* HG8 foi capaz de remover eficientemente 99,6% de Cr(VI) e 89,4% de Cr total do meio de cultura em 24 horas de incubação. O aumento nos teores de MDA no extrato extracelular demonstra que houve dano lipídico, paralelamente ao aumento da resposta adaptativa das enzimas antioxidantes CAT e SOD, que indica que o estresse oxidativo foi estabelecido. Os dados sugerem que *E. indicum* HG8 possivelmente alterou a permeabilidade da membrana celular, formando uma espécie de barreira, uma vez que não houve aumento significativo nas concentrações de MDA e, da mesma forma, na resposta das enzimas antioxidantes no extrato intracelular. Tendo isso em vista, o isolado resistente pode ser utilizado como potencial agente para biorremediação efetiva de locais contaminados com Cr(VI), visando garantir a segurança ambiental e a proteção da saúde humana e animal.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes. *Exiguobacterium indicum*. *Hymenachne grumosa*. Cromo. Peroxidação lipídica.

Abstract

BUNDE, Dienifer Aline Braun. **Effects of exposure to hexavalent chromium (Cr(VI)) and antioxidant defense response in *Exiguobacterium indicum* HG8: oxidative stress and bioaccumulation potential.** Advisor: Simone Pieniz. 2022. 82f. Dissertation (Masters in Environmental Science) – Engineering Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Chromium (Cr) contaminated areas pose a risk to the sustainability and biodiversity of ecosystems, demanding, therefore, the application of remediation processes to ensure its recovery and environmental safety. Hexavalent chromium (Cr(VI)) resistant bacteria have shown potential to be applied to bioremediation processes due to the development of various defense mechanisms, which can be used on Cr reduction. In this study, the rhizobacteria HG8 identified with a 99.88% similarity by 16S rRNA as *Exiguobacterium indicum* (KY439921.1) was isolated from the aquatic macrophyte *Hymenachne grumosa*, collected by the Santa Bárbara stream, an environment with heavy metal pollution, including Cr, by anthropogenic activities. For this purpose, the characteristics studied were the Cr(VI) removal capacity and the biomarkers (superoxide dismutase – SOD; catalase – CAT; glutathione peroxidase – GPx e produção de malondialdehyde – MDA production) response induced by the oxidative stress under culture medium supplemented with 50, 100, 200 and 300mg L⁻¹ of Cr(VI), the minimal inhibitory concentration (MIC) and optimal pH and temperature conditions to maximize Cr(VI) removal. The isolated's MIC was 400mg L⁻¹ of Cr(VI) and results show that *E. indicum* HG8 was able to grow and remove Cr within a wide range of incubation temperatures (20-45°C) and pH (5.0-9.0), indicating the capacity to adapt to extreme conditions. The ideal condition of growth and removal of Cr(VI) was verified at pH 6.0 and incubation temperature of 30°C. *E. indicum* HG8 was able to effectively remove 99.6% of Cr(VI) and 89.4% of total Cr from the culture medium after 24 hours of incubation. The rise of MDA content in the extracellular extract shows that lipidic damage had occurred, in parallel to the rising in adaptative response of antioxidant enzymes CAT and SOD, which indicates that the oxidative stress has been reached. Data suggest that *E. indicum* HG8 probably has changed the permeability of the cell membrane, turning it into a sort of barrier, since there is no significant change in MDA concentration, nor antioxidant enzymes response in the intracellular extract. With such results, the isolated can be used as a potential agent for effective remediation of Cr(VI) contaminated areas, to reach environmental security and protect human and animal health.

Keywords: Antioxidant enzymes. *Exiguobacterium indicum*. *Hymenachne grumosa*. Chromium. Lipid peroxidation.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema representativo dos processos de fitorremediação desenvolvidos pelas plantas.....	23
Figura 2	Classificação das macrófitas aquáticas quanto à sua forma de vida na água.....	25
Figura 3	Figura ilustrativa do Canal Santa Bárbara de Pelotas, bairro Fragata, Rio Grande do Sul.....	31
Figura 4	Solução estoque de 1000mg L ⁻¹ de dicromato de potássio (K ₂ Cr ₂ O ₇) utilizada para suplementação dos meios de cultivo.....	32
Figura 5	Imagem ilustrativa do local da coleta.....	33
Figura 6	Imagem ilustrativa da macrófita aquática <i>Hymenachne grumosa</i> ...	34
Figura 7	Imagem ilustrativa do procedimento de isolamento de micro-organismos da rizosfera da <i>Hymenachne grumosa</i>	35
Figura 8	Esquema representativo das etapas adotadas para a definição do método de análise de variância.....	42
Figura 9	Imagem ilustrativa do isolado <i>Exiguobacterium indicum</i> cultivado em meio ágar nutriente suplementado com 50mg L ⁻¹ de cromo hexavalente (Cr(VI)).....	43
Figura 10	Árvore inferida pelo método Neighbor-Joining baseada nas sequências do gene 16S rRNA indicando a posição filogenética de <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8.....	44
Figura 11	Imagem ilustrativa do isolado <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8 cultivado sob exposição à diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)).....	47
Figura 12	Efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento bacteriano de <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8 após 48 horas de incubação em caldo nutriente suplementado com 50mg L ⁻¹ de cromo hexavalente (Cr(VI)).....	48
Figura 13	Efeito de diferentes pHs do meio de cultivo no desenvolvimento bacteriano de <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8 após 48 horas de incubação em caldo nutriente suplementado com 50mg L ⁻¹ de cromo hexavalente (Cr(VI)).....	49

Figura 14	Efeito de diferentes temperaturas na remoção de cromo hexavalente (Cr(VI)) por <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8.....	49
Figura 15	Efeito de diferentes pHs do meio de cultivo na remoção de cromo hexavalente (Cr(VI)) por <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8.....	50
Figura 16	Efeito de diferentes temperaturas de incubação na remoção de cromo total por <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8.....	51
Figura 17	Efeito de diferentes pHs do meio de cultivo suplementado com cromo hexavalente (Cr(VI)) na remoção de cromo total por <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8.....	52
Figura 18	Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) no desenvolvimento bacteriano, registrado através da medida da absorbância a 600nm (OD _{600nm}) às 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de incubação.....	54
Figura 19	Comparação entre as diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) no meio de cultivo e a contagem de células viáveis.....	55
Figura 20	Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) no desenvolvimento bacteriano durante ao ensaio de avaliação da biorremoção de cromo hexavalente (Cr(VI))	56
Figura 21	Capacidade de remoção de cromo hexavalente (Cr(VI)) por <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8 usando concentrações iniciais de 50, 100, 200 e 300mg L ⁻¹ em intervalos de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C).....	58
Figura 22	Capacidade de remoção de Cr total por <i>Exiguobacterium indicum</i> HG8 usando concentrações iniciais de 50, 100, 200 e 300mg L ⁻¹ em intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1	Limites de referência para a concentração de cromo em diferentes matrizes ambientais.....	18
Tabela 2	Diferentes estudos que relatam o potencial de aplicação de macrófitas aquáticas para remediação de metais pesados por meio de técnicas de fitorremediação.....	26
Tabela 3	Concentração de elementos (média $\pm$ desvio padrão) nas águas do canal Santa Bárbara, Rio grande do Sul.....	30
Tabela 4	Procedimento de preparação da curva padrão de albumina para quantificação de proteínas totais.....	39
Tabela 5	Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) na atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).....	61
Tabela 6	Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) na concentração de malondialdeído (MDA).....	63

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAS	Espectroscopia de absorção atômica
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CIM	Concentração inibitória mínima
Cr	Cromo
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO_4^{2-}	Cromato
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	Dicromato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas ao oxigênio
FeOCr_2O_3	Cromita ferrosa
GPx	Glutathione/Guaiacol peroxidase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Dicromato de potássio
MDA	Malondialdeído
O_1	Oxigênio livre
O_2^-	Íon superóxido
OD	Densidade óptica
OH^-	Radical hidroxila
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico
TRIS-HCl	Trizma base clorídrico
UFC	Unidades formadoras de colônias

Sumário

1 Introdução.....	10
1.1 Objetivos.....	13
1.1.1 Objetivo geral.....	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
2 Revisão da literatura.....	14
2.1 Metais pesados.....	14
2.1.1 Cromo.....	15
2.1.1.1 Fontes de poluição por cromo.....	16
2.1.1.2 Toxicidade de cromo.....	17
2.1.1.3 Remediação de cromo.....	18
2.2 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio.....	19
2.3 Biorremediação de cromo.....	21
2.3.1 Fitorremediação.....	22
2.3.1.1 Macrófitas aquáticas.....	24
2.3.2 Mecanismos microbiológicos de resistência ao cromo.....	26
2.3.2.1 Bioacumulação de cromo.....	28
2.3.2.2 Biossorção de cromo.....	28
2.3.2.3 Biotransformação de cromo.....	29
2.4 Descrição da área de estudo.....	29
3 Materiais e métodos.....	32
3.1 Preparo dos meios de cultura, tampões e soluções.....	32
3.2 Coleta da macrófita.....	33
3.2.1 <i>Hymenachne grumosa</i>	34
3.3 Isolamento e conservação do isolado.....	34
3.4 Identificação molecular do isolado.....	35
3.4.1 Extração do DNA.....	36
3.4.2 Amplificação do DNA.....	36
3.5 Fatores que afetam a biorremoção de Cr(VI).....	37
3.6 Resistência ao Cr(VI).....	37
3.7 Biorremoção de Cr(VI).....	38
3.8 Estresse oxidativo.....	38

3.8.1 Preparo do extrato extracelular (bruto).....	38
3.8.2 Preparo do extrato intracelular.....	39
3.8.3 Ensaio de enzimas antioxidantes.....	39
3.8.3.1 Quantificação de proteínas totais.....	39
3.8.3.2 Superóxido dismutase.....	40
3.8.3.3 Catalase.....	40
3.8.3.4 Guaiacol peroxidase.....	41
3.8.4 Avaliação da peroxidação lipídica.....	41
3.9 Análise estatística.....	42
4 Resultados e discussão.....	43
4.1 Identificação do isolado resistente a Cr(VI).....	43
4.1.1 Gênero <i>Exiguobacterium</i>	44
4.1.2 <i>Exiguobacterium indicum</i>	46
4.2 Fatores que afetam a remoção de Cr(VI) por <i>E. indicum</i> HG8.....	47
4.3 Resistência ao Cr(VI) por <i>E. indicum</i> HG8.....	53
4.4 Biorremediação de Cr(VI) por <i>E. indicum</i> HG8.....	56
4.5 Efeito de Cr(VI) na atividade de enzimas antioxidantes.....	61
4.6 Efeito de Cr(VI) na peroxidação lipídica.....	63
5 Considerações finais.....	65
Referências.....	66

1 Introdução

A poluição por metais pesados ainda é, atualmente, um grande problema ambiental mundial. O uso excessivo de metais tóxicos em atividades antropogênicas nos setores industriais como galvanoplastia, pintura, curtimento, têxteis e tinturas, fabricação de papel, mineração e outros, cresceu consideravelmente desde o início do século XIX (BERTOLAZI *et al.*, 2010; AYELE e GODETO, 2021).

Quando efluentes contendo metais pesados são descarregados no meio ambiente por meio de atividades industriais, estes podem atingir as águas superficiais, escoar para as águas subterrâneas e até mesmo estabelecer-se em aquíferos, causando poluição da água e do solo devido à sua alta solubilidade (MISHRA *et al.*, 2019). Os metais pesados representam uma ameaça potencial a vários organismos, pois podem se moverem e acumular-se ao longo da cadeia trófica, apresentando efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações (RAHMAN e SINGH, 2019).

O cromo (Cr) é um micronutriente essencial na dieta de animais e de humanos, necessário para o metabolismo de açúcares, lipídios e proteínas em mamíferos, no entanto não há necessidade conhecida de Cr nas vias metabólicas de plantas e micro-organismos (JOBBOY *et al.*, 2018). Por outro lado, altos níveis de Cr são sempre tóxicos, embora o nível de toxicidade dependa do seu estado de oxidação.

O Cr é um metal pesado amplamente aplicado em processos industriais, como metalurgia, soldagem de ligas ou de aço, acabamento de metais, curtume, fabricação de têxteis, produção de ligas de Cr, galvanoplastia de Cr, fabricação de vidro, tintas/pigmentos, fabricação de cerâmicas e como conservantes para madeira (ADIBMEHR *et al.*, 2014). Em ambientes naturais, os estados de valência mais comuns são o hexavalente (Cr(VI)) e o trivalente (Cr(III)), sendo o Cr(VI) considerado um poluente prioritário (WANG *et al.*, 2016) relatado como mutagênico, carcinogênico e teratogênico, devido à sua alta estabilidade e permeabilidade celular (SINGH *et al.*, 2020; YAO *et al.*, 2020). O Cr(VI) é considerado altamente tóxico, pois causa graves efeitos nocivos à saúde humana e animal, como diarreia, úlceras, irritações nos olhos e na pele, disfunção renal e carcinoma de pulmão. A exposição em longo prazo ao Cr(VI) pode levar a danos renais e hepáticos, assim como pode acarretar danos no tecido nervoso e no sistema circulatório (FU *et al.*, 2021). O Cr(VI) afeta de forma severa vários processos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos, assim como induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células vegetais, causa redução da fotossíntese e na absorção de nutrientes, ocasionando o crescimento lento em

plantas (JOBBY *et al.*, 2018). Isto posto, cada vez mais atenção tem sido voltada a pesquisas sobre remediação de locais contaminados com Cr.

Um dos principais mecanismos associado à toxicidade dos metais, incluindo o Cr(VI), é a geração de estresse oxidativo. Muitas bactérias sofrem estresse oxidativo por uma variedade de poluentes ambientais que exercem seu efeito tóxico através da alteração do estado redox celular (BEHERA, DANDAPAT e RATH, 2014). Em plantas, quando presentes em concentrações elevadas, os metais pesados destroem as funções biológicas e causam muitos efeitos prejudiciais diretos e indiretos no crescimento (RIZVI e KHAN, 2017).

Espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido (SO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radicais hidroxila (OH^-), são produzidas como subproduto do metabolismo celular normal, assim como também são consequência de estresse ambiental. Portanto, diante de casos de contaminação e subsequente estresse ambiental, a geração excessiva das ERO induz a morte celular por peroxidação lipídica da membrana, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, alteração do estado redox intracelular e danos ao DNA (SHARMA, BAROT e ARCHANA, 2020).

Nos organismos vivos, para mitigar os efeitos negativos causados pelas ERO, existem sistemas antioxidantes de defesa, constituídos por antioxidantes não enzimáticos – como vitaminas (A, C e E) e pró-betacarotenos – e sistemas enzimáticos, protagonizados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (TELES *et al.*, 2015). De acordo com Lushchak (2011), SOD pode acelerar a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Catalase decompõe peróxido de hidrogênio, produzindo água e oxigênio molecular. Glutathione peroxidase usa alguns agentes redutores e peróxidos como co-substratos, produzindo água e produtos reduzidos.

Uma vez que a ocorrência de desequilíbrio oxidativo é seguida pela expressão de enzimas que atuam como antioxidantes, essas podem ser utilizadas como biomarcadores, dado que a sua presença em grande quantidade geralmente indica o combate ao estado pró-oxidante. Segundo Fryzova *et al.* (2017), a enzima SOD possui potência antioxidante significativa, e é comumente usada como um marcador de estresse oxidativo. As enzimas CAT e GPx são expressas em condições de estresse. Ainda como biomarcador, pode ser inserido a medida de substâncias reativas com

ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reflete danos provenientes da peroxidação de lipídios nas membranas biológicas (PIASSÃO *et al.*, 2019).

Em função da necessidade de remediação de ambientes contaminados, a fitorremediação de metais tóxicos é uma técnica reconhecidamente promissora que se baseia na utilização de plantas para limpar e/ou melhorar a qualidade do solo e da água por inativação ou translocação de poluentes em diferentes partes da planta, sem efeitos negativos na estrutura, fertilidade e atividade biológica do solo (TIRRY *et al.*, 2018). Entretanto, alguns fatores podem limitar a eficácia das plantas no processo, como a disponibilidade de íons metálicos no solo, a taxa de translocação da raiz para a parte aérea e o nível de tolerância ao poluente (CAPUANA, 2011).

Estudos apontam que algumas bactérias rizosféricas auxiliam no alívio do estresse oxidativo em plantas (RIZVI e KHAN, 2017; YASIN *et al.* 2018; SHARMA, BAROT e ARCHANA, 2020), pois a atividade enzimática dos micro-organismos melhora o crescimento e a tolerância ao estresse quando crescem em meios contaminados com metais pesados. Dessa forma, esses micro-organismos atuam como condicionadores do solo, melhoram a sua estrutura e quelam metais pesados, permitindo que as plantas absorvam esses íons quelados. Sendo assim, a fitorremediação é uma técnica de biorremediação que pode ser aprimorada quando aplicada em conjunto com micro-organismos.

As interações entre plantas hiperacumuladoras e micro-organismos tolerantes a metais ganharam considerável atenção devido ao potencial dos micro-organismos de bioacumular metais de ambientes poluídos e pelos efeitos subsequentes na mobilização de metais, que resultam da absorção aprimorada e da promoção do crescimento da planta (ULLAH *et al.*, 2015). Bactérias que promovem o crescimento de plantas e são resistentes a metais pesados requerem uma investigação completa para entender sua relação simbiótica. Além das enzimas antioxidantes, a bioacumulação realizada por micro-organismos também é considerada como um dos principais mecanismos desenvolvidos para tolerar metais pesados (SHAO *et al.*, 2019). Considerando a toxicidade dos metais pesados e o comprometimento da sustentabilidade e da biodiversidade dos ecossistemas, a biorremediação microbiana surge como uma estratégia ecologicamente correta, de baixo custo, e que utiliza fontes biológicas benéficas para a remoção de Cr e de diversos outros contaminantes,

cujo processo envolve diferentes estratégias que incluem bioadsorção, bioedução e bioacumulação (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

No presente estudo, a macrófita aquática *Hymenachne grumosa* foi coletada no canal Santa Bárbara de Pelotas, ambiente antropogenicamente poluído por metais pesados, incluindo o Cr (DEMARCO, 2018). Posteriormente, a rizobactéria *Exiguobacterium indicum* foi isolada da planta com o intuito de avaliar a resposta de proteção antioxidante, bem como os efeitos e condições de estresse oxidativo por exposição ao Cr. Nesse sentido, os aspectos estudados foram a atividade de biomarcadores do estresse oxidativo induzido pela presença do metal, a capacidade de resistência e remoção de Cr(VI) e os fatores que afetam a adsorção, como tempo de exposição, pH inicial, concentração do metal e temperatura. Dessa forma, os resultados obtidos podem ser úteis no fornecimento de orientação básica para pesquisas futuras sobre a tolerância ao estresse de Cr e os mecanismos de defesa bacteriana, visando o potencial de aplicação na biorremediação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância e a remoção de Cr(VI) pelo isolado *E. indicum* HG8 e a resposta de biomarcadores de estresse oxidativo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar os diferentes fatores que afetam a adsorção de Cr(VI) por *E. indicum* HG8 (pH inicial, tempo de exposição, concentração do metal e temperatura);
- Verificar a concentração inibitória mínima do crescimento bacteriano em meio de cultura contendo Cr(VI);
- Investigar a resistência do isolado *E. indicum* HG8 na presença de diferentes concentrações de Cr(VI) por meio dos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo: SOD, CAT e GPx;
- Avaliar a tolerância da peroxidação lipídica (TBARS) pelo isolado *E. indicum* HG8 na presença de diferentes concentrações de Cr(VI).

2 Revisão da literatura

2.1 Metais pesados

De acordo com Ali e Khan (2018), metais pesados são metais de ocorrência natural no ambiente, que apresentam como característica número atômico maior que 20 e densidade elementar maior que 5g.cm^{-3} , como por exemplo Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Cobre (Cu) e Zinco (Zn). Os metais pesados são os principais elementos existentes na crosta terrestre como contaminantes ambientais persistentes que não podem ser totalmente biodegradados, apenas transformados (MISHRA *et al.*, 2019).

Problemas relacionados com a contaminação por metais pesados provenientes de fontes antropogênicas tiveram início na Idade Média com as atividades mineradoras, porém o processo foi intensivamente acelerado no início do século XIX com o processamento de metais em plantas químicas e de fundição (BERTOLAZI *et al.*, 2010). Mesmo em concentrações reduzidas, os cátions metálicos, quando lançados em corpo receptor estão sujeitos ao fenômeno conhecido como amplificação biológica. Este efeito ocorre em virtude desses compostos não integrarem o ciclo metabólico dos organismos vivos, sendo neles armazenados e, em consequência, sua concentração é extraordinariamente ampliada nos tecidos dos seres vivos que integram a cadeia trófica do ecossistema (AGUIAR, NOVAES e GUARINO, 2002).

A presença de metais pesados no ambiente é motivo de preocupação devido às suas características de alta reatividade, toxicidade e mobilidade. As fontes de distribuição de metais pesados no ambiente e os fatores que influenciam sua distribuição, reatividade, mobilidade e toxicidade é conhecida por ser numerosa (EDAO, 2017). Nos ecossistemas aquáticos, os metais podem surgir de maneira artificial, quando provenientes de diversas fontes antropogênicas, como por exemplo, efluentes domésticos e industriais, atividades agrícolas com o uso de agrotóxicos e rejeitos de área de mineração e de garimpos, ou forma natural, mediante o aporte atmosférico e chuvas, e também pela liberação e transporte desde a rocha matriz ou compartimentos do solo (VARDHAN, KUMAR e PANDA, 2019). Embora os metais pesados possam ocorrer naturalmente no solo, contribuições adicionais são provenientes de atividades antrópicas, como agricultura, urbanização, industrialização e mineração (LI *et al.*, 2014). No solo, os metais pesados estão presentes em diferentes formas. Segundo Edao (2017), as várias espécies de metais podem estar presentes em uma forma iônica solúvel, organicamente ligada ou ainda de forma

residual. Algumas dessas formas são mais móveis, enquanto outras são muito estáveis, ou seja, não são prontamente convertidas de uma forma para outra.

Nos seres vivos, os metais pesados agem diretamente por meio do bloqueio das atividades biológicas, onde a ligação entre o metal e determinados grupos funcionais de proteínas causam a inativação enzimática, podendo ocasionar danos sérios e fatais à saúde (VULLO, 2003), uma vez que a maior parte dos metais apresentam alta reatividade química e atividade biológica, principalmente na forma de íons, radicais ou complexos orgânicos (LINDINO *et al.*, 2008). O acúmulo de metais tóxicos no corpo humano traz consequências graves para a saúde, como anormalidades no crescimento e no desenvolvimento, na carcinogênese, nos defeitos neuromusculares, nas doenças mentais e em falha de atividades metabólicas (CHANDRA *et al.*, 2011).

A contaminação por metais pesados é um problema sério, visto que as atividades antrópicas envolvendo o processamento e aplicação desses metais aumentaram drasticamente nas últimas décadas e se tornaram um grande risco para a toxicidade ambiental, principalmente devido ao lançamento indiscriminado de resíduos líquidos ou sólidos contendo metais pesados, muitas vezes em concentrações que excedem os limites de referência (DHAL *et al.*, 2013). Tendo isso em vista, a sua remoção/remediação é necessária para a segurança ambiental.

2.1.1 Cromo

O Cr é um elemento de ocorrência natural presente na crosta terrestre, porém não é encontrado na sua forma elementar (Cr(0)) na natureza, somente são encontrados seus compostos com estados de oxidação que variam de Cr(II) ao Cr(VI), presentes em rochas e sedimentos na forma de minérios, como a cromita ferrosa (FeOCr_2O_3) (KAUR, SHARMA e KAUR, 2019). Os estados mais estáveis de Cr no ambiente são a forma trivalente (Cr(III)) e hexavalente (Cr(VI)).

Os processos naturais que introduzem o Cr nos ambientes aquáticos são o intemperismo e lixiviação de constituintes rochosos, precipitação úmida e precipitação seca proveniente da atmosfera e escoamento de sistemas terrestres. Sua presença e concentração dependem de vários processos, como redox químico e fotoquímico, reações de precipitação/dissolução e adsorção/dessorção (KOTAS e STASICKA,

2000). No solo, o Cr encontra-se combinado com outros elementos como o oxigênio (O), ferro (Fe) e chumbo (Pb) na forma de óxidos (RIBEIRO, 2013).

Apesar do Cr(III) não ser facilmente reoxidado para o estado mais carcinogênico e mutagênico (Cr(VI)), sob certas condições a oxidação pode ocorrer pela ação de algumas bactérias e pelo óxido de manganês presente no ambiente (SETHUNATHAN *et al.*, 2005). O manganês pode atuar como transportador de elétrons entre o oxigênio dissolvido e o Cr(III) e, portanto, o manganês oxida indiretamente o Cr(III) em Cr(VI).

O Cr(III) é predominante em condições redutoras, enquanto o Cr(VI) prevalece em condições oxidantes (XU *et al.*, 2021). De acordo com Singh *et al.* (2020), compostos de Cr(VI) agem como oxidantes potenciais em pH ácido e neutro. Abaixo, segue a equação química (1) que representa a reação de equilíbrio entre as duas formas mais prevalentes de Cr, os ânions cromato (CrO_4^{2-}) e dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$).



Com a mudança no pH, as propriedades oxidantes dos ânions cromato e dicromato mudam. Em pH baixo, atua como um forte agente oxidante, enquanto em pH alto é moderadamente oxidante (SINGH *et al.*, 2020).

O Cr(III) é predominante em pH abaixo de 5,0 e insolúvel em pH neutro a alcalino (MA *et al.*, 2019). Por sua vez, o Cr(VI) encontra-se concentrado em pH mais alto. Em condições ácidas, o Cr(VI) está presente na forma $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, enquanto que em condições alcalinas é encontrado principalmente como CrO_4^{2-} (PUSHKAR *et al.*, 2021).

2.1.1.1 Fontes de poluição por cromo

O aumento das concentrações de Cr no ambiente, caracterizando um efeito poluente, está relacionado com atividades antrópicas. Em maior parte, a contribuição para o lançamento de resíduos com Cr inclui indústrias de processamento de metal, curtume, produção de cromato, soldagem de aço inoxidável e produção de ferrocromo e pigmento de Cr (KAUR, SHARMA e KAUR, 2019). O Cr e o cromato são amplamente empregados nos processos industriais como matérias-primas, ocasionando no descarregamento de resíduos maciços, águas residuais e águas residuais de galvanoplastia e outros poluentes de metais pesados, além do processo industrial de

mineração de minério de cromita (Cr_2O_3) e FeOCr_2O_3 , que também contribui com a contaminação de Cr (TANG *et al.*, 2015).

As indústrias de curtume são uma das principais responsáveis pela poluição por Cr no ambiente. Durante processo de curtimento, o sal de Cr é utilizado para converter o couro cru em couro, em seguida as águas residuais contendo grande quantidade de matéria orgânica, compostos fenólicos, taninos e metais pesados, principalmente o Cr, são despejados no ambiente, podendo causar a poluição do solo e da água, além de ameaçar a saúde humana (CHANDRA *et al.*, 2010).

O efluente proveniente dessas indústrias, quando contém Cr e não é tratado adequadamente, influencia diversos parâmetros dos recursos hídricos como cor, sólidos suspensos totais (SSP), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (PUSHKAR *et al.*, 2021). Dessa forma, o Cr causa a poluição de solos agrícolas e da água usada para irrigação, podendo canalizar a entrada de Cr na cadeia alimentar.

2.1.1.2 Toxicidade de cromo

As formas iônicas trivalente (Cr(III)) e hexavalente (Cr(VI)) de Cr são distintas quanto as suas propriedades físico-químicas e reatividade biológica. O Cr(VI) é cem vezes mais tóxico e mil vezes mais mutagênico que o Cr(III) (SAMANTARAY, MOHAPATRA e MISHRA, 2014). O Cr(VI) é altamente solúvel em água e móvel no ecossistema, enquanto o Cr(III) apresenta baixa solubilidade e mobilidade (BAJGAI, GEORGIEVA e LAZAROVA, 2012). O Cr(III) é menos tóxico, atua como micronutriente e é necessário para o crescimento e atividades metabólicas em alguns organismos. Por outro lado, o Cr(VI) é mais tóxico quando comparado ao Cr(III), em razão da sua alta solubilidade e mobilidade em sistemas biológicos, pois pode permear rapidamente através das membranas biológicas e interagir com as biomoléculas no citoplasma celular (PUSHKAR *et al.*, 2021). Contudo, o Cr(III) pode complexar com compostos orgânicos, interferindo nos sistemas metaloenzimáticos e, sob altas concentrações e/ou exposição prolongada, pode causar problemas de saúde como alergias na pele, câncer de pulmão, diminuição da saúde reprodutiva e malformações congênitas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2012).

O Cr tem capacidade de formar complexos com ácidos nucleicos, proteínas e compostos orgânicos em plantas, prejudicando significativamente o seu crescimento e desenvolvimento, dificultando a germinação, diminuindo a atividade fotossintética,

impedindo atividades enzimáticas sensíveis e criando desequilíbrios oxidativos que ocasionam à mutagênese (ERTANI *et al.*, 2017). Além disso, o Cr(VI) tem efeito genotóxico e citostático para plantas (SINGH *et al.*, 2020).

De acordo com Ayele e Godeto (2021), a toxicidade do Cr afeta o tamanho, a diversidade e o comportamento da população microbiana, além de alterar sua estrutura genética. A exposição de micro-organismos ao Cr(VI) perturba a morfologia, o metabolismo e inibe o crescimento celular através da alteração da estrutura dos ácidos nucleicos, rompendo membranas celulares, causando danos funcionais, inibindo a atividade enzimática e a fosforilação oxidativa, causando peroxidação lipídica da membrana e alterando o equilíbrio osmótico.

2.1.1.3 Remediação de cromo

No Brasil, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelece o valor máximo permitido de 0,05 mg L⁻¹ de Cr total na água para consumo humano (Tabela 1). Já para o lançamento de efluentes contendo Cr, o limite máximo permitido é de 1,0mg L⁻¹ de Cr(III) e de 0,1mg L⁻¹ para Cr(VI), segundo a Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.

Tabela 1 – Limites de referência para a concentração de cromo em diferentes matrizes ambientais.

Meio	Concentração	Comentário	Referência
Água potável	0,05 mg.L ⁻¹ Cr	VMP ¹	Portaria MS 2.914/2011
Águas doces	0,05 mg.L ⁻¹ Cr (classes I, II e III)	VM ²	CONAMA 357/2005
Águas salinas	0,05 mg.L ⁻¹ Cr (classe I)	VM	CONAMA 357/2005
	1,1 mg.L ⁻¹ Cr (classe II)		
Águas salobras	0,05 mg.L ⁻¹ Cr (classe I)	VM	CONAMA 357/2005
	1,1 mg.L ⁻¹ Cr (classe II)		
Águas subterrâneas	50 µ.L ⁻¹ Cr (consumo humano)	VMP	CONAMA 396/2008
	1.000 µ.L ⁻¹ Cr (dessedentação de animais)		
	100 µ.L ⁻¹ Cr (irrigação)		
	50 µ.L ⁻¹ Cr (recreação)		
Lançamento de efluentes	0,1 mg.L ⁻¹ Cr(VI)	VMP	CONAMA 430/2011
	1,0 mg.L ⁻¹ Cr(III)		
	0,1 mg.L ⁻¹ Cr(VI)	VMP	CONSEMA 355/2017
	0,5 mg.L ⁻¹ Cr		
Solo agrícola	150 mg.kg ⁻¹ Cr de peso seco	VRI ³	CONAMA 420/2009
Solo residencial	300 mg.kg ⁻¹ Cr de peso seco	VRI	CONAMA 420/2009
Solo industrial	400 mg.kg ⁻¹ Cr de peso seco	VRI	CONAMA 420/2009

¹VMP = Valor máximo permitido. ²VM = Valor máximo. ³VRI = Valor de investigação.

O lançamento de efluentes contendo Cr que não receberam o tratamento adequado podem atingir facilmente reservatórios e/ou rios que são fontes de

abastecimento de água para a população e, por ser um elemento não biodegradável, proporciona consequências imprevisíveis e, a longo prazo, uma vez que disposto no ambiente, pode ser absorvido por organismos em concentrações que aumentam progressivamente (CHANDRA *et al.*, 2010; PUSHKAR *et al.*, 2021).

Os métodos de remediação do Cr(VI) incluem tratamentos físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos e químicos convencionais incluem adsorção, troca iônica, fotocatalise, eletrodialise e filtração por membrana (XU *et al.*, 2021). Tradicionalmente, o Cr(VI) é removido da água através da redução de Cr(VI) a Cr(III) usando um agente redutor como sulfato ferroso, dióxido de enxofre ou dissulfito de sódio, seguido de precipitação como Cr(III) ou ferro elementar (COETZEE *et al.*, 2018). Entretanto, esses métodos apresentam grandes desvantagens, como altos custos operacionais, grande demanda de energia, uso de diversos produtos químicos, geração de poluentes secundários e baixa eficiência de remediação (TANG *et al.*, 2015). A utilização desses métodos pode exigir que outras tecnologias sejam aplicadas para converter os produtos gerados em formas não tóxicas, biodegradáveis e ambientalmente seguras (AYELE e GODETO, 2021).

Em decorrência disso, é necessário adotar opções ecologicamente e economicamente eficientes para remoção e recuperação de Cr para atender aos padrões ambientais de referência de qualidade. Consequentemente, o foco vem sendo direcionado para abordagens de remediação biológica com eficiência de remoção relativamente alta, menor custo e ambientalmente benéficas, onde destacam-se a biotransformação e a bioadsorção como tecnologias amplamente aplicadas, que utilizam a capacidade de transformação de metais pesados ou adsorção por micro-organismos ou plantas (AYELE e GODETO, 2021).

2.2 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

De acordo com Lushchak (2011), mais de 90% do oxigênio consumido por organismos vivos é utilizado para produção de energia pela fosforilação oxidativa com a operação da cadeia de transporte de elétrons via mecanismo de quatro elétrons, levando à produção de adenosina trifosfato (ATP) e água. A adição consecutiva de elétrons, um a um, também leva à produção final de água (porém, sem produção de ATP) com a formação de produtos intermediários (ERO), incluindo os radicais livres, como ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH^\bullet$), além de espécies reativas não radicais, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular.

O estresse oxidativo é causado pela presença de compostos tóxicos e consequente participação direta em reações de oxirredução, que produz ERO, assim como pode ocorrer o sequestro ou inativação de moléculas que participam dos sistemas de defesa antioxidante (PIASSÃO *et al.*, 2019). Como o próprio nome indica, as ERO são derivadas do oxigênio molecular com atividade redox e elevada reatividade (MANDELLI, 2014). Quando há um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e de antioxidantes, os organismos enfrentam um estresse oxidativo, que gera uma variedade de danos, que vão desde, por exemplo, a morte celular em bactérias a patologias mais graves em outros organismos maiores (LATIFI, RUIZ e ZHANG, 2008).

Durante a redução bacteriana de Cr(VI) para Cr(III), um radical intermediário Cr(V), altamente reativo, é gerado em cada ciclo redox. Então, Cr(V) é oxidado de volta à Cr(VI), entregando um elétron ao dioxigênio e gerando ERO (THATOI *et al.*, (2014). A geração de ERO resulta em estresse oxidativo nas bactérias. Nesse processo, as proteínas bacterianas também são induzidas pelo cromato na defesa contra o estresse oxidativo levando a um mecanismo adicional de defesa contra o cromato (RAMIREZ-DIAZ *et al.*, 2008). Assim, durante a redução do Cr(VI), as células bacterianas são submetidas ao estresse oxidativo devido à geração simultânea de ERO, que afeta a viabilidade das células e a eficiência da redução do Cr(VI) (CHEUNG *et al.*, 2006).

Diante desse desequilíbrio, os organismos desenvolvem múltiplos mecanismos de defesa para se proteger contra os danos causados pelas ERO. Algumas dessas defesas são enzimáticas, as quais ocorrem por meio da ação das enzimas SOD, CAT e GPx e, outras são consideradas não enzimáticas (NADPH, NADH, carotenoides, ácido ascórbico, α -tocoferol e glutathiona (GSH)) (SHAO *et al.*, 2019). Esses antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos podem eliminar ou prevenir a formação de radicais livres por meio da doação de hidrogênio ou elétrons (SHARMA, BAROT e ARCHANA, 2020), proporcionando a mitigação da atividade antioxidante e um equilíbrio entre a produção de ERO.

Dentre as enzimas produzidas pelos micro-organismos que podem levar à diminuição dos níveis de ERO destacam-se a SOD, que converte o O_2^- (ânion superóxido) em H_2O_2 e O_2 , a CAT que converte H_2O_2 em H_2O e O_2 , e a GPx, responsável pela desintoxicação de peróxidos orgânicos e inorgânicos (MANDELLI, 2014).

2.3 Biorremediação de cromo

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza organismos vivos (plantas ou micro-organismos) com o intuito de remover ou reduzir poluentes no ambiente. Essa alternativa ecológica é principalmente aplicada na remediação de ambientes contaminados com metais tóxicos e/ou moléculas orgânicas dificilmente degradáveis (GAYLARD, BELLINASSO e MANFIO, 2005). O processo pode ocorrer *in situ*, quando a biorremediação é realizada no próprio local contaminado sem a remoção do material, ou *ex situ*, quando há a necessidade de retirar o material do local contaminado para que seja tratado em outro local (LACERDA, NAVONI e AMARAL, 2019). Em relação aos metais pesados, a biorremediação visa captá-los para torná-los indisponíveis para alastrar-se no ecossistema, ou busca a extração e a mobilização para posterior reutilização ou descarte seguro (BAJGAI, GEORGIEVA e LAZAROVA, 2012). A biorremediação pode ser realizada por meio de bioestimulação, atenuação natural ou bioaugmentação (AGUILAR, 2018).

Dentre os métodos de biorremediação, a remoção de íons metálicos pode ser baseada em técnicas de sorção empregando materiais de origem biológica (biomassa). Os possíveis materiais empregados são micro-organismos (bactérias, microalgas e fungos), vegetais macroscópicos (algas, gramíneas e plantas aquáticas) e subprodutos agrícolas ou industriais, como partes específicas de vegetais (cascas, bagaços e sementes) (VOLESKY, 2003).

Vários micro-organismos têm sido amplamente estudados devido a capacidade de remover Cr(VI) por diferentes métodos biológicos (DOGAN *et al.*, 2011; KUMAR e DWIVEDI, 2019; MOHAMED *et al.*, 2020). Pesquisas demonstram que bactérias, fungos e leveduras podem desenvolver resistência a metais em um ambiente contaminado e são capazes de remediar a contaminação por Cr(VI) (XU *et al.*, 2021). Ou seja, esses micro-organismos desenvolvem mecanismos como forma de resistência a toxicidade quando presentes em locais contaminados com Cr, que são considerados como uma alternativa para remover o metal pesado. Os mecanismos incluem biotransformação (redução, oxidação ou precipitação), bioacumulação e/ou bio sorção (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

Similarmente, a fitorremediação é também uma técnica de biorremediação que utiliza plantas com potencial para absorver metais pesados (CHOPPALA, BOLAN e PARK, 2013). Entretanto, podem existir situações de baixa eficiência no processo e

que requerem melhorias. Assim, a interação entre as raízes de plantas acumuladoras de metais pesados e micro-organismos resistentes pode melhorar consideravelmente os processos de fitorremediação (ANDREAZZA *et al.*, 2010a).

A biorremediação é uma alternativa viável quando comparada aos métodos convencionais. Entre as vantagens está a ausência da utilização de produtos químicos concentrados e agressivos, bem como a possibilidade de reutilização da biomassa após o processo (BAJGAI, GEORGIEVA e LAZAROVA, 2012).

2.3.1 Fitorremediação

Conforme descrito anteriormente, a fitorremediação é uma forma de biorremediação que consiste na utilização de plantas para a descontaminação de ambientes poluídos considerada eficiente, econômica e ecologicamente correta (ALI *et al.*, 2020). As plantas possuem a capacidade de desenvolver diferentes mecanismos para remediar os metais pesados (Figura 1), entre estes estão a fitoextração, a fitoestabilização, a rizofiltração, a fitovolatilização e a fitotransformação (MISHRA *et al.*, 2019; VARDHAN *et al.*, 2019). Várias espécies de plantas têm a capacidade de acumular concentrações significativamente altas de metais pesados em diferentes partes do corpo, como folha, caules e raiz (ALI *et al.*, 2020). Ao contrário dos compostos orgânicos que geralmente são metabolizados pelas plantas, os metais pesados não são biodegradáveis, portanto, são acumulados na biomassa vegetal.

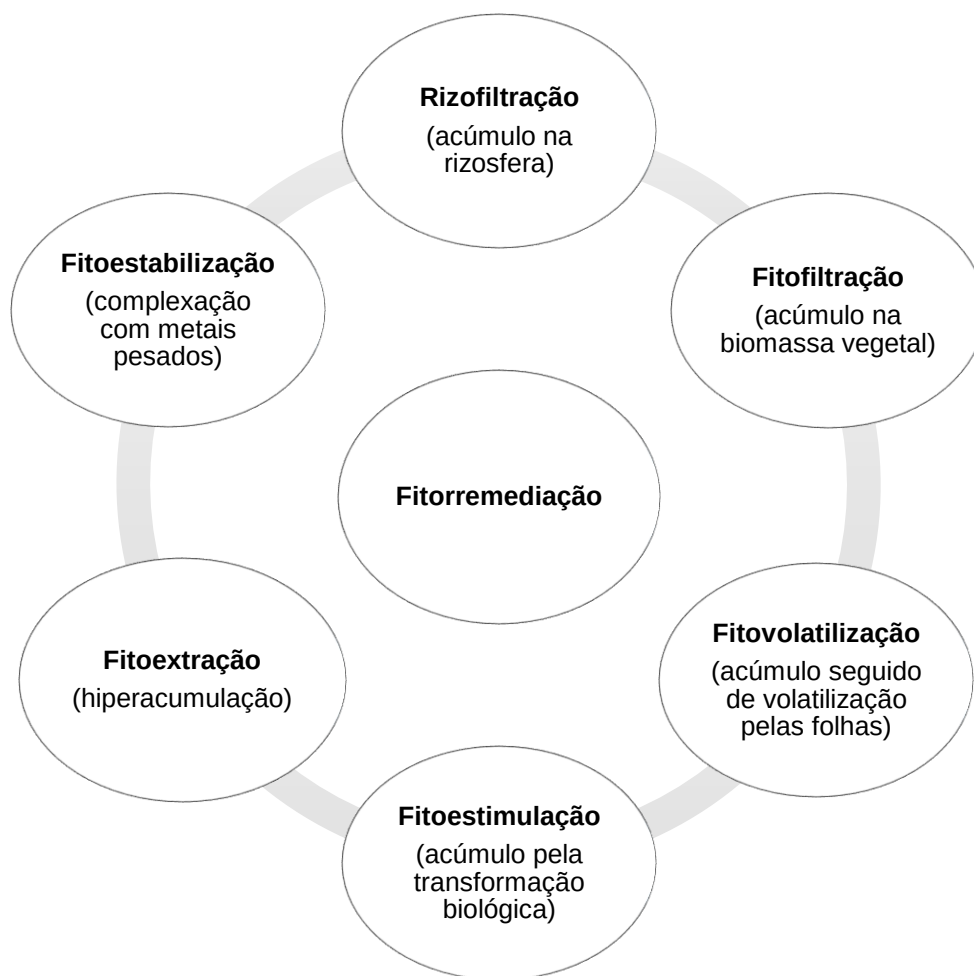


Figura 1 – Esquema representativo dos processos de fitorremediação desenvolvidos pelas plantas.
Fonte: Adaptado de MISHRA *et al.* (2019) e KANWAR *et al.* (2020).

A fitorremediação utiliza tecnologicamente plantas para remover, desintoxicar e conter contaminantes (WANG *et al.*, 2017). Um grande número de contaminantes pode ser remediado através dessa tecnologia, como inseticidas, solventes clorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos de petróleo, radionucleosídeos, surfactantes, elementos explosivos e metais pesados (LEGUIZAMO *et al.*, 2017). Além disso, a fitorremediação beneficia a estabilização do solo, a produção de biomassa e o sequestro de carbono, uma vez que muitas plantas apresentam alta capacidade em produzir biomassa e acumular altas cargas de poluentes (AFZAL, KHAN e SESSITSCH, 2014).

No processo de escolha das plantas fitorremediadoras, deve-se optar por espécies capazes de sobreviver em ambientes contaminados, uma vez que nestes locais é possível encontrar plantas tolerantes, sensíveis, acumuladoras ou hiperacumuladoras de metais pesados e outros contaminantes (PIO, SOUZA e

SANTANA, 2013). As plantas que podem ser utilizadas para realizar a fitorremediação são conhecidas como metalófitas, que podem ser de três tipos: indicadoras, exclusoras ou hiperacumuladoras de metais (AWA e HADIBARATA, 2020; NEDJIMI, 2021).

O crescimento da planta pode ser afetado quando a mesma for cultivada em locais contaminados com metais pesados devido à sua característica de fitotoxicidade, embora existam muitas plantas capazes de acumular concentrações significativamente altas de metais pesados sem apresentar qualquer sinal de toxicidade (ALI *et al.*, 2020; NEDJIMI, 2021). Entretanto, é importante ressaltar que a eficiência do processo de fitorremediação é influenciado pela concentração e pela natureza do contaminante, pelo potencial acumulador da planta, bem como pelas condições climáticas do local a ser tratado (KANWAR *et al.*, 2020). Todavia, o progresso e a inovação tecnológica na fitorremediação ainda desperta grande interesse entre os pesquisadores.

2.3.1.1 Macrófitas aquáticas

Muitas plantas possuem a capacidade de absorver metais, entre estas destacam-se as macrófitas aquáticas juntamente com seus micro-organismos rizosféricos, que têm apresentado sucesso em processos de biorremediação visando a remoção de diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos, como sais, metais, pesticidas e hidrocarbonetos de petróleo (PIO; SOUZA e SANTANA, 2013). Além disso, esse tipo de vegetação é muito importante para o funcionamento e para a conservação da biodiversidade (THOMAZ, SOUZA e BINI, 2003).

De acordo com Esteves (1998), as macrófitas são classificadas quanto ao conjunto de fatores químicos e físicos do ecossistema em que habitam (biótopo), que reflete no seu grau de adaptação ao meio aquático. A seguir, estão relacionados os principais grupos de macrófitas aquáticas quanto à sua forma de vida na água (Figura 2):

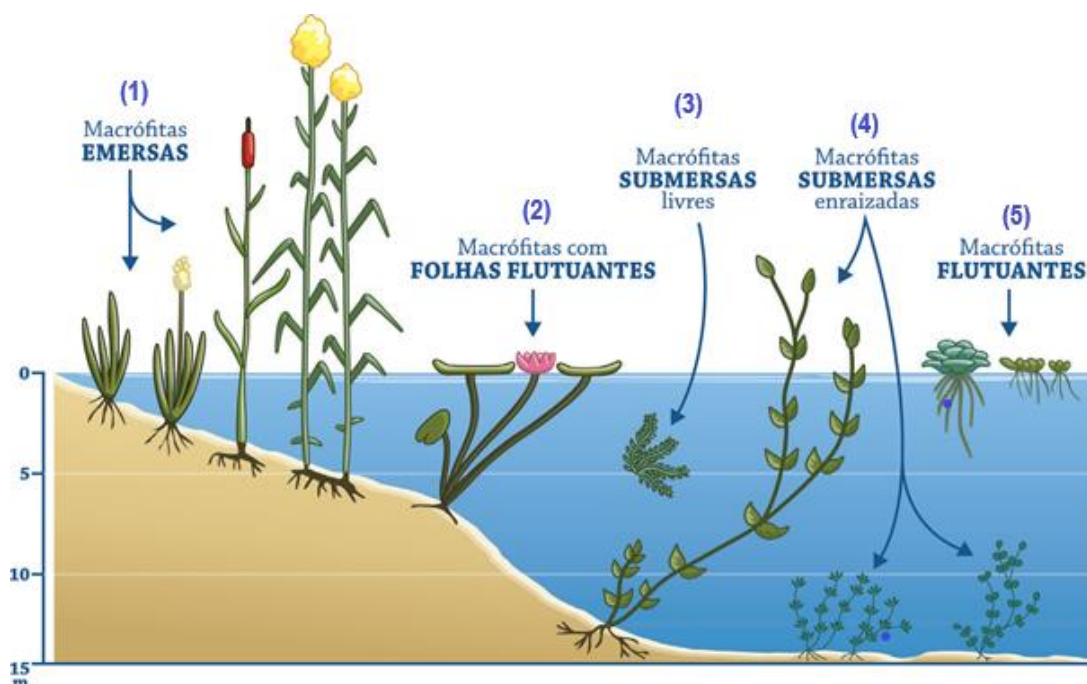


Figura 2 – Classificação das macrófitas aquáticas quanto à sua forma de vida na água.
Fonte: Adaptado de Fundação MO'Ã (2015).

- 1) Macrófitas aquáticas emersas: plantas enraizadas no sedimento e com folhas fora d'água.
- 2) Macrófitas aquáticas com folhas flutuantes: plantas enraizadas no sedimento e com folhas flutuando na superfície da água.
- 3) Macrófitas aquáticas submersas livres: possuem rizoides pouco desenvolvidos e que permanecem flutuando submersas na água em locais de pouca turbulência. Geralmente ficam presas aos pecíolos e talos das macrófitas aquáticas de folhas flutuantes e nos caules das macrófitas emersas. Durante o período reprodutivo emitem flores emersas.
- 4) Macrófitas submersas enraizadas: plantas enraizadas no sedimento, que crescem totalmente submersas na água. Podem crescer até 11m de profundidade, dependendo da disponibilidade de luz. A maioria tem seus órgãos reprodutivos flutuando na superfície ou aéreos.
- 5) Macrófitas flutuantes: plantas que flutuam na superfície da água, geralmente apresentam melhor desenvolvimento em locais protegidos pelo vento.

A importância das macrófitas aquáticas para a biorremediação é amplamente discutida na literatura devido ao potencial de hiperacumulação de diferentes metais pesados (Tabela 2).

Tabela 2 – Diferentes estudos que relatam o potencial de aplicação de macrófitas aquáticas para remediação de metais pesados por meio de técnicas de fitorremediação.

Espécie	Elemento	Referência
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cr	Saha <i>et al.</i> (2016)
<i>Eleocharis acicularis</i>	Cu, Zn, As, Pb, Cd, Cs e Hg	Sakakibara (2016)
<i>Vossia cuspidata</i>	Al, Cu, Fe e Ni	Galal <i>et al.</i> (2017)
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cr e Cu	Tabinda <i>et al.</i> (2018)
<i>Pistia stratiotes</i>	Cd e Zn	Sricoth <i>et al.</i> (2018)
<i>Nymphaea tetragona</i>	U	Li <i>et al.</i> (2019)
<i>Phragmites australis</i>	Cd, Zn e Pb	Al-Homaidan <i>et al.</i> (2020)
<i>Ludwigia stolonifera</i>	Al, Cu, Fe, Mn, Ni, Cd, Zn, Cr e Pb	Galal <i>et al.</i> (2020)
<i>Pontederia cordata</i>	Cd	Xin <i>et al.</i> (2020)
<i>Ipomoea aquatica</i>	Cr e Mn	Haokip e Gupta (2021)

As espécies vegetais utilizadas para fitorremediação devem ser possivelmente nativas, possuir uma rápida taxa de crescimento, sistema radicular extenso, alto rendimento de biomassa, capacidade de adaptação a vários *habitats*, alta tolerância e capacidade de acumular poluentes nas partes aéreas (REZANIA *et al.*, 2016). Os fatores ambientais como temperatura, pH, radiação solar e salinidade da água podem influenciar o desempenho e o crescimento da planta. Nesse sentido, as macrófitas aquáticas se destacam por apresentar características como fácil cultivo e alta taxa de crescimento, além da diversidade biológica presente na rizosfera dessas plantas que promove várias reações químicas e biológicas capazes de realizar a purificação de águas contaminadas (HADAD, MAINE e BONETTO, 2006).

2.3.2 Mecanismos microbiológicos de resistência ao cromo

A remediação microbiana é definida como um processo no qual os micro-organismos são estimulados a degradar ou reduzir as concentrações de contaminantes perigosos no ambiente a níveis seguros (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018). O estudo dos mecanismos de interação entre os micro-organismos e os metais tóxicos são fundamentais para a área da biotecnologia.

Existem micro-organismos que desenvolvem mecanismos de resistência como a excreção de substâncias que provocam a precipitação dos metais sob uma forma insolúvel (biomineralização); outros internalizam os íons metálicos por meio de processos de transporte ativo (bioacumulação ou bioissorção); outros ainda adsorvem passivamente os íons metálicos sobre a superfície celular (adssorção) (DA SILVA e DE SOUZA, 2017). No caso do Cr, alguns micro-organismos também podem desenvolver um mecanismo conhecido como biotransformação, que consiste na

alteração do estado oxidativo do metal, por meio da redução biológica (biorredução) do Cr(VI), uma espécie mais tóxica, móvel e solúvel, para uma forma menos móvel e insolúvel que é o Cr(III) (MOHAMED *et al.*, 2020).

Concentrações elevadas de metais pesados e outros compostos tóxicos ocasionam em um desequilíbrio na população de micro-organismos e plantas presentes no ambiente, exercendo uma pressão de seleção sobre os mais resistentes. Segundo Da Silva e De Souza (2017), a absorção/adsorção dos íons metálicos pelas células microbianas ocasiona a homeostase celular e/ou o desenvolvimento de mecanismos de resistência que visam a sua proteção contra a toxicidade destes elementos.

Nesse sentido, os processos biológicos de descontaminação podem utilizar micro-organismos autóctones (encontrados no próprio ambiente) (GAYLARD; BELLINASSO e MANFIO, 2005), visto que a presença dos íons metálicos permite a seleção de micro-organismos resistentes ou proporciona até mesmo o aprimoramento do desenvolvimento de mecanismos de resistências em relação aos íons (ANDREAZZA *et al.*, 2010b; CHEN *et al.*, 2005). O potencial de adaptação e de crescimento de micro-organismos resistentes a metais pesados mostra que processos biotecnológicos de remoção são uma alternativa viável, sustentável e de menor impacto para o ambiente (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018), pois muitos isolados apresentam a capacidade de remover Cr por mecanismos biológicos (BANSAL, COETZEE e CHIRWA, 2019).

Fungos, bactérias e algas, apresentam a capacidade de remover íons metálicos do ambiente por meio de mecanismos que podem variar amplamente, de acordo com a espécie microbiana ou até mesmo com a linhagem. De outro modo, células, produtos excretados, parede celular e polissacarídeos também possuem potencial para remoção metais de soluções (LEMOS *et al.*, 2008).

O grau de eficiência da bioabsorção/bioacumulação de íons de metais pesados pelas células bacterianas depende de vários fatores externos, tais como pH, tempo de contato, temperatura, espécie metálica, concentração de biomassa e de íons metálicos, natureza do ambiente aquoso, ausência ou presença de nutrientes e de outros metais, os quais influenciam no mecanismo de atuação (COTORAS *et al.*, 1992; PINO e TOREM, 2011; ARYAL e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2014).

2.3.2.1 Bioacumulação de cromo

A bioacumulação é a capacidade da biomassa de incorporar metais ativamente dentro de suas células em uma solução aquosa (CHEUNG e GU, 2007; RAMAN *et al.*, 2017). Esse mecanismo é dependente do metabolismo, ocorre apenas em células vivas e requer energia para o transporte do metal por meio da membrana no interior das células. Além disso, é diretamente afetado pelo tempo de exposição e pela concentração do metal, portanto, sua principal limitação é a inibição do crescimento celular quando exposto em concentrações elevadas (SRINATH *et al.*, 2002; BAJGAI, GEORGIEVA e LAZAROVA, 2012; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

A bioacumulação inclui todos os processos responsáveis pela absorção de íons metálicos disponíveis pelas células vivas, incluindo a bioissorção, juntamente com acumulação intracelular e mecanismos de precipitação (SHAO *et al.*, 2019). A bioacumulação é uma alternativa que tem atraído grande interesse da comunidade científica nos últimos tempos, uma vez que estudos aplicando fungos, bactérias e microalgas como material biológico tem apresentado sucesso como agentes adsorventes para a remoção de metais pesados (CHOJNACKA, 2007).

2.3.2.2 Bioissorção de cromo

A bioissorção é um mecanismo de resistência desenvolvido pelos micro-organismos, que consiste em um processo físico-químico rápido, passivo e reversível entre a espécie metálica (sorbato) e o material biológico (bioissorvente), independente de energia metabólica, logo, pode ser utilizada biomassa viva ou inativa (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018). A adsorção ocorre principalmente pela atração eletrostática de grupos funcionais de cargas opostas na superfície de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e nas paredes celulares (SHAO *et al.*, 2019).

A bioissorção empregando micro-organismos é uma alternativa muito promissora e em expansão. A aplicação de células vivas possibilita uma variedade de mecanismos envolvidos na bioissorção, entre eles destacam-se o transporte, a formação de complexos extracelulares e a precipitação (SRINATH *et al.*, 2002; COSTA SÁ e ORLANDA, 2015). A parede celular microbiana fornece integridade estrutural e grupos funcionais (tais como carboxilato, hidroxil, amino e fosfato) que podem ligar-se a íons de metais pesados (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

A bioissorção empregando a biomassa bacteriana como agente biológico tem atraído atenção por tratar-se de uma tecnologia alternativa eficaz na remoção de

metais em soluções aquosas e por apresentar vantagem em relação ao custo-benefício (EL HASSOUNI *et al.*, 2014).

2.3.2.3 Biotransformação de cromo

A presença de micro-organismos resistentes a Cr(VI) tem sido amplamente estudada em razão do potencial de alguns gêneros de realizar a redução biológica à Cr(III), que ocorre diretamente como resultado do metabolismo microbiano e atividade da enzima “*cromato redutase*”. A redução biológica à Cr(III) pode ocorrer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, como também pode ocorrer de forma não enzimática por aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos, glutatona e por produtos metabólicos de processos anaeróbios de bactérias redutoras de ferro e sulfato (Fe(II) e H₂S) (CHEUNG e GU, 2007; COETZEE, BANSAL e CHIRWA, 2018; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

Uma forma de biotransformação é a precipitação, que ocorre pela interação entre metais e metabólitos presentes, resultando por exemplo na precipitação de Cr(VI) por sulfeto (SHAO *et al.*, 2019).

2.4 Descrição da área de estudo

A área de estudo escolhida localiza-se às margens da Avenida Presidente João Goulart do canal Santa Bárbara (Figura 3), situado no município de Pelotas, no Rio Grande do Sul. O local está situado numa área com altitude média de sete metros em relação ao nível do mar e posição geográfica de 31°45'43" de latitude sul e 52°21'00" de longitude oeste, sendo o principal responsável pelo escoamento hídrico da bacia hidrográfica do Santa Bárbara (SIMON, 2007).

De acordo com Demarco *et al.* (2018), o Canal Santa Bárbara apresenta uma condição de degradação da qualidade da água devido às diversas atividades urbanas e rurais e à falta de planejamento na ocupação do solo. Outras atividades que afetam a área são a ocupação de moradias e o esgoto não tratado lançado de fontes domésticas e industriais, além de poluentes atmosféricos.

Diante da condição de degradação do Canal Santa Bárbara, Demarco *et al.* (2018) realizaram um estudo de caracterização da qualidade da água, no qual foi constatado a concentração de 4,61mgL⁻¹ de Cr, além de demais teores excedentes de metais pesados e nutrientes que ultrapassam o limite estabelecido pela legislação CONAMA n° 357/2005 (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração de elementos (média $\pm$ desvio padrão) nas águas do canal Santa Bárbara, Rio grande do Sul (mg L⁻¹).

Elemento	Canal Santa Bárbara (média $\pm$ SD)	Valor de referência*
N	10,44 $\pm$ 5,47	2,18
P	1,00 $\pm$ 0,75	0,025
K	19,97 $\pm$ 3,00	-
Ca	78,13 $\pm$ 19,97	-
Mg	23,52 $\pm$ 10,04	-
S	7,91 $\pm$ 1,47	0,002
Cu	0,28 $\pm$ 0,08	0,009
Zn	1,74 $\pm$ 0,32	0,18
Fe	23,14 $\pm$ 2,24	0,3
Mn	0,56 $\pm$ 0,10	0,1
Na	69,13 $\pm$ 10,29	-
Cd	0,022 $\pm$ 0,02	0,001
Cr	4,61 $\pm$ 0,23	0,05
Ni	1,87 $\pm$ 0,08	0,025
Pb	0,18 $\pm$ 0,11	0,01
Al	19,20 $\pm$ 6,26	0,1
As	0,021 $\pm$ 0,03	0,01
Se	0,03 $\pm$ 0,05	0,01
Co	0,00 $\pm$ 0,00	0,05
V	0,023 $\pm$ 0,01	0,1

*Valores de referência conforme estabelecido pela Resolução CONAMA n° 357/2005 (Classe II para Águas Doces).

Fonte: DEMARCO *et al.* (2018).

A bacia hidrográfica do Arroio Santa Bárbara encontra-se na porção sudoeste do município e ocupa uma área de aproximadamente 83km², faz parte do conjunto de bacias do sistema lagunar Patos Mirim, desaguando no Canal São Gonçalo (SIMON e CUNHA, 2008).



Figura 3 – Imagem ilustrativa do Canal Santa Bárbara de Pelotas, bairro Fragata, Rio Grande do Sul.

Fonte: PAZ, 2018.

Segundo Simon e Cunha (2008), a cobertura vegetal é resultante da localização da bacia em uma área de transição entre a serra e o litoral, onde é possível encontrar áreas de banhado, campos, pastagens, além da mata subtropical arbustiva. Entretanto, atualmente a área apresenta uma configuração espacial que evidencia a ocorrência de um intenso processo de apropriação de recursos naturais decorrentes das atividades agrícolas e urbano-industriais (SIMON e CUNHA, 2008).

3 Materiais e métodos

3.1 Preparo dos meios de cultura, tampões e soluções

Todos os procedimentos de segurança química e biológica em laboratório foram tomados, levando em consideração as medidas preventivas durante o preparo, execução e descarte de material utilizado nos ensaios.

Os meios de cultura, tampões e soluções foram preparados com água destilada estéril. O material utilizado no preparo e no armazenamento foi previamente esterilizado. Após o preparo, todos os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. As vidrarias e demais materiais utilizados nos experimentos foram limpos com água, sabão neutro e solução de lavagem de Cr. A solução de lavagem de Cr foi preparada na proporção de 1:2:9 partes de HNO₃, H₂SO₄ e água destilada, respectivamente. O material utilizado foi colocado de molho por 4 horas e por fim enxaguado com água destilada.

A solução estoque de 1000mg L⁻¹ de Cr(VI) foi preparada através da dissolução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em água destilada. As concentrações utilizadas no estudo foram preparadas por meio da diluição adequada da solução estoque.



Figura 4 – Solução estoque de 1000mg L⁻¹ de Cr(VI) utilizada para suplementação dos meios de cultivo.

O isolado obtido foi armazenado à 4°C em placas de Petri contendo ágar nutriente suplementado com 50mg L⁻¹ de Cr(VI). Nos testes de biorremediação, o isolado foi cultivado em tubos de ensaio contendo 10mL de caldo nutriente suplementado com

50mg L⁻¹ de Cr(VI). Foram definidas como condições ambientais pH 7,0 e temperatura de incubação de 30°C. O pH do meio foi ajustado com a adição de 1M NaOH e 1M HCl.

3.2 Coleta da macrófita

A coleta da planta ocorreu em região contaminada com Cr (DEMARCO, 2018), onde foram coletadas partes da rizosfera da macrófita *Hymenachne grumosa* (Figura 5), que se encontrava nas margens do canal Santa Bárbara, localizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, sob a posição geográfica de 31°45'43" de latitude sul e 52°21'00" de longitude oeste. As amostras da coleta foram armazenadas em frascos estéreis e encaminhadas para o Laboratório de Química Ambiental (LQA) do Centro de Engenharias, Campus Cotada, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas-RS.

O local de estudo foi escolhido por ser um importante canal de drenagem do município e um ambiente aquático próximo à área urbana que apresenta condições de degradação da qualidade da água pela contaminação por metais pesados e outros poluentes orgânicos oriundos de fontes antropogênicas. A planta foi escolhida devido à presença predominante da macrófita aquática *H. grumosa*, a qual caracteriza peculiarmente esta área e se distribui ao longo das margens do canal, formando grandes estandes de vegetação (Figura 5).



Figura 5 – Imagem ilustrativa do local da coleta. À esquerda, imagem do Canal Santa Bárbara, local da referida coleta das macrófitas, localizado em Pelotas, Rio grande do Sul. À direita, imagem da macrófita *Hymenachne grumosa*, no local da coleta das amostras.

3.2.1 *Hymenachne grumosa*

A macrófita aquática coletada *H. grumosa* (Figura 6) foi identificada no estudo de Demarco (2016) pelo Departamento de Botânica do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, seguindo a metodologia de Irgand e Gastal (1996) e Pott e Pott (2000).

A planta é uma angiosperma pertencente ao reino *Plantae*, da família *Poaceae*, do gênero *Hymenachne* da espécie *Hymenachne grumosa*. No Brasil, a sua distribuição geográfica ocorre na região Nordeste (Bahia e Pernambuco), Centro Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (REFLORA, 2019).



Figura 6 – Imagem ilustrativa da macrófita aquática *Hymenachne grumosa*.

3.3 Isolamento e conservação do isolado

Foi realizado um corte de 3 a 5cm da raiz da *H. grumosa* com lâmina estéril. A raiz foi lavada com água destilada estéril para retirada de sedimentos. Após a higienização, 1g da raiz foi disposta em solução salina estéril (NaCl 0,85%) na proporção de 100mL de solução para 1g de raiz, em agitador magnético por 30 minutos. Em seguida, 100μL de cada solução foi diluído em série até 10^{-5} . Para cada diluição, retiraram-se alíquotas de 100μL que foram semeadas em placas de Petri contendo ágar nutriente suplementado com 50mg L⁻¹ de Cr(III), para o isolamento de micro-organismos resistentes (Figura 7). Por fim, as placas de Petri foram incubadas em estufa a 30°C durante 24 horas.

As bactérias isoladas foram crescidas e mantidas em placas contendo ágar nutriente suplementado com 50mg L⁻¹ de Cr(III) a 30°C por 24 horas. Ao término deste, a biomassa foi recolhida com o auxílio de uma alça estéril e transferida para meio

líquido contendo caldo nutriente, 50mg L⁻¹ de Cr e glicerol a uma concentração de 90%. Foram feitos estoques em micro tubos de 1,5mL contendo 1mL da suspensão e armazenados a -20°C.

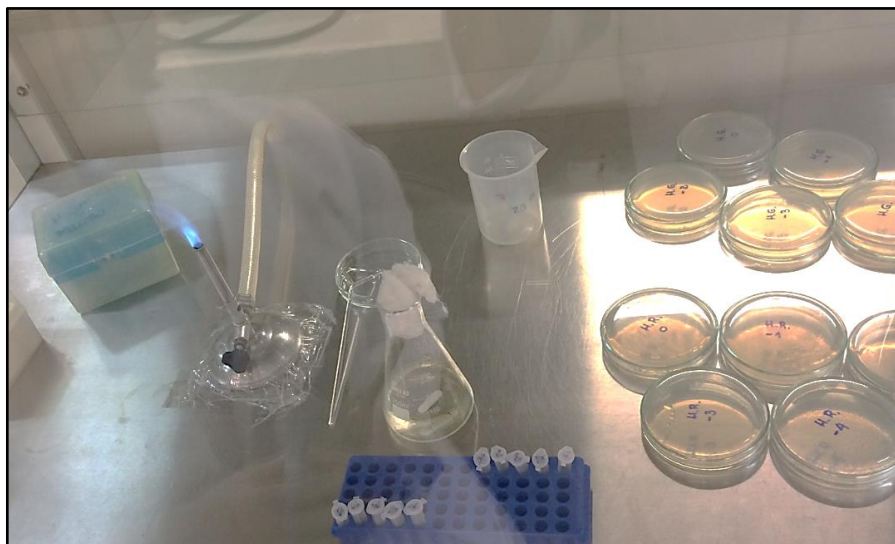


Figura 7 – Imagem ilustrativa do procedimento de isolamento de micro-organismos da rizosfera da *Hymenachne grumosa*.

O isolado inicialmente nomeado como HG8 foi escolhido como micro-organismo alvo deste estudo, uma vez que em estudos realizados anteriormente por Bunde (2019), destacou-se entre os 10 isolados obtidos, por demonstrar maior resistência e capacidade de biorremediação de Cr(III) nos ensaios realizados. Por esse motivo, o isolado foi selecionado para dar seguimento com o presente estudo visando avaliar seu comportamento em relação ao Cr(VI).

O isolado bacteriano foi recuperado da coleção de micro-organismos do Laboratório LQA da UFPEL. Esse micro-organismo foi previamente isolado conforme os métodos descritos anteriormente da rizosfera da macrófita *H. grumosa* em 2019, coletada no canal Santa Bárbara, localizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, sob a posição geográfica de 31°45'43" de latitude sul e 52°21'00" de longitude oeste (BUNDE, 2019). A coleta da macrófita e o isolamento do micro-organismo foi realizado pelo grupo de pesquisadores do projeto "Fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por atividades antrópicas em Pelotas/RS", coordenado pelo Prof. Dr. Robson Andreazza (Centro de Engenharias – UFPEL).

3.4 Identificação molecular do isolado

A identificação molecular do isolado estudado foi realizada pelo Laboratório de

Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia, da Universidade de Caxias do Sul (UCS), de acordo com os protocolos descritos a seguir, padronizados pelo próprio laboratório.

3.4.1 Extração do DNA

O micro-organismo foi crescido *overnight* em meio Luria Bertani (LB) (HiMedia) em agitação a 140rpm à 37°C. A extração do DNA foi realizada com *HiMedia HiPura™ Bacterial genomic DNA Purification Kit®* (HiMedia Laboratories), seguindo o protocolo do fabricante.

3.4.2 Amplificação do DNA

A amplificação dos genes 16S rRNA foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega), utilizando os oligonucleotídeos universais 11F (5'-GTTTGATCCTGGCT-3') (KANE *et al.*, 1993) e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (LIN e STAHL, 1995), de acordo com a seguinte reação: 1µL de cada oligonucleotídeo, 10µL do Master Mix, 7µL de água Milli-Q e 1µL do DNA extraído, totalizando 20µL. Todas as amplificações foram acompanhadas por controle negativo, isto é, sem DNA.

A reação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems*), seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão por 1 minuto e extensão final, a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose (1,5%) e eletroforese (80 volts). A visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta (UV) (*Vilber Lourmat*) após coloração com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)*.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando 0,25µL da enzima Exonuclease I (*Amershan Bioscience* 2500U), 0,25µL da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase (Amershan Bioscience* 5000U), 0,50µL de água Milli-Q e 6,0µL do produto amplificado. A reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos e após a 80°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

Após a purificação, os produtos foram submetidos ao sequenciamento genético utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* equipado com capilares de 50cm e polímero POP7 (*Applied Biosystems*). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5pmol do oligonucleotídeo específico e 0,5µL do kit *Big Dye*

Terminator Cycle Sequencing Kit[®] (*Applied Biosystems*) de acordo com instruções do fabricante.

Os dados do sequenciamento foram coletados e os arquivos FASTA obtidos foram alinhados e a identificação do isolado foi realizada pela comparação das sequências de DNA com as sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST (BLASTn) (EDGAR, 2010).

3.5 Fatores que afetam a biorremediação de Cr(VI)

As condições ótimas de cultivo do isolado foram determinadas a fim de maximizar sua capacidade de remoção. Os experimentos foram realizados conforme descrito: o meio (caldo nutriente) foi suplementado com uma concentração de 50mg L⁻¹ de Cr(VI) e as seguintes condições foram testadas:

(a) pH: 4,0 a 9,0;

(b) Temperatura: 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata com o período de incubação de 48 horas. Após este período, foi testada a remoção de Cr(VI), conforme o método descrito no item 3.7.

3.6 Resistência ao Cr(VI)

A concentração inibitória mínima do crescimento (CIM) de Cr(VI) em que não ocorre o crescimento de colônias foi determinada em triplicata em caldo nutriente suplementado com uma série de concentrações de Cr(VI). Uma alçada da cultura bacteriana fresca foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10mL de caldo nutriente suplementado com concentrações de 0 (controle), 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600mg L⁻¹ de Cr(VI) (pré-inóculo). Os valores das concentrações testadas foram definidos baseando-se na aproximação das condições de efluentes industriais não tratados contendo Cr, seguindo um incremento gradual na concentração de Cr(VI) no meio de cultivo. Então, 100μL do inóculo foi depositado nos tubos com diferentes concentrações de Cr. As culturas foram incubadas a 30°C. O desenvolvimento bacteriano foi verificado através da absorbância a 600nm (OD_{600nm}) a cada 24 horas, totalizando o tempo de incubação de 72 horas. A viabilidade celular foi monitorada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). A CIM foi considerada como a menor concentração de Cr(VI) que inibiu completamente o

crescimento bacteriano.

3.7 Biorremoção de Cr(VI)

Para avaliar o potencial de biorremoção de Cr(VI), o isolado foi cultivado em tubos de ensaio com 10mL caldo nutriente por 24 horas à 30°C. Depois, 100µL foram inoculados em meio suplementado 50, 100, 200 e 300mg L⁻¹ de Cr(VI). Foi preparado um meio inoculado sem Cr(VI) e utilizado como controle. As amostras foram coletadas assepticamente em intervalos de 24, 48 e 72 horas. A densidade celular foi mensurada a 600nm utilizando espectrofotômetro UV-VIS. Após a absorção do metal, a viabilidade celular foi monitorada por meio da contagem das UFC em placas contendo ágar nutriente incubadas à 30°C por 24 horas.

Uma alíquota de 1mL da suspensão celular foi coletada e transferida para microtubos previamente esterilizados. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10min para a separação da biomassa e coleta do sobrenadante. A capacidade de remoção de Cr(VI) foi determinada por meio do cálculo da concentração de Cr(VI) e Cr total no sobrenadante por meio de uma curva padrão preparada previamente para cada análise. A determinação de Cr(VI) foi realizada conforme o método colorimétrico 3500-Cr B, considerando a reação em meio ácido com 1,5-difenilcarbazida de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23RD* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION e WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2017). A concentração de Cr total foi analisada por espectrometria de absorção atômica (*Atomic absorption spectrometer – AAS*). A capacidade de remoção de Cr (%) foi calculada utilizando a equação 2:

$$\text{Capacidade de remoção de Cr (\%)} = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C₀ = concentração inicial do meio de cultivo (mg L⁻¹);

C_f = concentração residual do sobrenadante (mg L⁻¹);

3.8 Estresse oxidativo

3.8.1 Preparo do extrato extracelular (bruto)

O isolado foi inoculado em 10mL em caldo nutriente, pH 7,0, e incubado a 30°C

por 48 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 3500 x *g* por 15min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril para posterior utilização e a biomassa resultante utilizada conforme descrito a seguir no item 3.8.2.

3.8.2 Preparo do extrato intracelular

As células obtidas conforme descrito no item 3.8.1 foram lavadas duas vezes com buffer 50mM TRIS-HCl, pH 7,5, contendo 3mM MgCl₂ (cloreto de magnésio) e 1mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Em seguida, as células foram ressuspendidas em 3mL da solução e submetidas ao rompimento celular (*lise*) durante 1 minuto em agitador vórtex contendo 1g de microesferas de vidro estéreis, seguido de uma pausa de 30 s em banho de gelo (SHAO *et al.*, 2019). Por fim, os detritos celulares e as microesferas de vidro foram removidos por centrifugação e o extrato intracelular foi transferido para um novo tubo estéril para posterior determinação das atividades enzimáticas e de peroxidação lipídica.

Ambos os extratos (bruto e intracelular) foram congelados a -20°C para posterior utilização nas análises dos biomarcadores, exceto para a análise de TBARS em que as amostras foram utilizadas imediatamente após o preparo.

3.8.3 Ensaio de enzimas antioxidantes

3.8.3.1 Quantificação de proteínas totais

As proteínas do isolado foram quantificadas pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951) com modificações, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg mL⁻¹. A medida da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro UV-VIS a 750nm (luz visível) e os resultados foram expressos em mg mL⁻¹. A concentração de proteínas totais foi calculada por meio de uma curva padrão preparada conforme o procedimento descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Procedimento de preparação da curva padrão de albumina para quantificação de proteínas totais.

Tubos	Proteínas (mg)	Volume Padrão albumina (µL)	Água Mili-Q (µL)	Reagente de Lowry (µL)	Reagente de Folin (µL)
Branco	0	0	1200	1200	600
1	10	30	1170	1200	600
2	15	45	1155	1200	600
3	20	60	1140	1200	600
4	30	90	1110	1200	600
5	40	120	1080	1200	600

3.8.3.2 Superóxido dismutase

A SOD foi estimada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Em um tubo estéril foi adicionado 3mL de mistura de reação (63µM de azul de nitrotetrazólio, 1,3mM de riboflavina, 13mM de metionina, 0,1mM de EDTA, 50mM de Tris-HCl (pH 8,0)) e 50µL de extrato enzimático. A mistura foi mantida durante 20min, a 10cm da fonte luminosa (lâmpada fluorescente – 25 Watts). No ensaio, uma unidade enzimática (U) da atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução de NBT. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560nm e a atividade da SOD expressa em mmol de SOD por mg de proteína.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi aplicada a seguinte equação:

$$AT\ SOD\ (mmol\ SOD\ mg^{-1}\ proteína) = \frac{\%inibição}{U_{SOD}(50\%)} \times \frac{V_a}{V_e} \times \frac{1}{proteínas} \times 1000 \quad (3)$$

Sendo:

$$\% Inibição = \left(\frac{Absorbância\ do\ branco - absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ do\ branco} \right) \times 100;$$

U_{SOD} = quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT;

V_e = volume da solução de enzima utilizada no ensaio (µL);

V_a = Volume da amostra (µL).

$Proteínas$ = quantidade de proteínas medida no extrato (mg).

3.8.3.3 Catalase

A atividade da CAT foi determinada a 25°C conforme Aebi (1984). Foi preparada uma mistura de 2,5mL de tampão fosfato 50mM (pH 7,0) com 0,2mL de peróxido de hidrogênio (1%) e 0,3mL de extrato enzimático. A quantificação da atividade enzimática foi determinada por meio do monitoramento da redução da absorbância de H₂O₂ a 240nm no intervalo de 1 minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 0,0436mM⁻¹ cm⁻¹. Uma unidade de CAT foi expressa como nmol de CAT por mg de proteína.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi aplicada a seguinte equação:

$$AT\ CAT\ (nmol\ CAT\ mg^{-1}\ proteína) = \frac{(A - \Delta t)}{\epsilon} \times \frac{V_a}{V_e} \times \frac{1}{proteínas} \times 1000 \quad (4)$$

Sendo:

Δt = variação da absorbância ao longo do tempo;

A = Absorbância do branco;

ϵ = Coeficiente de extinção molar da enzima ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

V_e = volume da solução de enzima utilizada no ensaio (μL);

V_a = Volume da amostra (μL).

Proteínas = quantidade de proteínas medida no extrato (mg).

3.8.3.4 Guaiacol peroxidase

A peroxidase (GPx) foi avaliada pelo método descrito por Upadhyaya *et al.* (1985). Foi preparada uma mistura contendo 1mL de H_2O_2 a 1%, 2,5mL de tampão fosfato 50mM (pH 6,1), 20 μL de extrato enzimático e 1mL de guaiacol a 1%. A mistura foi incubada por 5 minutos a 25°C e a taxa de oxidação do guaiacol registrada a 420nm em um intervalo de 1 minuto. A atividade enzimática foi quantificada pela quantidade de tetraguaiacol formado utilizando o coeficiente de extinção molar de $26,6\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Uma unidade de GPx foi expressa como nmol de GPx por mg de proteína.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi aplicada a seguinte equação:

$$AT \text{ GPx } (\text{nmol GPx mg}^{-1} \text{ proteínas}) = \frac{(A - \Delta t)}{\epsilon} \times \frac{V_a}{V_e} \times \frac{1}{\text{proteínas}} \times 1000 \quad (5)$$

Sendo:

Δt = variação da absorbância ao longo do tempo;

A = Absorbância do branco;

ϵ = Coeficiente de extinção molar da enzima ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

V_e = volume da solução de enzima utilizada no ensaio (μL);

V_a = Volume da amostra (μL).

Proteínas = quantidade de proteínas medida no extrato (mg).

3.8.4 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação da produção de malondialdeído (MDA), metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), conforme Ohkawa *et al.* (1979), com modificações. Para este ensaio, foi adicionado 0,5mL do extrato (bruto ou intracelular), 0,2mL de lauril sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 1mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1mL de solução aquosa de TBA 0,67% em um tubo de reação. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C por 1 hora, e,

após esse período foram colocados em banho de gelo por 10 minutos. Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532nm em espectrofotômetro UV-VIS. A concentração de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi calculada por meio de uma curva padrão, com concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, composta por concentrações de água destilada, MDA 0,03mM, SDS 8,1%, tampão de ácido acético pH 3,44 e TBA 0,6%, e incubados em banho maria à 100°C, por 1 hora. O resultado foi expresso em nmol de MDA por mg de proteína.

3.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e os dados obtidos foram analisados utilizando o software *Statistica* versão 10.0. A Figura 8 demonstra a sequência de etapas adotadas para a definição do método mais adequado para análise de variância em função da natureza dos dados. Inicialmente os dados foram padronizados e aplicou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal, testou-se sua homogeneidade através do teste de *Levene*. Os dados homogêneos com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de *Tukey* para comparação das médias. Dados não homogêneos e/ou que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de análise de variância não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do Teste de *Duncan* para comparação múltipla das médias. Valores de probabilidade inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

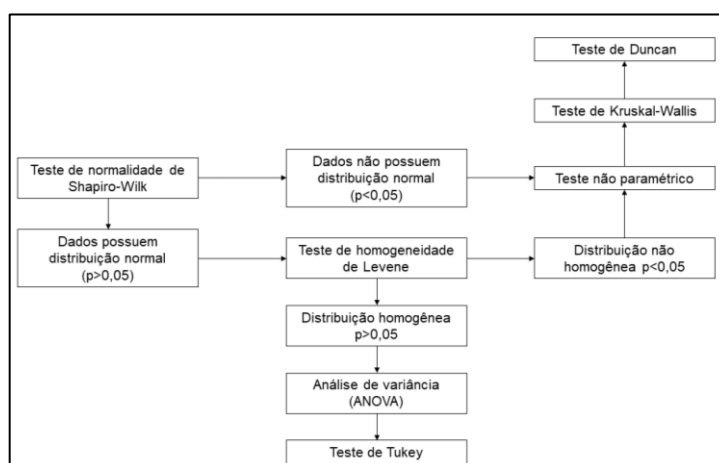


Figura 8 – Esquema representativo das etapas adotadas para a definição do método de análise de variância.

4 Resultados e discussão

4.1 Identificação do isolado resistente a Cr(VI)

A identificação do micro-organismo isolado foi realizada comparando sua sequência de DNA obtida com as sequências depositadas no GenBank (NCBI). O resultado da análise de identificação revelou que o isolado apresentou 99,88% de similaridade com *Exiguobacterium indicum*, nomeado de *E. indicum* HG8 (Figura 9) o qual foi depositado no NCBI sob o número de acesso KY439921.1.



Figura 9 – Imagem ilustrativa do isolado *Exiguobacterium indicum* cultivado em meio ágar nutriente suplementado com 50mg L⁻¹ de cromo hexavalente (Cr(VI)).

A árvore filogenética (Figura 10) baseada em genes 16S rRNA foi construída com nove cepas no total, das quais pelo menos quatro (*Exiguobacterium acetylicum* JHCD (PARK e CHON, 2016), *Exiguobacterium mexicanum* CWB-54 (DAS *et al.*, 2021), *Exiguobacterium* sp. As-9 (TANG *et al.*, 2015) e *Exiguobacterium indicum* B3 (MOHAPATRA *et al.*, 2017)) foram reconhecidas como acumuladoras de metais pesados.

O histórico evolutivo de *E. indicum* HG8 foi inferido usando o método Neighbor-Joining (SAITOU E NEI, 1987). A árvore de consenso *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) apresentada na Figura 10 é utilizada para representar o histórico evolucionário do táxon analisado. Ramificações correspondentes a partições reproduzidas em menos de 50% das replicatas *bootstrap* são colapsadas. As porcentagens de árvores replicadas nas quais os táxons associados agruparam-se conjuntamente no teste de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostradas ao lado das ramificações. As distâncias evolucionárias foram calculadas usando o método p-distance (NEI e KUMAR, 2000) e estão na unidade do número de bases diferentes por *locus*. Esta análise envolveu

nove sequências de nucleotídeos. As posições de códons incluídos foram 1^a+2^a+3^a+não codificante. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção de exclusão de pares). No conjunto final de dados havia um total de 1552 posições. As análises evolutivas foram operadas no Software MEGA versão 11 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021).

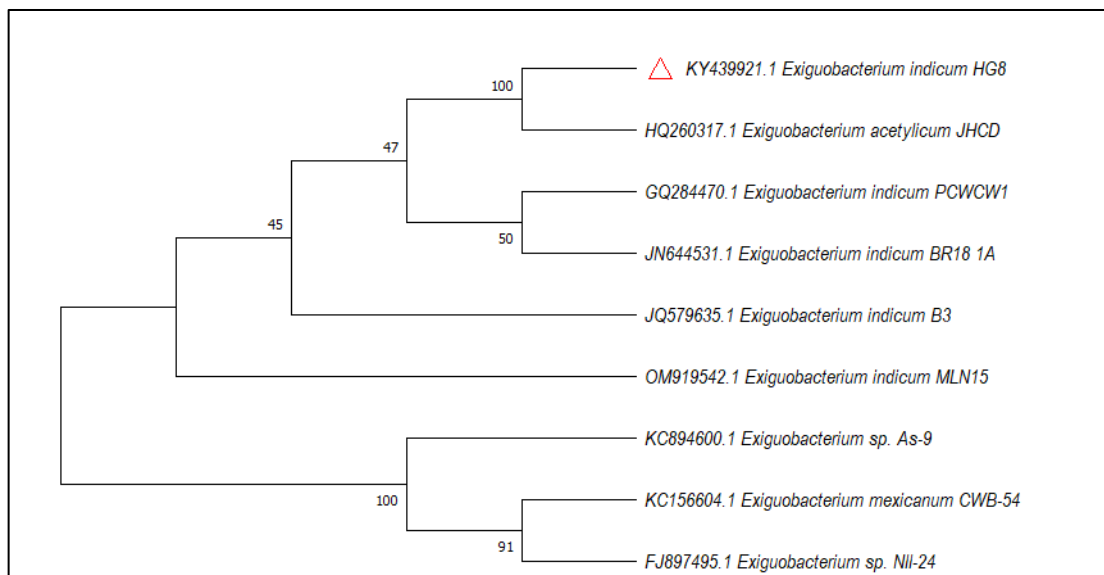


Figura 10 – Árvore inferida pelo método Neighbor-Joining baseada nas sequências do gene 16S rRNA indicando a posição filogenética de *Exiguobacterium indicum* HG8 (Δ). A identificação dos micro-organismos é precedida pelo número de acesso das sequências extraídas do GenBank.

4.1.1 Gênero *Exiguobacterium*

O gênero *Exiguobacterium* foi identificado por Collins *et al.* (1983) ao realizar a caracterização da espécie *Exiguobacterium aurantiacum*. Ao isolar bactérias de efluente de processamento de batata, Collins *et al.* (1983) definiram que o gênero *Exiguobacterium* era caracterizado por bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, facultativamente anaeróbicas e alcalifílicas.

O gênero *Exiguobacterium* compreende espécies e cepas psicrotróficas, mesofílicas e moderadamente termofílicas, com ampla diversidade morfológica (ovóide, bastonetes, bastonetes duplos e cadeias) dependendo da espécie, estirpe e condições ambientais (VISHNIVETSKAYA; KATHARIOU; TIEDJE, 2009). As espécies do gênero *Exiguobacterium* são catalase positivo e oxidase negativo, apresentam colônias convexas, pigmentadas em tons variados de laranja (COLLINS *et al.*, 1983). Diversas espécies do gênero foram relatadas por sobreviver em ambientes extremos, apresentando características particulares que as tornam ambientalmente robustas e versáteis. Algumas cepas são halotolerantes (13% NaCl),

suportam uma extensa faixa de temperaturas (12 a 55°C), podem crescer dentro de uma ampla faixa de valores de pH (5,0 a 11,0), além de que podem tolerar altos níveis de radiação UV e estresse por metais pesados (VISHNIVETSKAYA; KATHARIOU; TIEDJE, 2009).

Desde então, cepas pertencentes a *Exiguobacterium* foram isoladas de uma grande variedade de amostras ambientais, como solos, sedimentos, água do mar, *permafrost*, geleiras, efluentes industriais e fontes hidrotermais (RODRIGUES *et al.*, 2006). Assim, os membros do gênero *Exiguobacterium* possuem propriedades únicas de interesse para aplicações em biotecnologia, biorremediação, indústria e agricultura (KASANA e PANDEY, 2018). O gênero tem sido amplamente estudado sobre a aplicação na biorremediação de pesticidas (LÓPEZ *et al.*, 2003; ABDI *et al.*, 2019) e metais, como o Cr e o arsênio (OKEKE, 2008; PANDEY e BHATT, 2016; MOHAPATRA *et al.*, 2017), na degradação de compostos complexos (ARORA e BAE, 2015; CHAUHAN *et al.*, 2018), remoção de nitrogênio em águas residuais salinas (CUI *et al.*, 2021), entre outras aplicações, como a produção de enzimas (KASANA e PANDEY, 2018).

Recentemente, *Exiguobacterium mexicanum* foi isolada de um solo de mineração de cromita e apresentou resistência até 900mg L⁻¹ ao Cr(VI). No estudo, observou-se que o isolado possui alto potencial de redução de Cr(VI) (DAS *et al.*, 2021). Park e Chon (2016) investigaram as condições ideais de cultivo de *Exiguobacterium sp.* e observaram que conforme o crescimento bacteriano progrediu, a biossorção de cádmio aumentou, indicando potencial de aplicação para imobilização de metais em águas residuais. *Exiguobacterium indicum* MW1 isolada da água marinha do Porto do Paraíso (*Paradip Port*), na Índia, foi avaliada quanto ao potencial de redução de Cr(VI) sob diferentes variáveis operacionais (MOHAPATRA *et al.*, 2017). Em condições otimizadas, a cepa apresentou capacidade de redução em todas as concentrações utilizadas (100, 500 e 1000mg L⁻¹), no entanto, seguiu uma tendência decrescente de redução conforme o aumento da concentração de Cr(VI). A tolerância salina da bactéria foi avaliada em uma ampla faixa de concentrações de NaCl (0,5 a 13% m/v).

Além disso, pesquisadores têm investigado cepas do gênero *Exiguobacterium* que possuem atributos estimulantes do crescimento de plantas, com o objetivo de avaliar a aplicação para a promoção do crescimento em várias culturas. *Exiguobacterium* NII-0906 obteve similaridade máxima com *Exiguobacterium*

marinum TF-80T e foi avaliada em relação as propriedades de promoção de crescimento de plantas em um bioensaio utilizando *Vigna unguiculata* (feijão-fradinho). A inoculação bacteriana resultou em incremento significativo na raiz, caule e biomassa da planta, além de ter apresentado propriedades antifúngicas. Os resultados apontam que a cepa pode ser utilizada como uma rizobactéria promotora de crescimento em culturas regionais (DASTAGER, KUMARAN e PANDEY, 2010). Em um estudo semelhante, Tang *et al.* (2015) verificaram que quando a *Lemna minor* (lentilha d'água) foi exposta ao Cr(VI), principalmente em concentrações mais altas, *Exiguobacterium* sp. MH3 aliviou significativamente os efeitos nocivos do estresse na planta, promovendo o crescimento e impedindo a absorção excessiva de Cr. O estudo realizado por Pandey e Bhatt (2016) buscou investigar o papel da *Exiguobacterium* sp. associada ao solo na redução da toxicidade do arsênico em plantas de *Vigna radiata* (feijão moyashy). Os experimentos mostraram que *Exiguobacterium* aumentou significativamente a biomassa aérea e radicular da planta na presença de As(V) e As(III), juntamente com aumento da altura, índice de sobrevivência e teor de clorofila após 15 dias de inoculação. Além disso, *Exiguobacterium* sp. também protegeu as plantas dos efeitos prejudiciais do arsênico, reduzindo sua absorção e translocação ao colonizar a superfície da raiz. O ensaio de enzimas antioxidantes e o teste de peroxidação lipídica revelaram redução significativa no estresse oxidativo induzido por arsênio em *Vigna radiata* na presença de bactérias.

4.1.2 *Exiguobacterium indicum*

A espécie *Exiguobacterium indicum* foi primeiramente descrita por Chaturvedi e Shivaji (2006), isolada da água derretida da geleira Hamta, localizada a uma altura de 4.279m acima do nível do mar nas cordilheiras do Himalaia, na Índia. A cepa HHS 31 foi identificada usando taxonomia polifásica como uma nova espécie do gênero *Exiguobacterium*.

De acordo com o *National Center of Biotechnology Information* (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a posição taxonômica insere essa espécie no Domínio *Bacteria*; Reino *Bacteria*; Filo *Firmicutes*; Classe *Bacilli*; Ordem *Bacilales*; Gênero *Exiguobacterium*; Espécie *Exiguobacterium indicum*.

Exiguobacterium indicum HG8, micro-organismo alvo deste estudo, apresentou células Gram-positivas, na forma de cocobacilos, com colônias redondas, irregulares e alaranjadas (Figura 11).

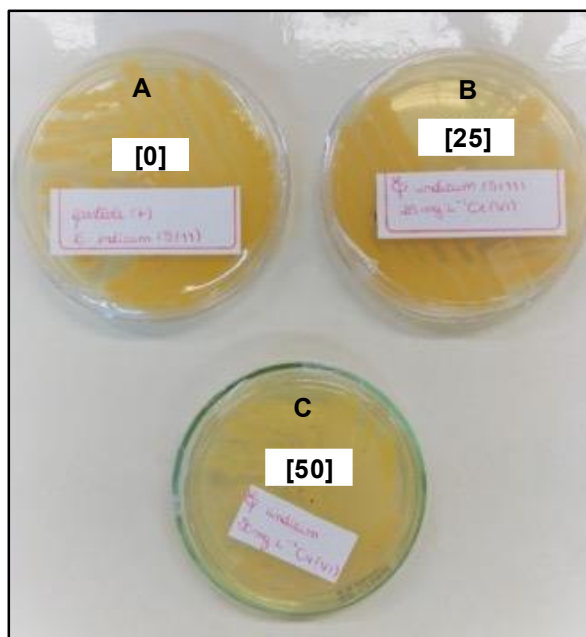


Figura 11 – Imagem ilustrativa do isolado *Exiguobacterium indicum* HG8 cultivado sob exposição à diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)). (A) cultivo em meio suplementado com 0 (controle), (B) 25 e (C) 50mg L⁻¹ de cromo hexavalente (Cr(VI)), respectivamente.

Os resultados corroboram com a descrição realizada no estudo de Chaturvedi e Shivaji (2006), que relatou que esse micro-organismo apresenta características como células Gram-positivas, aeróbicas, móveis, na forma de cocobacilos durante a fase estacionária. Os autores acrescentaram que o micro-organismo cresce sob condições de 5 a 30°C e a pH 6,0 a 10,0, sendo que as condições ótimas de temperatura e pH para crescimento são 25°C e pH 7,0, além de tolerar 5,8% de NaCl, no entanto, também crescem na ausência de sal.

4.2 Fatores que afetam a remoção de Cr(VI) por *E. indicum* HG8

Os micro-organismos podem remover metais por diversos mecanismos que podem ser afetados por diferentes condições ambientais. Além de serem eficientes na remoção de metais pesados, muitas vezes as bactérias são capazes de tolerar outros estresses ambientais extremos, como temperatura e pH por exemplo, que são frequentemente associados a locais poluídos (PUSHKAR *et al.*, 2021). Portanto, o caráter de multirresistência das bactérias pode ser explorado para tratar a poluição ambiental por Cr de forma eficaz. Nesse sentido, o efeito da temperatura de incubação e de pH do meio de cultivo de *E. indicum* HG8 que proporcionou o melhor desenvolvimento bacteriano e maximizou a capacidade de remoção de Cr foi investigado.

Os resultados demonstram que *E. indicum* HG8 foi capaz de desenvolver-se

em uma ampla faixa de temperaturas de incubação (20-45°C) (Figura 12) e de pH (5,0-9,0) (Figura 13). Pelo contrário, em pH 4,0, não foram observadas células viáveis (UFC mL⁻¹). Isso pode ser atribuído ao fato de que pHs extremos podem alterar a integridade das macromoléculas, tornando os micro-organismos suscetíveis a esse pH ácido. Assim, essa desestabilização causa alterações estruturais e funcionais que induzem à morte celular (MADIGAN *et al.*, 2016).

As condições ideais de cultivo em meio contaminado com Cr que proporcionaram o melhor crescimento do isolado foram verificadas à 30°C e a pH 6,0. No entanto, para os ensaios de biorremediação, optou-se por seguir com o meio de cultivo em pH 7,0, por melhor aproximar-se das condições aquáticas antrópicas.

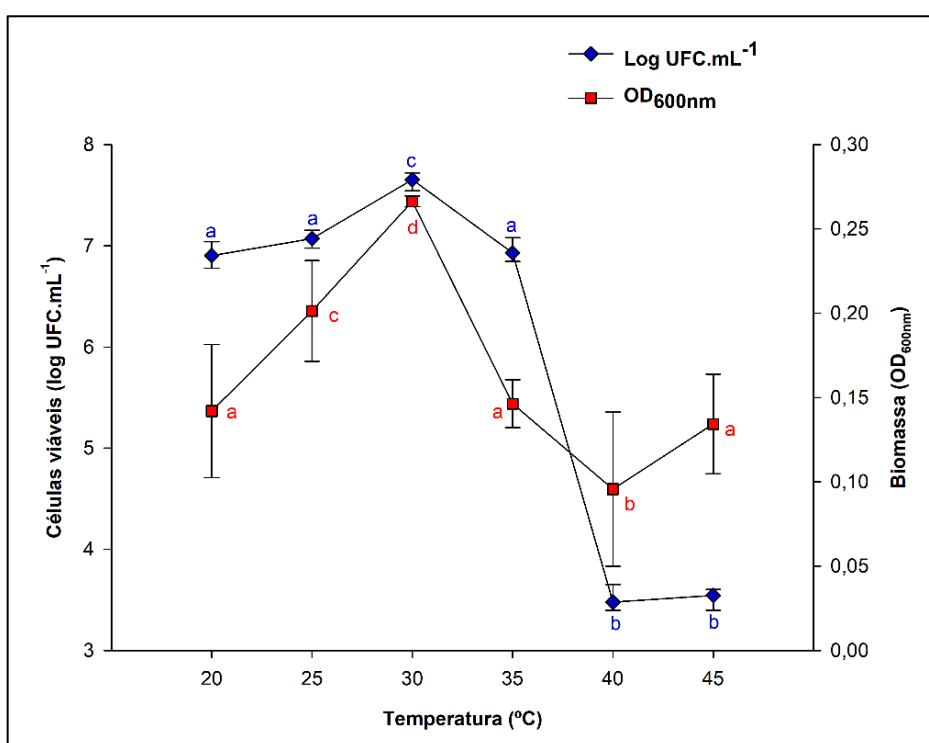


Figura 12. Efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento bacteriano de *Exiguobacterium indicum* HG8 após 48 horas de incubação em caldo nutriente suplementado com 50mg L⁻¹ de Cr(VI). Os dados de biomassa (■) são expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si conforme o Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados de células viáveis (♦) são representados como mediana ± máximo/mínimo. As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Duncan ($p < 0,05$).

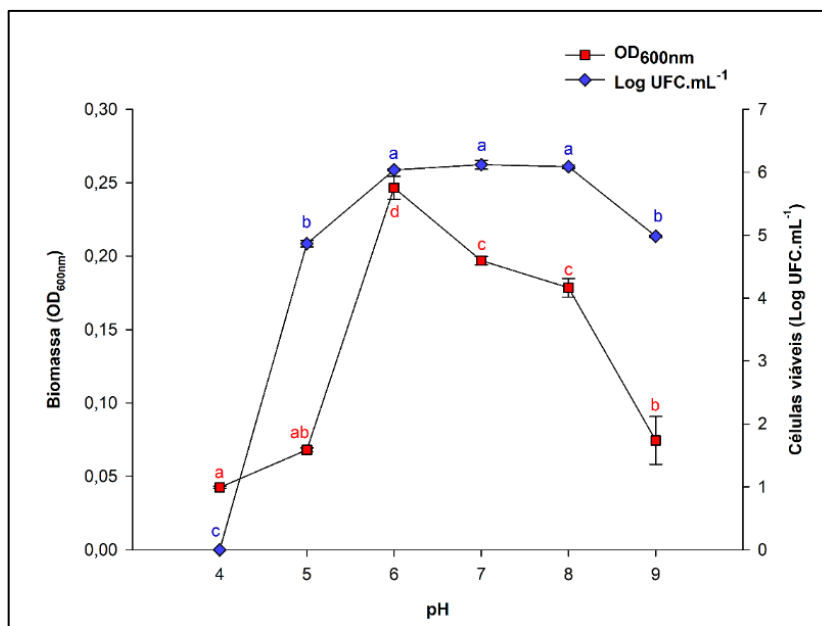


Figura 13. Efeito de diferentes pHs do meio de cultivo no desenvolvimento bacteriano de *Exiguobacterium indicum* HG8 após 48 horas de incubação em caldo nutriente suplementado com 50mg L⁻¹ de Cr(VI). Os dados de biomassa (■) são expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si conforme o Teste de Tukey (p<0,05). Os dados de células viáveis (♦) são representados como mediana ± máximo/mínimo. As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Duncan (p<0,05).

Por outro lado, as condições ideais de temperatura e de pH que promovem a máxima remoção de Cr por *E. indicum* HG8 foram avaliadas por meio da determinação da concentração de Cr(VI) residual no sobrenadante pelo método colorimétrico e pela determinação de Cr total por AAS (Figura 14). Por fim, a capacidade de remoção de Cr (%) foi calculada.

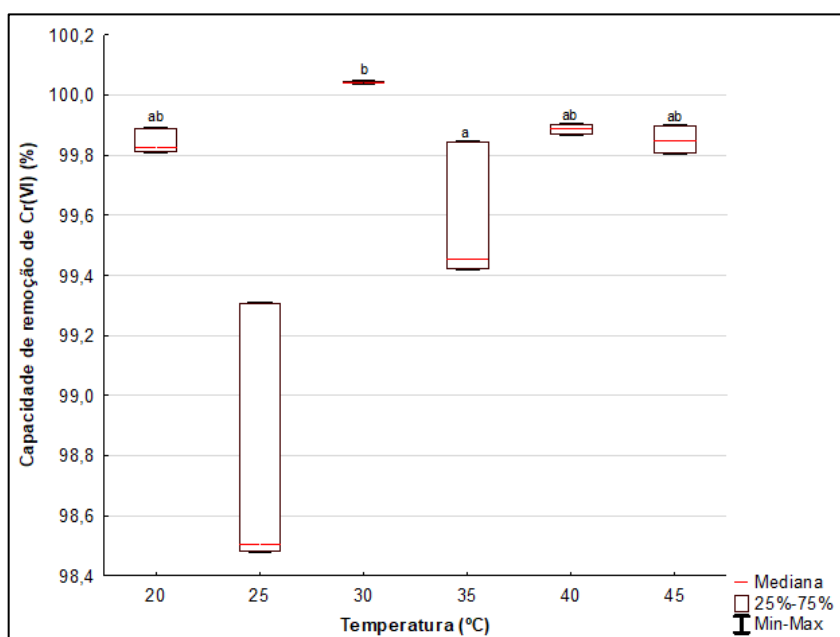


Figura 14 – Efeito de diferentes temperaturas na remoção de Cr(VI) por *Exiguobacterium indicum* HG8. Os dados são expressos como mediana $\pm$ máximo/mínimo. As medianas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Os dados indicam que as condições ideais que aprimoram a remoção de Cr(VI) pelo isolado são de pH 5,0-6,0, já que as medianas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) sob a temperatura de incubação de 30°C, visto que a capacidade de remoção foi de 100% em ambas as condições, após 72 horas de incubação.

A redução do Cr(VI) para Cr(III) por bactérias pode ocorrer por duas principais vias: por meio de atividades enzimáticas envolvendo cromato redutases ou pela reação com produtos metabólicos, aminoácidos, nucleotídeos, entre outros (FERNANDEZ *et al.*, 2018). Os resultados aqui descritos apresentaram uma correlação entre a redução de Cr(VI) e as condições de temperatura e de pH. A temperatura ótima para a atividade de redução de *E. indicum* HG8 foi de 30°C e a eficiência foi reduzida em pH 9,0 (Figura 15). Quando a redução de Cr(VI) é mediada por enzimas, as mudanças de temperatura e pH podem afetar a taxa de ionização e o envelopamento da proteína, consequentemente afetando a atividade enzimática (ZHANG e LI, 2011).

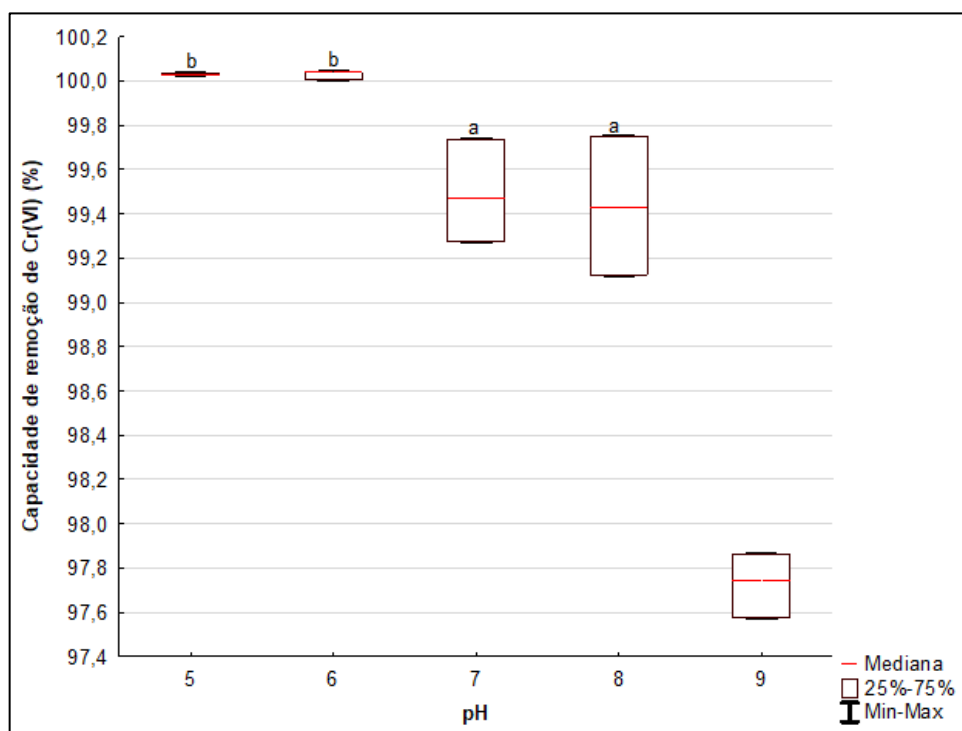


Figura 15 – Efeito de diferentes pHs do meio de cultivo na remoção de Cr(VI) por *Exiguobacterium indicum* HG8. Os dados são expressos como mediana $\pm$ máximo/mínimo. As medianas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Contudo, a concentração de Cr total residual no sobrenadante sugere que a temperatura ideal de cultivo é de 45°C (Figura 16) e de pH de 8,0-9,0 (Figura 17) (as medianas não apresentaram diferença significativa para $p < 0,05$), uma vez que a capacidade de remoção de Cr total foi de 87 e 84%, respectivamente. Entretanto, o cultivo em pH 8,0-9,0 sob a temperatura de incubação de 45°C pode implicar em um decréscimo do crescimento bacteriano (Figuras 12 e 13) que, em determinadas situações, pode afetar a eficiência do processo.

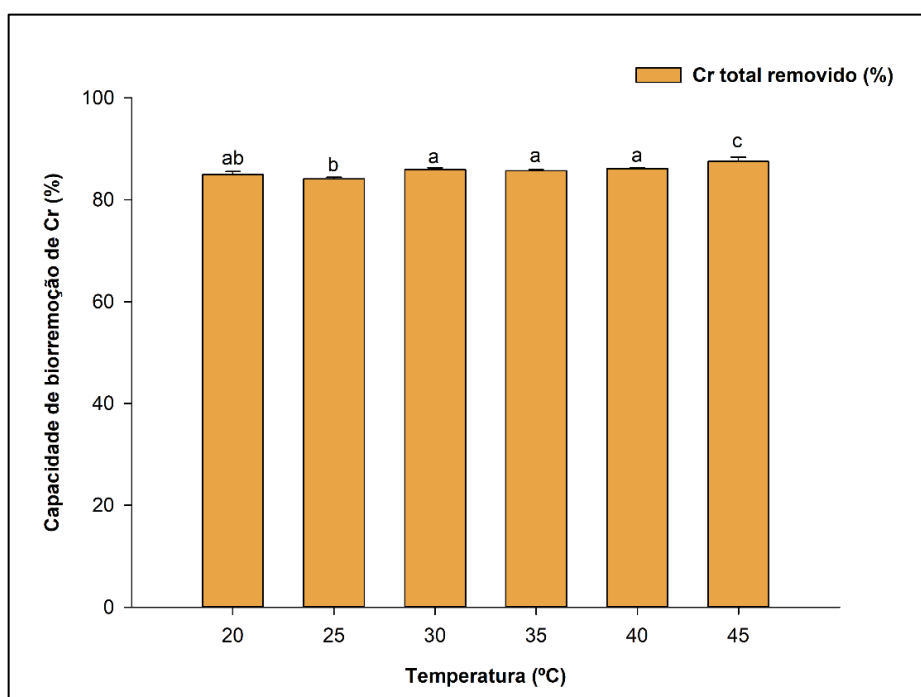


Figura 16. Efeito de diferentes temperaturas de incubação na remoção de cromo total por *Exiguobacterium indicum* HG8. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si conforme o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

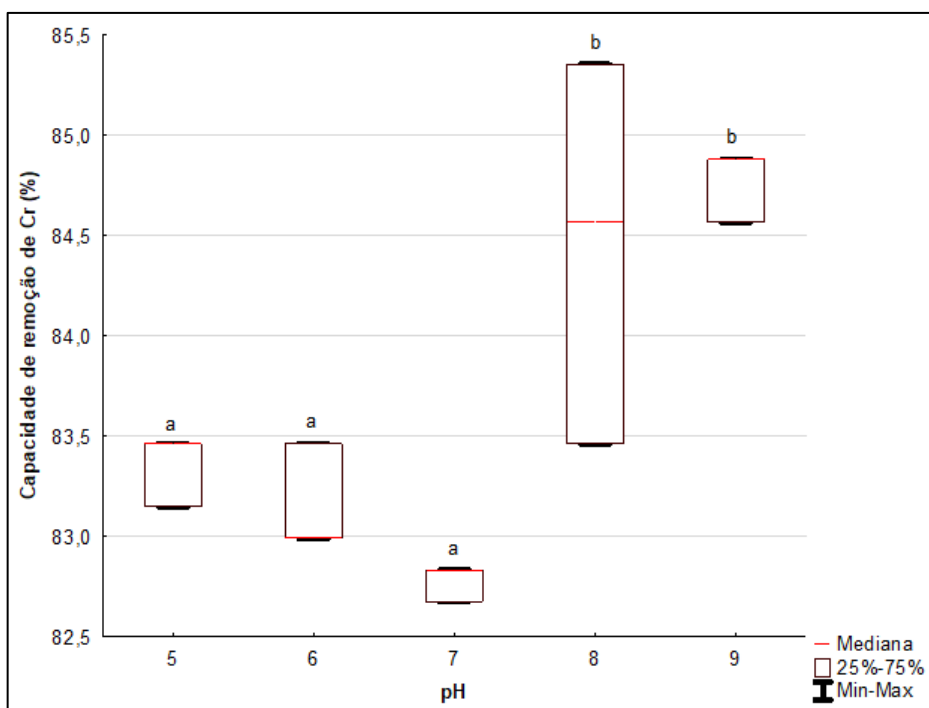


Figura 17. Efeito de diferentes pHs do meio de cultivo suplementado com cromo hexavalente (Cr(VI)) na remoção de cromo total por *Exiguobacterium indicum* HG8. Os dados são expressos como mediana $\pm$ máximo/mínimo. As medianas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Mohapatra *et al.* (2017) relataram que *E. indicum* MW1 apresentou máxima capacidade de remoção de Cr(VI) em pH 8,0 e temperatura de incubação de 35°C. Por conseguinte, o aumento pH do meio resultou na diminuição da eficiência de remoção. O efeito do aumento da temperatura foi semelhante: aos 40°C, a eficiência também foi reduzida. Para avaliar o impacto do pH da solução na remoção de Cr(VI) por *Bacillus mycoides* 200AsB1, Wang *et al.* (2016) ajustaram o pH para 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 e a bactéria foi incubada por 72 horas à 30°C, sob agitação de 180rpm. Como resultado, *B. mycoides* cresceu satisfatoriamente na faixa de pH de 5,0-9,0, no entanto, sob exposição ao Cr(VI), somente cresceu em pH neutro e alcalino. Okeke (2008) apresentou em seu estudo que o isolado *Exiguobacterium sp.* GS1 foi capaz de remover Cr(VI) em uma ampla faixa de temperatura de incubação (18-45°C), portanto, a maior capacidade de remoção foi apresentada na faixa de 35-40°C. A eficiência de remoção de Cr(VI) foi similar em pH 6,0-8,0, entretanto, as condições de temperatura de 45°C e pH 9,0 ocasionaram um declínio na capacidade de remoção de Cr(VI).

É importante notar que assim como *E. indicum* HG8 foi capaz de crescer em uma ampla faixa de pH e temperatura, o mesmo também foi capaz de remover Cr nessas condições. *E. indicum* HG8 removeu Cr(VI) em todas as temperaturas testadas

e em pH 5,0-9,0, evidenciando sua capacidade de adaptação a condições extremas. Essa característica é de grande interesse do ponto de vista biotecnológico, pois permite aplicações futuras no tratamento de ambientes com diferentes características.

4.3 Resistência ao Cr(VI) por *E. indicum* HG8

A resistência de *E. indicum* HG8 ao Cr(VI) foi analisada em diferentes concentrações de Cr(VI) (50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600mg L⁻¹) e comparada ao controle sem Cr(VI) (0 mg L⁻¹). O desenvolvimento bacteriano foi avaliado por meio da medida da absorbância a 600nm (OD_{600nm}) (Figura 18) em três diferentes tempos de contato (24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C)) e, por fim, foi realizada a contagem de células viáveis (UFC mL⁻¹) (Figura 19).

A comparação dos meios com diferentes concentrações de Cr(VI) e o controle claramente indica que à medida que houve um incremento na concentração de Cr(VI) no meio de cultivo, houve o decaimento da densidade celular, ou seja, o crescimento bacteriano reduziu, o que pode ser atribuído aos efeitos tóxicos de Cr(VI) de forma direta, ou indireta pela geração de ERO.

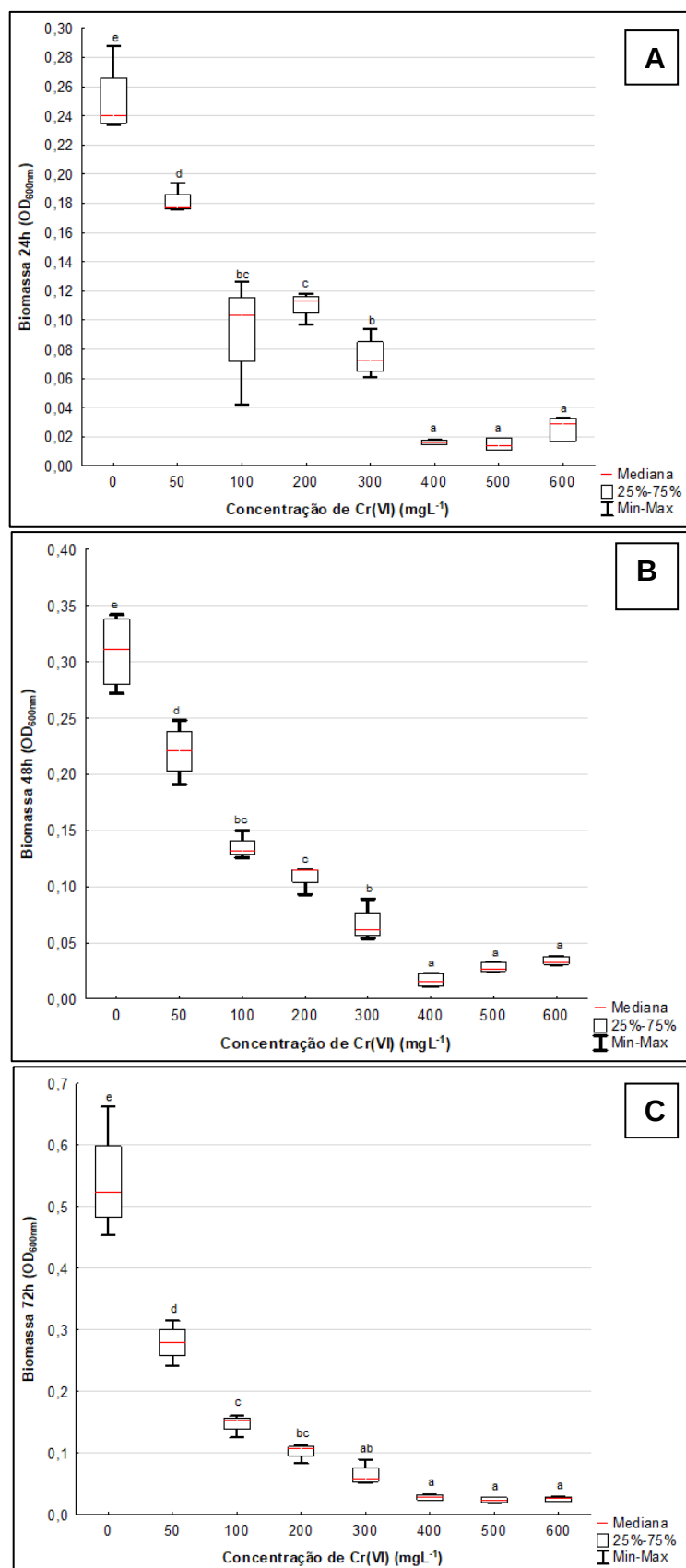


Figura 18 – Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) no desenvolvimento bacteriano, registrado através da medida da absorbância a 600nm (OD_{600nm}) às 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de incubação. Os dados são expressos pela mediana ± máximo/mínimo. As

medianas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o Teste de Duncan ($p < 0,05$).

A concentração inibitória mínima do crescimento de *E. indicum* HG8 para o Cr(VI) foi comprovada por meio da contagem de células viáveis. O efeito da concentração de Cr(VI) no crescimento bacteriano é representado na Figura 19.

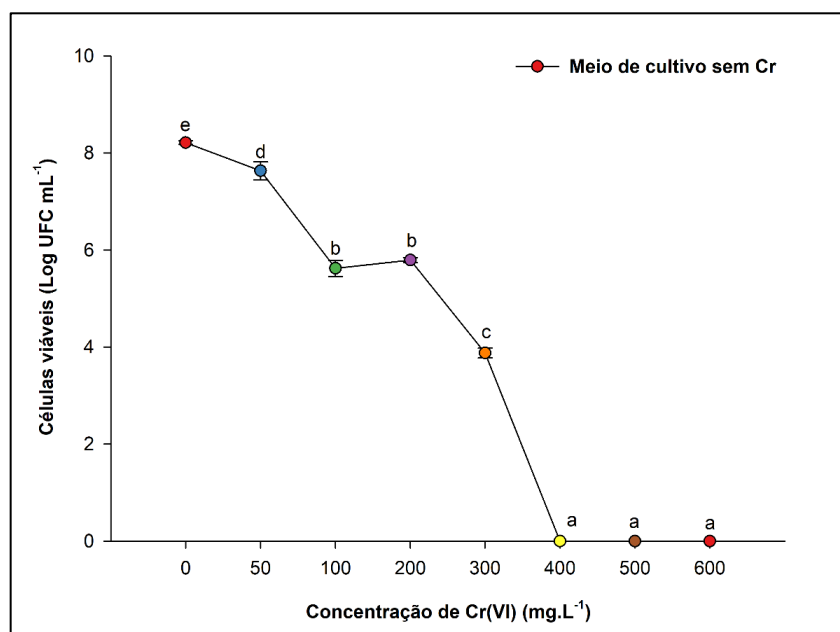


Figura 19 – Comparação entre as diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) no meio de cultivo e a contagem de células viáveis. Os dados são expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si segundo o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A CIM foi definida como a concentração mínima de Cr(VI) que inibiu completamente o crescimento de colônias de *E. indicum* HG8. O crescimento bacteriano foi apresentado nos meios de cultivo suplementados com concentrações de 50 a 300mg L⁻¹ de Cr(VI), entretanto, a partir de 400mg L⁻¹, o crescimento bacteriano foi inibido. Apesar da densidade celular apresentada nas concentrações de 400, 500 e 600mg L⁻¹ (Figura 18), não houveram células viáveis nas respectivas concentrações. Os resultados implicam que a CIM de Cr(VI) para *E. indicum* HG8 é de 400mg L⁻¹.

Raman *et al.* (2018) investigaram a tolerância de *Stenotrophomonas maltophilia* pelo método de diluição em ágar e verificaram resistência até 200µg mL⁻¹, enquanto no ensaio de diluição em caldo o crescimento somente foi inibido em 400µg mL⁻¹. Os autores relataram que essa diferença pode ser atribuída ao fato de que as condições de crescimento são mais favoráveis no caldo devido à melhor aeração e agitação

quando comparado ao crescimento em ágar. Em um estudo semelhante, Ma *et al.* (2019) estudaram a tolerância de *Aeribacillus pallidus* BK1 ao Cr(VI) em uma faixa de 20 a 600mg L⁻¹ e constataram que a tolerância máxima do micro-organismo foi de 400mg L⁻¹. No estudo de Sadeghi *et al.* (2022), foram isoladas cinco bactérias de efluente industrial resistentes a Cr(VI), sendo que somente *Micrococcus luteus* SEHD031RS destacou-se entre as demais por apresentar maior resistência devido a concentração mínima de inibição de 140mg L⁻¹.

O principal mecanismo de toxicidade do Cr(VI), tanto em organismos procariotos como em eucariotos, está associada à sua fácil difusão pela membrana celular seguida da redução do Cr(VI) nas células gerando radicais livres que podem causar alterações no DNA e outros efeitos tóxicos (JOBBY *et al.*, 2018), possivelmente ocasionando a morte celular.

4.4 Biorremediação de Cr(VI) por *E. indicum* HG8

O desenvolvimento bacteriano nas condições testadas foi acompanhado pela medida da OD_{600nm} a cada 24 horas, totalizando 72 horas de incubação e, por fim, realizada a contagem de células viáveis (72 horas). O crescimento de *E. indicum* HG8 nas diferentes concentrações foi comparado ao grupo controle (sem Cr(VI)). Na Figura 20 foi possível notar a redução gradativa do crescimento bacteriano a medida que as concentrações de Cr(VI) no meio foram aumentadas.

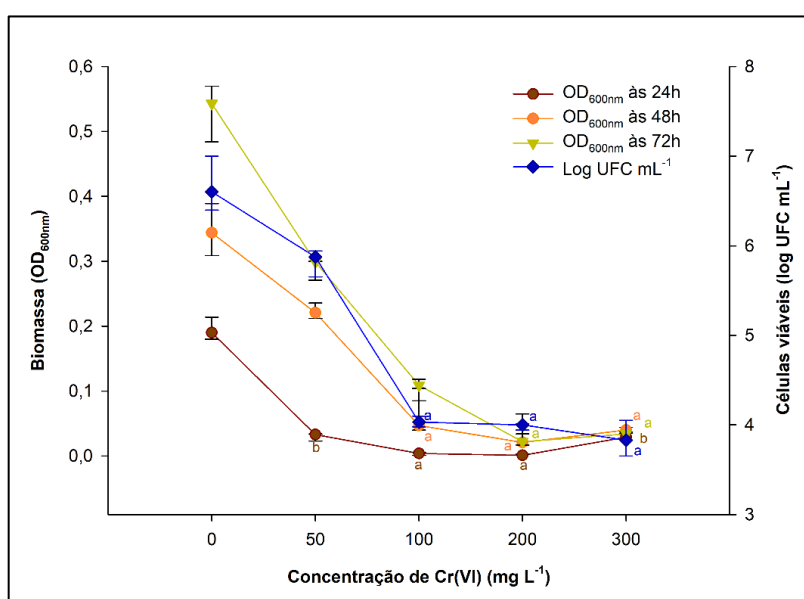


Figura 20 – Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) no desenvolvimento bacteriano durante o ensaio de avaliação da biorremediação de cromo hexavalente (Cr(VI)). Os dados são

expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais para o mesmo grupo experimental não representam diferença significativa ($p < 0,05$) segundo o Teste de Tukey.

A capacidade de remoção de Cr(VI) por *E. indicum* HG8 (Figura 21) foi analisada usando concentrações iniciais de 50, 100, 200 e 300mg L⁻¹ e a concentração residual de Cr no sobrenadante foi determinada em intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Para os três intervalos analisados, a remoção de Cr(VI) nas diferentes concentrações foi significativa. Apesar da redução do desenvolvimento bacteriano observado anteriormente (Figura 20) causada pela toxicidade das concentrações mais altas de Cr(VI), a capacidade de remoção aumentou inversamente (Figura 21), apresentando eficiência de 98,0; 98,7; 99,4 e 99,6%, para as concentrações de 50, 100, 200 e 300mg L⁻¹ em 24 horas (A) de tempo de contato, respectivamente. Conforme o tempo de incubação foi prolongado, a absorção de Cr(VI) aumentou para 98,1; 99,0; 99,5, 99,6% em 48 horas (B), respectivamente, e permaneceu a mesma em 72 horas (C).

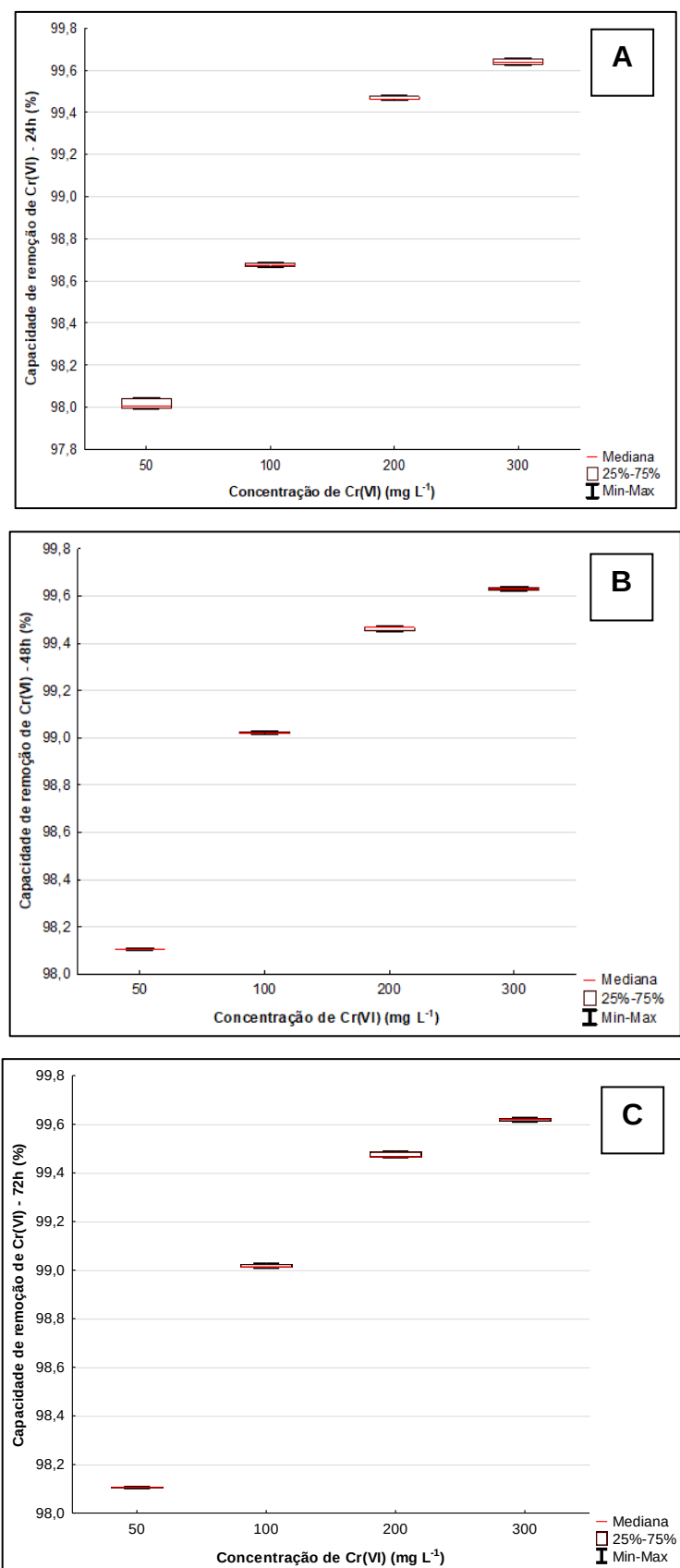


Figura 21 – Capacidade de remoção de cromo hexavalente (Cr(VI)) por *Exiguobacterium indicum* HG8 usando concentrações iniciais de 50, 100, 200 e 300mg L⁻¹ em intervalos de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Os dados são expressos como mediana ± máximo/mínimo. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente segundo o Teste de Duncan.

A remoção de Cr total (Figura 22) totalizou 86,7% em 50mg L⁻¹, 87,8% em 100 e 200mg L⁻¹ e 89,4% para 300mg L⁻¹ em 24 horas de incubação. Quando analisada a remoção em 48 horas e 72 horas de incubação, observou-se que a remoção de Cr total aumentou, oscilando em uma faixa de 89,1 a 90,5% entre as concentrações analisadas.

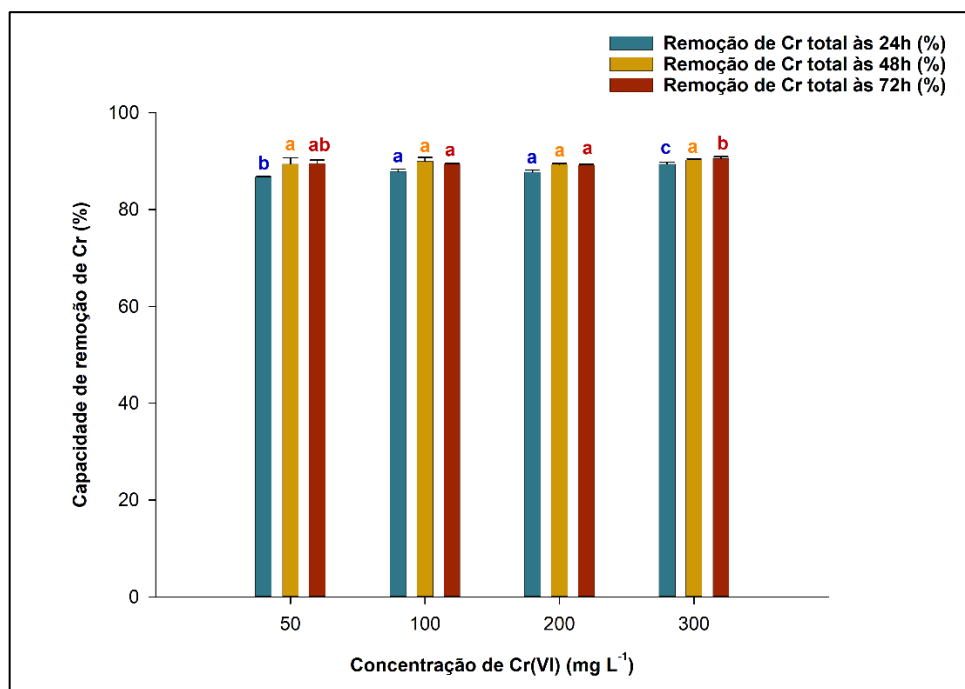


Figura 22 – Capacidade de remoção de cromo total por *Exiguobacterium indicum* HG8 usando concentrações iniciais de 50, 100, 200 e 300mg L⁻¹ em intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais para o mesmo grupo experimental não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) segundo o Teste de Tukey.

Muitos micro-organismos relatados na literatura não são capazes de causar uma redução acima de 60% da concentração inicial de Cr, além de que a maioria dos isolados apresentam maior eficácia em baixas concentrações iniciais de Cr e baixa ou nenhuma remoção em altas concentrações. Porém, foram relatadas algumas espécies mais eficazes para reduzir os níveis de Cr em ambientes contaminados com altas concentrações. Alguns micro-organismos foram relatados devido à resistência em concentrações de pelo menos 100mg L⁻¹ e capacidade de redução de mais de 60%. Banerjee *et al.* (2019) realizaram em seu estudo o isolamento de uma cepa Gram-positiva tolerante a Cr, Cd e Ni, identificada com 97% de similaridade do gene 16S rRNA para *Bacillus cereus*, de um lago abandonado conhecido como “Tasra Coalmine Lake of Jharia”, na Índia. A atividade da enzima cromato redutase foi identificada e os resultados demonstraram que o isolado foi capaz de reduzir

completamente 200mg L⁻¹ de Cr(VI) do meio em 16 horas sob condições heterotróficas. No estudo de Sun *et al.* (2019) a bactéria Gram-positiva *Enterobacter* sp. SL foi cultivada em um reator anaeróbico com resíduos de melaço como fonte de carbono com o objetivo de reduzir o Cr(VI) em águas residuais. Os resultados mostraram que a remoção de Cr(VI) ocorreu por diferentes mecanismos e totalizou 99,91% em 25 horas no reator sob a concentração de 100mg L⁻¹, pH 6,0 e temperatura de operação de 45°C. Após 120 horas de reação, a remoção de Cr total atingiu 91,10%.

Bactérias resistentes à metais pesados exibem uma série de mecanismos para tolerar o estresse induzido pela sua presença, no intuito de garantir sua sobrevivência. A exposição ao Cr induz a diversas respostas celulares, como bioadsorção, bioacumulação, biotransformação, efluxo, redução enzimática, redução não enzimática, precipitação, ligação citosólica, formação de biofilme, etc. (BANERJEE *et al.*, 2019). Em contraste com as bactérias Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas são menos estudadas, portanto, ainda há uma lacuna de conhecimento sobre os possíveis mecanismos envolvidos na resistência aos metais pesados (SHAW e DUSSAN, 2018).

Bactérias Gram-positivas atingem a bioadsorção de Cr em grande parte devido à presença de alto teor de polímeros aniônicos na parede celular, compostos de peptidoglicanos teiônicos ou ácidos teicurônicos (PUSHKAR *et al.*, 2021). Bactérias Gram-positivas com camada de peptidoglicano oferecem diversos sítios para sorção de íons de Cr (SINGH *et al.*, 2020). Alguns ligantes da superfície celular de bactérias Gram-positivas, como fosforil, SO₃²⁻ (íon sulfito), RNH₂ (amina primária) e R₂NH (amina secundária), grupos carbonil (COO), possuem uma alta afinidade por cátions de metais em transição, incluindo o Cr (PUSHKAR *et al.*, 2021). Prabhakaran e Subramanian (2017) revelaram que o grupo hidroxila (OH) também está envolvido na bioadsorção de Cr em bactérias Gram-positivas em pH 1,0 a 4,0. Para entender os mecanismos envolvidos na remoção de Cr(VI) pela bactéria Gram-positiva *Aeribacillus pallidus* BK1, MA *et al.* (2019) realizaram um estudo com o objetivo de desvendar a localização da reação de redução de Cr(VI). Os autores demonstraram que a remoção de Cr(VI) por *A. pallidus* BK1 está intimamente ligada aos processos metabólicos das bactérias ativas, já que nenhuma capacidade de remoção foi identificada nas células inativas. Os resultados indicaram que a remoção de Cr(VI) por *A. pallidus* BK1 ocorreu via biorredução, em que houve o transporte transmembrana de Cr(VI) para o

citoplasma para posterior redução pela redutase.

4.5 Efeito de Cr(VI) na atividade de enzimas antioxidantes

Na Tabela 5 são apresentadas as atividades das enzimas CAT, SOD e GPx nos extratos extracelular e intracelular. O objetivo dessa investigação foi compreender o comportamento das enzimas antioxidantes em *E. indicum* HG8 frente ao estresse oxidativo induzido pelo Cr(VI).

No extrato extracelular, as enzimas CAT e SOD apresentaram aumento da resposta enzimática sob o estresse induzido pelo Cr(VI). O tratamento com diferentes concentrações de Cr(VI) não alterou significativamente a atividade da CAT e SOD, entretanto, quando comparado ao controle, ambas as enzimas apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) na atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx).

Extrato enzimático	Concentração de Cr(VI) (mg L ⁻¹)	SOD (mmol SOD mg proteína ⁻¹)	CAT (nmol CAT mg proteína ⁻¹)	GPx (nmol GPx mg proteína ⁻¹)
Extracelular (bruto)	0 (controle)	85,33 ± 1,13 ^b	108,11 ± 15,15 ^b	0,024 ± 0,000 ^a
	50	106,07 ± 5,64 ^a	128,57 ± 0,00 ^a	0,020 ± 0,006 ^a
	100	110,05 ± 2,26 ^a	135,38 ± 1,38 ^a	0,024 ± 0,000 ^a
	200	108,46 ± 2,26 ^a	126,62 ± 2,75 ^a	0,020 ± 0,006 ^a
	300	109,26 ± 1,13 ^a	129,54 ± 4,13 ^a	0,016 ± 0,000 ^a
Intracelular	0 (controle)	95,70 ± 15,79 ^a	134,41 ± 0,00 ^a	0,028 ± 0,006 ^a
	50	94,90 ± 1,13 ^a	132,46 ± 2,75 ^a	0,024 ± 0,000 ^a
	100	106,86 ± 4,51 ^a	134,41 ± 2,75 ^a	0,024 ± 0,000 ^a
	200	106,07 ± 3,38 ^a	134,41 ± 0,00 ^a	0,020 ± 0,000 ^a
	300	110,85 ± 1,13 ^a	131,49 ± 1,38 ^a	0,024 ± 0,000 ^a

*Os dados são expressos pela média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos dados na mesma coluna, para cada grupo experimental.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada para a atividade da GPx em ambos extratos enzimáticos. Conforme descrito por Fu *et al.* (2007), o papel do sistema GSH/GPx em células procarióticas é menos conhecido e alguns estudos demonstraram que esse sistema não é onipresente em organismos procariotos, podendo ser específico para algumas espécies e em alguns casos, somente para algumas cepas. Tendo isso em vista, uma vez que tanto a enzima CAT como a GPx regulam os níveis de H₂O₂, ao observar a baixa atividade da GPx, é possível presumir que houve uma resposta adaptativa para a remoção de H₂O₂ da célula bacteriana, ou seja, ocorreu uma preferência pela CAT para completar seu sistema antioxidante de

defesa. Pandey *et al.* (2012) relataram que o estresse metálico resultou em baixa atividade da enzima GPx em *Ochrobactrum* e aumento da atividade de CAT. Um efeito semelhante ocorreu no estudo de Jobby *et al.* (2016) ao estudar a resposta das enzimas antioxidantes de *Enterobacter sp.* sob o estresse de exposição ao Arsênio, quando houve uma indução significativa na atividade de CAT em comparação com ascorbato peroxidase (APx), indicando uma possível preferência pela enzima.

Além disso, os resultados do presente estudo demonstram que não houve incidência de atividade pró-oxidante induzida pelas diferentes concentrações de Cr(VI) a nível intracelular, visto que não foi observada diferença significativa na resposta ao estresse induzido por Cr na atividade das enzimas testadas. De acordo com Lushchak (2011), estudos demonstram que a membrana plasmática não é livremente permeável ao H₂O₂. Bactérias expostas a condições oxidantes podem alterar a permeabilidade da membrana celular como um mecanismo de defesa diante da geração de ERO, atuando como uma espécie de barreira. Li *et al.* (2017) atribuiu esse efeito à toxicidade de Cr que pode danificar gravemente as células, consequentemente suprimindo a síntese enzimática. Shao *et al.* (2019) investigaram o estresse oxidativo intracelular de *Bacillus sp.* MRP-3 causado por Pb(II) e Cr(VI). Os resultados demonstraram que a atividade de SOD foi negativamente correlacionada com a concentração de Cr(VI). Além disso, na maioria das concentrações testadas, não houve diferença significativa da atividade de SOD quando comparada ao controle.

Em suma, o aumento significativo nas atividades de SOD e CAT no extrato extracelular (bruto) pode ser considerado como uma resposta adaptativa de *E. indicum* HG8 em relação a toxicidade de Cr(VI). De fato, as ERO são geradas em condições de estresse metálico, logo, a resposta das enzimas antioxidantes do isolado resistente demonstrou que as mesmas exercem um papel importante na proteção celular contra a toxicidade de Cr. A produção de enzimas antioxidantes é um meio bioquímico pelo qual os organismos respondem ao acúmulo de metais. Assim, é evidente na literatura a diferença das respostas antioxidantes para diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em termos de estresse oxidativo (PANDEY *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; SHAO *et al.*, 2019). Todavia, a resposta de enzimas antioxidantes em *E. indicum* HG8 ao estresse de Cr(VI) englobam algum mecanismo desconhecido, que precisa ser explorado em estudos futuros.

4.6 Efeito de Cr(VI) na peroxidação lipídica

Variações no teor de MDA auxiliam na compreensão do nível de peroxidação lipídica das membranas expostas a ERO. Dessa forma, o dano oxidativo causado pela exposição ao Cr(VI) foi determinado por meio da avaliação das variações na quantidade de MDA em diferentes concentrações de Cr(VI) comparado ao controle (sem a presença de Cr(VI)) (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito de diferentes concentrações de cromo hexavalente (Cr(VI)) na concentração de malondialdeído (MDA).

Extrato enzimático	Concentração de Cr(VI)	MDA
	(mg L ⁻¹)	(nmol MDA mg proteína ⁻¹)
Extracelular (bruto)	0 (controle)	166,25 ± 40,35 ^a
	50	119,75 ± 12,06 ^a
	100	273,29 ± 40,80 ^b
	200	400,50 ± 17,96 ^c
	300	497,44 ± 12,69 ^d
Intracelular	0 (controle)	34,22 ± 11,17 ^a
	50	24,35 ± 0,93 ^a
	100	36,85 ± 3,72 ^a
	200	42,11 ± 1,86 ^a
	300	47,38 ± 9,31 ^a

*Os dados são expressos pela média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística (p<0,05) em relação aos dados na mesma coluna, para cada grupo experimental.

O incremento nas concentrações de MDA no extrato extracelular revelou que a partir de 100 mg L⁻¹, as diferentes concentrações de Cr(VI) causam um aumento progressivo na geração de ERO. Isso significa que o estresse oxidativo foi estabelecido a medida que maiores concentrações de Cr(VI) foram adicionadas às culturas. Isso pode ser confirmado pela resposta das enzimas antioxidantes apresentada anteriormente (Tabela 5), quando a atividade oxidante no meio extracelular também aumentou com o aumento da concentração.

Por outro lado, no extrato intracelular não houve incremento significativo na concentração de MDA quando comparado ao controle, indicando que não houve dano lipídico causado pela exposição ao Cr. Diante disso, é possível reforçar a possibilidade de que *E. indicum* HG8 desenvolveu uma espécie de barreira como forma de resistência a toxicidade de Cr, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, impedindo os danos oxidativos. Embora não existam evidências suficientes na literatura para apoiar essa hipótese, muitos estudos abordam que bactérias resistentes a metais são capazes de reduzir o estresse oxidativo em plantas inoculadas, mostrando uma redução considerável no teor de MDA (ISLAM *et al.*, 2016;

YASIN *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2019). Nesse sentido, são necessários maiores estudos que visam compreender esse fenômeno.

5 Considerações finais

O presente estudo revelou que *E. indicum* HG8 é um possível agente para a descontaminação de ambientes contaminados com Cr(VI), uma vez que apresenta capacidade de crescimento em concentrações variadas, em uma ampla faixa de pH e temperatura do meio. É importante ressaltar que o aumento das concentrações testadas de Cr(VI) não afetou a capacidade de remoção de Cr pelo isolado.

A exposição à diferentes concentrações de Cr(VI) proporcionou um aumento na concentração de MDA no extrato extracelular, indicando que houve dano lipídico. Paralelamente, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT aumentou, demonstrando que as mesmas podem exercer um papel importante contra o dano celular. Além disso, os resultados sugerem que *E. indicum* HG8 possivelmente desenvolveu uma barreira diante da geração de ERO, afim de evitar sua passagem pela membrana, uma vez que no extrato intracelular não houve incremento significativo na concentração de MDA e, da mesma forma, na alteração da resposta enzimática. O efeito na resposta das enzimas antioxidantes fornece orientações futuras para auxiliar na mitigação do efeito inibitório de Cr(VI) sobre o isolado.

Estudos futuros relacionados ao potencial de biorremediação de *E. indicum* HG8 podem ser realizados com a finalidade de identificar o mecanismo envolvido na remoção de Cr(VI) pelo isolado, a possível associação com a promoção de crescimento e o alívio do estresse oxidativo na planta (*H. grumosa*) e, a expressão de genes envolvidos na supressão do estresse oxidativo. Estudos em nível genético podem proporcionar o desenvolvimento de micro-organismos altamente resistentes para a remediação de Cr(VI).

Em síntese, os mecanismos utilizados para reduzir o Cr(VI) e as respostas bioquímicas distintas exibidas pelo isolado *E. indicum* HG8 frente ao estresse oxidativo provocado pela exposição ao Cr(VI), o tornam um excelente organismo modelo para compreender os diferentes aspectos do estresse causado por metais pesados nas estratégias de crescimento e de sobrevivência de bactérias. Dessa forma, *E. indicum* HG8 pode ser utilizado como potencial agente para biorremediação efetiva de locais contaminados com Cr visando garantir a segurança ambiental e a proteção da saúde humana e animal.

Referências

ABDI, D. E.; OWEN JR, J. S.; BRINDLEY, J. C.; BIRNBAUM, A. C.; WILSON, P. C.; HINZ, REGUERA, G.; LEE, J.; CREGG, B. M.; KORT, D. R.; FERNANDEZ, R. T. Nutrient and pesticide remediation using a two-stage bioreactor-adsorptive system under two hydraulic retention times. **Water Research**, v. 170, p. 115311, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115311>.

ADIBMEHR, M.; BAGHERI SADEGHI, H.; DEHGHAN ABKENAR, Sh. Preconcentration and speciation of chromium using dispersive liquid-liquid microextraction; Application to milk and different water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, Irã, v. 1, n. 1, p. 20-28, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.22036/abcr.2014.4784>.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687984050163>. Acesso em: 8 out. 2021.

AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, v. 117, p. 232-242, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.078>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004565351400825X>. Acesso em: 25 ago. 2021.

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6B, p. 1145-1154, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700015>.

AGUILAR, N. C. **Isolamento e caracterização de bactérias resistentes a arsênio com potencial de aplicação em processos de biorremediação**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2018.

ALI, H.; KHAN, E. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 6-19, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02772248.2017.1413652>. Acesso em: 14 set. 2020.

ALI S; ABBAS Z; RIZWAN M; ZAHEER I; YAVAS I; ÜNAY A; ABDEL-DAIM M; BIN-JUMAH M; HASANUZZAMAN M; KALDERIS D. Application of floating aquatic plants in phytoremediation of heavy metals polluted water: a review. **Sustainability**, v. 12, n. 5, p. 1927, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/su12051927>.

AL-HOMAIDAN, A. A.; AL-OTAIBI, T. G.; EL-SHEIKH, M. A.; AL-GHANAYEM, A. A.; AMEEN, F. Accumulation of heavy metals in a macrophyte *Phragmites australis*: implications to phytoremediation in the Arabian Peninsula wadis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 3, p. 1-10, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s10661-020-8177-6>.

ANDREAZZA, R.; OKEKE, B. C.; LAMBAIS, M. R.; BORTOLON, L.; DE MELO, G. W. B.; CAMARGO, F. O. A. Bacterial stimulation of copper phytoaccumulation by bioaugmentation with rhizosphere bacteria. **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p. 1149-1154, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.047>.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; WOLF, L.; LEE, M. K.; CAMARGO, F. O.; OKEKE, B. C. Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper contaminated vineyard soil. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 7, p. 1501-1507, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.017>.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23 ed. Washington, DC: APHA, 2017.

ARORA, P. K.; BAE, H. Biodegradation of 4-chloroindole by *Exiguobacterium* sp. PMA. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 261-268, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.021>.

ARYAL, M.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 1, p. 4173, 2015. DOI: 10.1007/s10661-014-4173-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-014-4173-z>. Acesso em 31 jul. 2020.

AWA, S. H.; HADIBARATA, T. Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 2, p. 1-15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4426-0>.

AYELE, A. GODETO, Y. G. Bioremediation of Chromium by Microorganisms and Its Mechanisms Related to Functional Groups. **Journal of Chemistry**, v. 2021, n. 7694157, p. 21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/7694157>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2021/7694157/>. Acesso em: 2 out. 2021.

BAJGAI, R. C.; GEORGIEVA, N.; LAZAROVA, N. Bioremediation of chromium ions with filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R57. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 2, n. 2, p. B70-B75, 2012.

BANERJEE, S.; MISRA, A.; CHAUDHURY, S.; DAM, B. A. *Bacillus* strain TCL isolated from Jharia coalmine with remarkable stress responses, chromium reduction capability and bioremediation potential. **Journal of hazardous materials**, v. 367, p. 215-223, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.038>.

BANSAL, N.; COETZEE, J. J.; CHIRWA, E. M. N. In situ bioremediation of hexavalent chromium in presence of iron by dried sludge bacteria exposed to high chromium concentration. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 172, p. 281-289, 2019. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319301228>. Acesso em: 17 jun. 2021.

BEHERA, M.; DANDAPAT, J.; RATH, C. C. Effect of heavy metals on growth response and antioxidant defense protection in *Bacillus cereus*. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1201-1209, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201300805>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201300805>. Acesso em: 14 ago 2021.

BERTOLAZI, A. A.; CANTON, G. C.; AZEVEDO, I. G.; CRUZ, Z. M. A.; SOARES, D. N. E. S.; CONCEIÇÃO, J. M.; SANTOS, W. O.; RAMOS, A. C. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza online**, Santa Teresa, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>. Acesso em: 9 set. 2021.

BUNDE, D. A. B. **Biorremediação de Cr(III) por bactérias isoladas da macrófita *Hymenachne grumosa***. 2019. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CAPUANA, M. Heavy metals and woody plants-biotechnologies for phytoremediation. **iForest-Biogeosciences and Forestry**, v. 4, n. 1, p. 7, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3832/ifor0555-004>.

CHANDRA, R.; BHARAGAVA, R. N.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J. Bacterial diversity, organic pollutants and their metabolites in two aeration lagoons of common effluent treatment plant (CETP) during the degradation and detoxification of tannery wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2333-2341, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.087>.

CHAUHAN, D., AGRAWAL, G., DESHMUKH, S., ROY, S. S., & PRIYADARSHINI, R. Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation. **RSC advances**, v. 8, n. 66, p. 37590-37599, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8RA06448B>.

CHEUNG, K. H.; GU, J. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 8-15, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096483050600076X>. Acesso em: 17 jun. 2021.

CHEUNG, K. H.; LAI, H. Y.; GU, Ji-Dong. Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW3 with induced expression. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 855-862, 2006.

CHEN, X. C.; WANG, Y. P.; LIN, Q.; SHI, J. Y.; WU, W. X.; CHEN, Y. X. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 46, n. 2, p. 101-107, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.10.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776505003036>. Acesso em: 2 out. 2021.

CHOJNACKA, K. Bioaccumulation of Cr (III) ions by blue-green alga *Spirulina* sp. Part I. A comparison with biosorption. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 218-223, 2007.

CHOPPALA, G.; BOLAN, N.; PARK, J. H. Chromium contamination and its risk management in complex environmental settings. **Advances in Agronomy**, v. 120, p. 129-172, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407686-0.00002-6>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124076860000026>. Acesso em: 18 set. 2021.

COETZEE, J. J.; BANSAL, N.; CHIRWA, E. M. N. Chromium in environment, its toxic effect from chromite-mining and ferrochrome industries, and its possible bioremediation. **Exposure and health**, v. 12, n. 1, p. 51-62, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12403-018-0284-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12403-018-0284-z>. Acesso em: 13 mar. 2021.

COLLINS, M. D.; LUND, B. M.; FARROW, J. A. E.; SCHLEIFER, K. H. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. **Microbiology**, v. 129, n. 7, p. 2037-2042, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-129-7-2037>.

CONAMA, **Resolução N. 430, de 13 de maio de 2011**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Brasil, 2011.

COSTA SÁ, L. M.; ORLANDA, J. F. F. Estudo da cinética da sorção de cromo hexavalente por biomassa fúngica de *Aspergillus ochraceus*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 382-390, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i4.72>. Disponível em: <http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/article/view/727>. Acesso em: 2 out. 2021.

COTORAS, D.; VIEDMA, P.; CIFUENTES, L.; MESTRE, A. Sorption of metal ions by whole cells of *Bacillus* and *Micrococcus*. **Environmental technology**, v. 13, n. 6, p. 551-559, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593339209385183>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593339209385183>. Acesso em: 5 set. 2020.

CUI, Y.; CUI, Y.; HUANG, J. A novel halophilic *Exiguobacterium mexicanum* strain removes nitrogen from saline wastewater via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Bioresource Technology**, v. 333, p. 125189, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125189>.

DA SILVA, C. F.; DE SOUZA, C. B. Protótipo para isolar bactérias biorremediadoras de águas com metais pesados na Baixada Santista. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 14, n. 34, p. 44-58, 2017.

DAS, S., BEHERA, B. C., MOHAPATRA, R. K., PRADHAN, B., SUDARSHAN, M., CHAKRABORTY, A., & THATOI, H. Reduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium mexicanum* isolated from chromite mines soil. **Chemosphere**, v. 282, p. 131135, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131135>.

DASTAGER, S. G.; KUMARAN, D. C.; PANDEY, A. Characterization of plant growth-promoting rhizobacterium *Exiguobacterium* NII-0906 for its growth promotion of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Biologia**, v. 65, n. 2, p. 197-203, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0010-1>.

DEMARCO, Carolina Faccio. **Seleção de macrófitas aquáticas com potencial de fitorremediação no arroio Santa Bárbara, município de Pelotas/RS**. 2016. 55f. Trabalho de Conclusão de curso (Curso de Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

DEMARCO, C. F.; AFONSO, T. F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; CAMARGO, F. A.; 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, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2836-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-018-2836-y>. Acesso em: 28 out. 2021.

DE SOUZA, J. V. T. M.; MASSOCATTO, C. L.; DINIZ, K. M.; TARLEY, C. R. T.; CAETANO, J.; DRAGUNSKI, D. C. Adsorção de cromo (III) por resíduos de laranja in natura e quimicamente modificados. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, p. 3-16, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2012v33n1p3>. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/10048>. Acesso em: 16 nov. 2020.

DHAL, B.; THATOI, H. N.; DAS, N. N.; PANDEY, B. D. and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 250, p. 272-291, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.048>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389413000666>. Acesso em: 13 jul. 2021.

DOGAN, N. M.; KANTAR, C.; GULCAN, S.; DODGE, C. J.; YILMAZ, B. C.; MAZMANCI, M. A. Chromium (VI) bioremoval by *Pseudomonas* bacteria: role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr (VI) contamination. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 6, p. 2278-2285, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/es102095t>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es102095t>. Acesso em: 5 out. 2021.

EDAO, H. G. Heavy metals pollution of soil; toxicity and phytoremediation techniques. **Indian J. Adv. Eng. Res.**, v. 1, n. 1, p. 2456-9992, 2017.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, vol. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/19/2460/230188>. Acesso em: 5 nov. 2021.

EL HASSOUNI, H.; ABDELLAOUI, D.; EL HANI, S.; BENGUEDDOUR, R. Biosorption of cadmium (II) and copper (II) from aqueous solution using red alga (*Osmundea pinnatifida*) biomass. **J. Mater. Environ. Sci.**, v. 5, p. 967-74, 2014.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.

FERNÁNDEZ, P. M.; VIÑARTA, S. C.; BERNAL, A. R.; CRUZ, E. L.; FIGUEROA, L. I. Bioremediation strategies for chromium removal: current research, scale-up approach and future perspectives. **Chemosphere**, v. 208, p. 139-148, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.166>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653518310233>. Acesso em: 26 out. 2020.

FRYZOVA, R.; POHANKA, M.; MARTINKOVA, P.; CIHLAROVA, H.; BRTNICKY, M.; HLADKY, J.; KYNICKY, J. Oxidative stress and heavy metals in plants. **Reviews of environmental contamination and toxicology volume 245**, p. 129-156, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/398_2017_7.

FU, L.; FENG, A.; XIAO, J.; WU, Q.; YE, Q.; PENG, S. Remediation of soil contaminated with high levels of hexavalent chromium by combined chemical-microbial reduction and stabilization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123847, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123847>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389420318367>. Acesso em: 17 set. 2021.

FU, R., CHEN, J., LI, Y. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 770-775, 2007. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(07\)60048-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(07)60048-X).

Fundação MO'Ã. **As plantas aquáticas e a saúde da água**. Santa Maria: 1 ed., [s. n.], 2015. Disponível em: <<https://www.fundacaomoa.org.br/download.php>>. Acesso em: 5 abr. 2022.

GALAL, T. M.; GHARIB, F. A.; GHAZI, S. M.; MANSOUR, K. H. Phytostabilization of heavy metals by the emergent macrophyte *Vossia cuspidata* (Roxb.) Griff.: a phytoremediation approach. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n.

11, p. 992-999, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303816>.

GALAL, T. M.; AL-SODANY, Y. M.; AL-YASI, H. M. Phytostabilization as a phytoremediation strategy for mitigating water pollutants by the floating macrophyte *Ludwigia stolonifera* (Guill. & Perr.) PH Raven. **International Journal of Phytoremediation**, v. 22, n. 4, p. 373-382, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1663487>.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/59/2/309/6075837>. Acesso em: 6 set. 2021.

GONZÁLEZ, P. S.; AMBROSIO, L. F.; PAISIO, C. E.; TALANO, M. A.; MEDINA, M. I.; AGOSTINI, E. Chromium (VI) remediation by a native strain: effect of environmental conditions and removal mechanisms involved. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13551-13559, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3311-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-014-3311-z>. Acesso em 11 out. 2021.

HADAD, H. R.; MAINE, M. A.; BONETTO, C. A. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 63, n. 10, p. 1744-1753, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004565350501088X>. Acesso em 2 out. 2021.

HAOKIP, N.; GUPTA, A. Phytoremediation of chromium and manganese by *Ipomoea aquatica* Forssk. from aqueous medium containing chromium-manganese mixtures in microcosms and mesocosms. **Water and Environment Journal**, v. 35, n. 3, p. 884-891, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/wej.12676>.

IRGAND, B. E.; GASTAL JÚNIOR, C. V. S. **Macrófitas aquáticas da planície costeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1996. p. 9-20.

ISLAM, F.; YASMEEN, T.; ALI, Q.; MUBIN, M.; ALI, S.; ARIF, M. S.; HUSSAIN, S.; RIAZ, M.; ABBAS, F. Copper-resistant bacteria reduces oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 1, p. 220-233, 2016.

JOBBOY, R.; SHAH, K.; SHAH, R.; JHA, P.; DESAI, N. Differential expression of antioxidant enzymes under arsenic stress in *Enterobacter* sp. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 35, n. 6, p. 1642-1645, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ep.12406>.

JOBBOY, R.; JHA, P.; YADAV, A. K.; DESAI, N. Biosorption and biotransformation of

hexavalent chromium [Cr (VI)]: a comprehensive review. **Chemosphere**, v. 207, p. 255-266, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.050>.

KANE, M. D.; POULSEN, L. K.; STAHL, D. A. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 3, p. 682-686, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5354-1>. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.682-686.1993>.

KANWAR, V. S.; SHARMA, A.; SRIVASTAV, A. L.; RANI, L. Phytoremediation of toxic metals present in soil and water environment: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 44835-44860, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10713-3>.

KASANA, Ramesh C.; PANDEY, C. B. Exiguobacterium: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 141-156, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312273>.

KAUR, R.; SHARMA, S.; KAUR, H. Heavy metals toxicity and the environment. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, SP1, p. 247-249, 2019.

KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental pollution**, v. 107, n. 3, p. 263-283, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00168-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749199001682>. Acesso em: 26 set. 2020.

KUMAR, V.; DWIVEDI, S. K. Hexavalent chromium reduction ability and bioremediation potential of *Aspergillus flavus* CR500 isolated from electroplating wastewater. **Chemosphere**, v. 237, p. 124567, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124567>. Acesso em: 2 out. 2021.

LACERDA, F.; NAVONI, J.; AMARAL, V. **A biorremediação: educação em saúde e alternativas à poluição ambiental**. Natal: IFRN, 2019. 80 p.

LATIFI, A.; RUIZ, M.; ZHANG, C. Oxidative stress in cyanobacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 2, p. 258-278, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x>.

LEGUIZAMO, M. A. O.; GÓMEZ, W. D. F.; SARMIENTO, M. C. G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands—a review. **Chemosphere**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.

LEMO, J. L. S.; **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contando metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

LI, C.; WANG, M.; LUO, X.; LIANG, L.; HAN, X.; LIN, X. Accumulation and effects of uranium on aquatic macrophyte *Nymphaea tetragona* Georgi: Potential application to phytoremediation and environmental monitoring. **Journal of environmental**

radioactivity, v. 198, p. 43-49, 2019. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.12.018>.

LI, X.; WANG, Y.; PAN, Y.; YU, H.; ZHANG, X.; SHEN, Y.; JIAO, S.; WU, K. LA, G.;

LI, Z.; MA, Z.; VAN DER KUIJP, T. J.; YUAN, Z.; HUANG, L. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment. **Science of the total environment**, v. 468, p. 843-853, 2014. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.090>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969713010176>. Acesso em: 11 set. 2021.

LINDINO, C. A.; GONÇALVES JR, A. C.; SCHREINER, G. G. O.; SCHREINER, J. S.; DE FARINA, L. O. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 93-98, 2008. DOI:
<https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v30i1.3218>.

LIN, C.; STAHL, D. A. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1348-1351, 1995. DOI:
<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1348-1351.1995>.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).

LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175-190, 2011. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>.

MA, L.; XU, J.; CHEN, N.; LI, M.; FENG, C. Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 170, p. 763-770, 2019. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.041>.

MANDELLI, F. **Estudos dos mecanismos de adaptação ao estresse oxidativo da bactéria termófila *Thermus filiformis***. 2014. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 987 p.

MISHRA, S.; BHARAGAVA, R. N.; MORE, N.; YADAV, A.; ZAINITH, S.; MANI, S.; CHOWDHARY, P. Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. **Environmental biotechnology: For sustainable future**, Singapore, p. 103-125, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_5.

MOHAMED, M. S.; EL-ARABI, N. I.; EL-HUSSEIN, A.; EL-MAATY, S. A.;

ABDELHADI, A. A. Reduction of chromium-VI by chromium-resistant *Escherichia coli* FACU: a prospective bacterium for bioremediation. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 4, p. 687-696, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00771-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12223-020-00771-y>. Acesso em: 18 set. 2021.

MOHAPATRA, R. K., PARHI, P. K., THATOI, H., & PANDA, C. R. Bioreduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium indicum* strain MW1 isolated from marine water of Paradip Port, Odisha, India. **Chemistry and Ecology**, v. 33, n. 2, p. 114-130, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1275586>.

NEDJIMI, B. Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. **SN Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 1-19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04301-4>.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York, 2000.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

OKEKE, B. C. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1571-1579, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0399-5>.

PANDEY, S.; BARAI, P. K.; MAITI, T. K. Influence of heavy metals on the activity of antioxidant enzymes in the metal resistant strains of *Ochrobactrum* and *Bacillus* sp. *Journal of environmental biology*, v. 34, n. 6, p. 1033, 2012.

PANDEY, N.; BHATT, R. Role of soil associated *Exiguobacterium* in reducing arsenic toxicity and promoting plant growth in *Vigna radiata*. **European Journal of Soil Biology**, v. 75, p. 142-150, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.05.007>.

PARK, J. H.; CHON, H. Characterization of cadmium biosorption by *Exiguobacterium* sp. isolated from farmland soil near Cu-Pb-Zn mine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 12, p. 11814-11822, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6335-8>.

PAZ, M. **Canal Santa Bárbara, no bairro Fragata**. Pelotas, 23 abr. 2018. Facebook: Olhares sobre Pelotas. Disponível em: <<https://www.facebook.com/Olharessobrepelotas>>. Acesso em: 21 abr. 2022.

PIASSÃO, J. F. G.; GASPARIN, B. R.; MARTINS, M. C.; DECIAN, V. S.; CANSIAN, R. L.; RESTELLO, R. M.; MIELNIEZKI-PEREIRA, A. A. Análise da bioacumulação de metais e biomarcadores de estresse oxidativo em crustáceos do gênero *Aegla* (Crustacea, Anomura). **Perspectiva**, Erechim, v. 43, n. 161, p. 111-122.

PINO, G. H.; TOREM, M. L. Aspectos fundamentais da bioabsorção de metais não

ferrosos – estudo de caso. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 8, n. 1, p. 57-63, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/tmm.2011.010>.

PIO, M. C. S.; SOUZA, K. S.; SANTANA, G. P. Capacidade da Lemna aequinoctialis para acumular metais pesados de água contaminada. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 203-210, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672013000200011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aa/a/W8XG9Yxj8Qf9kfMQQsTbQ/?lang=pt>. Acesso em: 6 ago. 2021.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. 1 ed. Corumbá: EMBRAPA, 404 p., 2000.

PRABHAKARAN, D. C.; SUBRAMANIAN, S. Studies on the bioremediation of chromium from aqueous solutions using *C. paurometabolum*. **Transactions of the Indian Institute of Metals**, v. 70, n. 2, p. 497-509, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12666-016-1009-2>.

RAHMAN, Z.; SINGH, V. P. Cr (VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr (VI) reductase. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 91, p. 97-103, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830514000742>. Acesso em: 3 nov. 2021.

RAMAN, N. M.; ASOKAN, S.; SHOBANA SUNDARI, N.; RAMASAMY, S. Bioremediation of chromium (VI) by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from tannery effluent. **International journal of environmental science and technology**, v. 15, n. 1, p. 207-216, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1378-z>.

RAMÍREZ-DÍAZ, M. I.; DÍAZ-PÉREZ, C.; VARGAS, E.; RIVEROS-ROSAS, H.; CAMPOS-GARCÍA, J.; CERVANTES, C. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. **Biometals**, v. 21, n. 3, p. 321-332, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>.

REFLORA. *Hymenachne* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13268>>. Acesso em: 10 mai. 2019.

RIBEIRO, M. **Contaminação do Solo por Metais Pesados**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

RIZVI, A.; KHAN, M. S. Biotoxic impact of heavy metals on growth, oxidative stress and morphological changes in root structure of wheat (*Triticum aestivum* L.) and stress alleviation by *Pseudomonas aeruginosa* strain CPSB1. **Chemosphere**, v. 185, p. 942-952, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.088>.

RODRIGUES, D. F.; GORIS, J.; VISHNIVETSKAYA, T.; GILICHINSKY, D.; THOMASHOW, M. F.; TIEDJE, J. M. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov.

Extremophiles, v. 10, n. 4, p. 285-294, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0497-5>.

SADEGHI, R.; SADEGHI, M.; ABDIZADEH, R.; SEDEHI, M.; HASHEMZADEH CHALESHTORI, M.; PARCHAMI BARJUI, S.; ASADI AMIRABADI, M. R. Investigation of Biological Removal of Chromium (VI) Using the Isolated Bacteria from Industrial Wastewater of Mobarakeh Steel Complex in Isfahan. **Journal of Sabzevar University of Medical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 982-994, 2022.

SAHA, P.; SHINDE, O.; SARKAR, S. Phytoremediation of industrial mines wastewater using water hyacinth. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n. 1, p. 87-96, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1216078>.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

SAKAKIBARA, M. Phytoremediation of toxic elements-polluted water and soils by aquatic macrophyte *Eleocharis acicularis*. **AIP Conference Proceedings**, 2016, p. 020038. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4953512>.

SAMANTARAY, D.; MOHAPATRA, S.; MISHRA, B. B. Microbial bioremediation of industrial effluents. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, p. 325-339, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00014-5>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128000212000145>. Acesso em: 6 ago. 2021.

SETHUNATHAN, N.; MEGHARAJ, M.; SMITH, L.; KAMALUDEEN, S. P. B.; AVUDAINAYAGAM, S.; NAIDU, R. Microbial role in the failure of natural attenuation of chromium (VI) in long-term tannery waste contaminated soil. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 105, n. 4, p. 657-661, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.08.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880904002221>. Acesso em: 18 set. 2021.

SHAO, W.; LI, MIN.; TENG, Z.; QIU, B.; HUO, Y.; ZHANG, K. Effects of Pb(II) and Cr(VI) Stress on Phosphate- Solubilizing Bacteria (*Bacillus* SP. Strain MRP-3): Oxidative Stress and Bioaccumulation Potential. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 2172, p. 1-15, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Heavy-metal-intracellular-and-extracellular-bioaccumulation-mmolg-1-dry-weight-of_tbl1_333888583. Acesso em 06/06/2022.

SHARMA, R. K.; BAROT, K.; ARCHANA, G. Root colonization by heavy metal resistant *Enterobacter* and its influence on metal induced oxidative stress on *Cajanus cajan*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 4, p. 1532-1540, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10161>.

SHAW, D. R.; DUSSAN, J. Transcriptional analysis and molecular dynamics simulations reveal the mechanism of toxic metals removal and efflux pumps in

Lysinibacillus sphaericus OT4b. 31. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 46-61, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.016>.

SINGH, P.; ITANKAR, N.; PATIL, Y. Biomanagement of hexavalent chromium: current trends and promising perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 111547, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111547>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479720314729>. Acesso em: 20 jun. 2021.

SRINATH, T.; VERMA, T.; RAMTEKE, P. W.; GARG, S. K. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere**, v. 48, n. 4, p. 427-435, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00089-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653502000899>. Acesso em: 13 set. 2020.

SUN, Y.; LAN, J.; DU, Y.; GUO, L.; DU, D.; CHEN, S.; YE, H.; ZHANG, T. C. Chromium (VI) bioreduction and removal by Enterobacter sp. SL grown with waste molasses as carbon source: impact of operational conditions. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 121974, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121974>.

TABINDA, A. B.; IRFAN, R.; YASAR, A.; IQBAL, A.; & MAHMOOD, A. Phytoremediation potential of Pistia stratiotes and Eichhornia crassipes to remove chromium and copper. **Environmental technology**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1540662>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TANG, J., ZHANG, Y., CUI, Y., & MA, J. Effects of a rhizobacterium on the growth of and chromium remediation by Lemna minor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9686-9693, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4138-y>.

THATOI, H.; DAS, S.; MISHRA, J.; RATH, B. P.; DAS, N. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 146, p. 383-399, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>.

THOMAZ, S. M. SOUZA, D. C. BINI, L. M. Species richness and beta diversity of aquatic macrophytes in a large subtropical reservoir (Itaipu Reservoir, Brazil): the influence of limnology and morphometry. **Hydrobiologia**, v. 505, n. 1-3, p. 119-128, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000007300.78143.e1>.

TIRRY, N.; JOUTEY, N. T.; SAYEL, H.; KOUCHOU, A.; BAHAFID, W.; ASRI, M.; EL GHACHTOULI, N. Screening of plant growth promoting traits in heavy metals

resistant bacteria: prospects in phytoremediation. **Journal of genetic engineering and biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 613-619, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.004>.

ULLAH, A.; HENG, S.; MUNIS, M. F. H.; FAHAD, S.; YANG, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28-40, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>.

UPADHYAYA, A.; SANKHLA, D.; DAVIS, T. D.; SANKHLA, N.; SMITH, B. N. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. **Journal of plant physiology**, v. 121, n. 5, p. 453-461, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80081-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80081-X).

VARDHAN, K. H.; KUMAR, P. S.; PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111197, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732219317684>. Acesso em: 2 ago. 2021.

VISHNIVETSKAYA, T. A.; KATHARIOU, S.; TIEDJE, J. M. The Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography. **Extremophiles**, v. 13, n. 3, p. 541-555, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0243-5>

VULLO, D. L. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. **Química Viva**, v. 2, n. 3, p. 93-104, 2003.

WANG, L.; JI, B.; HU, Y.; LIU, R.; SUN, W. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. **Chemosphere**, v. 184, p. 594-600, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.025>.

WANG, S. S.; YE, S. L.; HAN, Y. H.; SHI, X. X.; CHEN, D. L.; LI, M. BIOSORPTION and bioaccumulation of chromate from aqueous solution by a newly isolated *Bacillus mycoides* strain 200AsB1. **RSC advances**, v. 6, n. 103, p. 101153-101161, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6RA23879C>.

XIN, J.; MA, S.; LI, Y.; ZHAO, C.; TIAN, R. *Pontederia cordata*, an ornamental aquatic macrophyte with great potential in phytoremediation of heavy-metal-contaminated wetlands. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111024, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111024>.

XU, H.; HAO, R. X.; XU, X. Y.; DING, Y.; LU, A. H.; LI, Y. H. Removal of hexavalent chromium by *Aspergillus niger* through reduction and accumulation. **Geomicrobiology Journal**, v. 38, n. 1, p. 20-28, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1807659>.

YAO, Y.; HU, L.; LI, S.; ZENG, Q.; ZHONG, H.; HE, Z. Exploration on the bioreduction mechanisms of Cr (VI) and Hg (II) by a newly isolated bacterial strain *Pseudomonas umsongsensis* CY-1. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.

201, p. 110850, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110850>.

YASIN, N. A.; KHAN, W. U.; AHMAD, S. R.; ALI, A.; AHMED, S.; AHMAD, A. Effect of *Bacillus fortis* 162 on growth, oxidative stress tolerance and phytoremediation potential of *Catharanthus roseus* under Chromium stress. **International Journal Of Agriculture & Biology**, v. 20, n. 7, 2018. DOI: DOI: <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0655>.

ZHANG, K.; LI, F. Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1163-1169, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3120-y>.

ZHANG, Y.; MENG, D.; WANG, Z.; GUO, H.; WANG, Y. Oxidative stress response in two representative bacteria exposed to atrazine. *FEMS microbiology letters*, v. 334, n. 2, p. 95-101, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02625.x>.