SEFIC2017 UNILASALLE
A PESQUISA E O RESPEITO À DIVERSIDADE
16 A 20 DE OUTUBRO DE 2017
ISSN 1983-6783

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PROSPECÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS REDUTORAS DE CROMO HEXAVALENTE PROVENIENTES DO ARROIO ESTÂNCIA VELHA/RS

Luís Felipe da Silveira, Anelise Beneduzi (orient.)
UNILASALLE

Resumo

O Arroio Estância Velha/RS diariamente recebe efluentes cloacais, industriais e contaminantes do setor coureiro, principalmente Cr VI. Devido a isso, a biorredução é uma metodologia que utiliza microrganismos para reduzir o metal (Cr VI a Cr III), a um estado menos prejudicial ao meio ambiente. Assim, pretende-se focar na avaliação da qualidade microbiológica do Arroio Estância Velha, e na prospecção de bactérias redutoras de Cr VI, testá-las quanto ao seu potencial de biorredução e identificar as mais promissoras.

Palavras-chave: *Arroio; Biorredução; Cr VI.*

Área Temática: Ciências Biológicas

1. Introdução - Propósito central do trabalho

Entre os diversos recursos naturais a água é um dos mais importantes para a sobrevivência das espécies. Segundo Shiklomanov (1998), embora 75% da superfície da Terra seja composta de água, a maior parte não está disponível para o consumo humano, pois, desse percentual, 97,5% é de água salgada, encontrada nos oceanos e mares e somente 2,5% é de água doce. A maior parte da água doce (68,9%) está na forma de gelo e neve, outros 29,9% são águas subterrâneas, 0,9% está sob a forma de umidade e somente 0,3% do montante total de água doce está concentrado em mananciais superficiais.

Além disso, nos diferentes setores de atividade, o uso da água é indispensável, como por exemplo, no setor agropecuário, no abastecimento público, na produção industrial, na geração de energia, entre outros. Somente a agricultura, necessita de 70% de toda a água doce utilizada pelo homem. A cada dia, uma maior quantidade de água potável é necessária para suprir a demanda das cidades. Ainda é preciso lidar com a seca, um fator natural que causa a escassez em algumas regiões, e com os danos causados pelo homem. A poluição por esgotos e por diferentes resíduos vem causando uma série de ações que vieram a contaminar diversos mananciais em várias localidades, de forma mais acentuada principalmente após a Revolução Industrial (século XVIII), (CORTEZ, 2004; RODRIGUES e PRADO, 2004).

De acordo com Rodrigues e Prado (2004) e Oliveira et al (2012), no Brasil, um dos principais agentes poluidores dos copos hídricos são os esgotos sanitários. Isso se explica pela deficitária cobertura do tratamento de esgoto no país. Conforme o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (Brasil, 2015), apesar do índice de tratamento ter aumentado em 11% entre 2005 e 2015, apenas 42,7% de todo o esgoto sanitário é tratado, sendo que em algumas regiões o índice ainda é menor que 10%. Um bom indicador da contaminação microbiológica relacionada ao lançamento de esgoto sanitário nos corpos hídricos receptores são as bactérias do grupo coliformes (totais e termotolerantes – *Escherichia coli*) (WHO, 2011).

Os efluentes da atividade industrial, se as normas e legislações vigentes fossem atendidadas, não deveriam alterar as características dos corpos hídricos receptores e não causariam danos. De acordo com Mitteregger-Junior et al (2006), o setor coureiro (indústrias químicas, curtumes e beneficiamentos de couros) é considerado como um dos dez ramos industriais que mais causam prejuízos ambientais. Isso ocorre em função da diversidade de resíduos gerados durante os processos de transformação das peles em couro. Corroborando a isso, Mwinyihija (2011) e Godecke et al (2012) também destacam que nesse ramo industrial, o

ISSN 1983-6783

cromo residual, especialmente na forma oxidada hexavalente, é possivelmente um dos contaminantes mais prejudiciais ao meio ambiente, devido a sua toxicidade.

Frente a isso, diversos estudos estão sendo desenvolvidos ao longo dos anos, com o intuito de buscar diminuir os impactos desses poluentes no meio ambiente. Uma alternativa que vem sendo aprimorada é a biodegradação, sendo esta a utilização de diferentes microrganismos para degradar ou diminuir a presença de diferentes substâncias poluentes. No caso de contaminantes metálicos, um processo utilizado é o de biorredução, que consiste na utilização de métodos biológicos para reduzir o estado de oxidação de metal, tornando-o assim, mais estável e menos prejudicial ao meio ambiente. (PEREIRA e FREITAS, 2012; PARVAZE e OGUNBIYI, 2015).

Portanto, considerando as consequências que diversos agentes poluidores podem acarretar nos corpos hídricos, o presente trabalho objetiva avaliar a qualidade microbiológica da água do Arroio Estância Velha (município de Estância Velha/RS), prospectar bactérias redutoras de cromo hexavalente do sedimento e avaliá-las quanto ao seu potencial de biorredução, além de identificar o gênero e/ou espécie dos isolados bacterianos mais promissores.

2. Marco Teórico

2.1 Qualidade da água

A água *in natura* ou bruta, disponível na natureza, não é própria para o consumo, isso ocorre devido à presença de substâncias como, por exemplo, sais minerais, material orgânico, partículas em suspensão e/ou dissolvidas, as quais provem do próprio ambiente natural ou foram introduzidas a partir de atividades humanas. Sendo assim, para caracterizar a qualidade da água, são determinados diversos parâmetros, os quais representam as suas características físicas, químicas e biológicas (DI BERNARDO e SABOGAL PAZ, 2008).

De acordo com Braga et al. (2005), os indicadores físicos e organolépticos, compreendem cor, turbidez, sabor, odor, sólidos, condutividade elétrica e temperatura. A cor é oriunda da existência de substâncias dissolvidas, geralmente, de natureza orgânica. A turbidez ocorre devido à presença de materiais em suspensão (partículas coloidais), que desviam os raios luminosos. Já o sabor e odor estão ligados à existência de poluentes industriais ou de outras substâncias indesejadas, como material orgânico em decomposição, algas, poluentes domésticos, entre outros. O teor de sólidos decorre da presença de sólidos em suspensão ou dissolvidos. A condutividade está relacionada com a presença de íons dissolvidos na água, que são partículas carregadas eletricamente e a temperatura é entendida como a medida da intensidade de calor.

As características químicas se evidenciam por elementos ou compostos químicos na água, comumente determinadas por meios analíticos, citando: a salinidade, a dureza, a alcalinidade, o pH, acidez, ferro e manganês, impurezas orgânicas, nitrogênio e cloretos, compostos tóxicos, fenóis, detergentes, agrotóxicos e radioatividade (DI BERNARDO e SABOGAL PAZ, 2008), (BRAGA et al, 2005). Dentre esses, cabe destacar o pH, a dureza, a alcalinidade e matéria orgânica, pois são de grande relevância nos processos de tratamento. O pH é utilizado para indicar a acidez de uma solução, sendo que baixos valores de pH podem causar corrosão e valores altos, incrustações. A dureza é conferida à água pela presença de íons de Cálcio (Ca^{+2}), Magnésio (Mg^{+2}) e mais raramente, Estrôncio (Sr^{+2}). A alcalinidade ocorre devido à presença de bicarbonatos (HCO_3^-), carbonatos (CO_3^{2-}) ou hidróxidos (OH^-) (NETTO e RICHTER, 1991). A matéria orgânica indica o grau de poluição de um manancial, devido à presença de compostos constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, além de outros elementos como nitrogênio, fósforo e enxofre. Em grandes quantidades, no entanto, podem causar alguns problemas, como: cor, odor, turbidez e consumo do oxigênio dissolvido (pelos organismos decompositores). O consumo de oxigênio é um dos problemas mais sérios decorrentes do aumento do teor de matéria orgânica, pois provoca desequilíbrios ecológicos, podendo causar a extinção dos organismos aeróbios.

ISSN 1983-6783

Com relação às características biológicas da água segundo Braga et al. (2005), pode-se destacar dois indicadores importantes: algas e microrganismos patogênicos. As algas, apesar de sua importância na manutenção do equilíbrio natural, podem também gerar alguns problemas, como a concentração de grande massa orgânica, levando à formação de lodo e à liberação de compostos orgânicos. Já os microrganismos patogênicos, são oriundos do despejo de esgoto cloacal, caracterizado pelo elevado índice de matéria fecal existente.

2.2 Coliformes Totais e Termotolerantes

Dentre os microorganismos patogênicos, as bactérias do grupo coliforme (totais e fecais) são consideradas bons indicadores de contaminação fecal e têm sido utilizadas há vários anos na avaliação da qualidade microbiológica de amostras ambientais.. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo (BRASIL, 2013). As bactérias coliformes totais são bacilos Gram-negativos que incluem uma ampla gama de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativos. Não são formadoras de esporos e são capazes de crescer na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, realizando a fermentação de lactose e produção de ácido, gás e aldeído em 24-48 horas a 35 ± 0,5°C, e que podem apresentar atividade da enzima ß – galactosidase (WHO, 2011). Já as bactérias do grupo dos coliformes fecais, também conhecidas como termotolerantes, são aquelas e podem fermentar a lactose a temperaturas mais elevadas (44,5 ± 0,2°C), em um período de 24 horas. Seu principal representante é a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal (BRASIL, 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), é importante, conhecer a estimativa dessas bactérias, pois esta indica o grau e contaminação de um corpo hídrico o que, por consequência, pode representar riscos à saúde.

2.3 Arroio Estância Velha

O município de Estância Velha está localizado na região da encosta inferior do nordeste do Rio Grande do Sul e é limitado ao norte com Ivoti e Lindolfo Collor, ao sul com Novo Hamburgo e São Leopoldo, a leste com Novo Hamburgo e a oeste com Portão. Ocupa um território de 52,1 km² da região metropolitana de Porto Alegre, com um grau de urbanização de 97%. Atualmente, sua economia baseia-se, essencialmente, no setor de serviços e indústria (curtume e insumos químicos do setor calçadista) e minoritariamente, na agricultura (Estância Velha, 2017a).

De acordo com o Plano Municipal de Saneamento Ambiental (PMSBEV), situado no trecho médio da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, o Arroio Estância Velha é um dos formadores do arroio Portão que, tem sua foz no Rio dos Sinos. O arroio Estância Velha/Portão tem 20 km de extensão e no interior do município de Estância Velha, possui extensão aproximada de 8 km, atravessando a sede deste, onde o canal principal do arroio apresenta como uso preponderante a condução de águas pluviais, efluentes industriais, especialmente do setor coureiro e esgotos cloacais (Estância Velha, 2017ª). Conforme dados do SNIS (Brasil, 2017), somente 2,84% do esgotamento sanitário do município é coletado e desse montante apenas 17,57% é tratado.

2.4 Poluentes do Setor Coureiro

Entre as diferentes atividades desenvolvidas no setor coureiro, uma das que se apresenta com maior potencial poluidor é a de curtume devido às especificidades da mesma que exige uso de grande volume de água e edição de substâncias tóxicas (SOUZA et al, 2013). Segundo Mota (2001), Mitteregger-Junior et al (2006) e Hu et al (2010), o processamento das peles propiciam a formação de material graxo, detergentes, compostos inorgânicos e outras substâncias dissolvidas que atribuem aos efluentes um alto teor de sulfetos, material orgânico, DQO, DBO e sais dissolvidos.

ISSN 1983-6783

Dentro os diferentes poluentes, ainda se tem a presença de cromo (Cr) hexavalente (Cr^{+6}), originado da oxidação do Cr^{+3} a Cr^{+6} durante o processo de curtimento. A preocupação da presença de Cr^{+6} se dá em função de propriedades cancerígenas, mutagênicas, teratogênicas e alergênicas comprovadas, para organismos vivos, podendo causar grandes mortandades de peixes e microrganismos (HU et al, 2010; MWINYIHIJA, 2011; GODECKE et al, 2012). A forma hexavalente é 1000 vezes mais tóxica que a trivalente, devido ao seu alto poder oxidativo, especialmente na forma do ânion cromato. Dessa forma, o Cr^{+6}, devido à sua elevada solubilidade em água, pode penetrar rapidamente através das membranas celulares e subsequente interação com proteínas intracelulares e ácidos nucleicos, ocasionando desequilíbrios nos sistemas biológicos (ACKERLEY et al, 2006; MITTEREGGER-JUNIOR et al, 2006). De acordo com Cood et al (2001), Conceição et al (2007) e Mwinyihija (2011), a forma trivalente do cromo é mais estável e apresenta baixa toxicidade.

2.5 Biodegradação e Biorredução

Dentre inúmeras maneiras de eliminar ou reduzir contaminantes no meio ambiente, o processo de biodegradação pode se apresentar interessante do ponto de vista econômico quando comparado com outras formas de tratamento que utilizam processos físico-químicos, tais como o de floculação e eletrólise (PINTO et al., 2003). O principal propósito da biodegradação é promover a ocorrência dos processos biológicos de degradação de compostos de interesse, orgânicos ou inorgânicos. Vários organismos podem ser utilizados na biodegradação, como bactérias, fungos ou plantas, e a eficiência de um ou outro depende, em muitos casos, da estrutura da molécula e da presença de enzimas hábeis em degradar o produto, as quais apresentam especificidade para a maioria dos substratos (PEREIRA e FREITAS, 2012).

Os microrganismos, tanto fungos quanto bactérias, mostram-se bem eficientes no tratamento de áreas impactadas por rejeitos com elevado nível de contaminantes tóxicos, sendo necessário apenas estabelecer as condições nutricionais e ambientais favoráveis ao seu metabolismo, e aproveitando da sua capacidade inerente de resistência aos metais. Dentre as vantagens que tornam os microrganismos importantes para o tratamento de resíduos podem ser citados: o crescimento acelerado, a tolerância a condições ambientais extremas e, em geral, o baixo custo de cultivo (SIMÕES e TAUK-TORNISIELO, 2005). Conforme Rahatgaonkar e Mahore (2008), no caso de íons metálicos, a biodegradação através de biorredução possibilita a sua redução do estado de oxidação potencialmente mais nocivo, tóxico e instável, para uma forma mais estável e menos prejudicial ao meio ambiente. No caso da biorredução de Cr^{+6}, Lloyd (2003) destaca que uma vasta gama de bactérias anaeróbias facultativas, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Shewanella oneidensis* e linhagens de *Aeromonas*.

3. Metodologia

3.1 Área de estudo e amostragem

A área de estudo compreende toda a extensão do Arroio Estância Velha, localizado no município de Estância Velha/RS. Para isso, os pontos de coleta foram definidos conforme as características geográficas do arroio e, assim, como ponto branco, ficou definido a nascente (P.1). Considerando as ocupações antrópicas e industriais, ficou estabelecido como sendo o ponto 2 (P.2) a montante da área de maior demografia e o ponto 3 a jusante e próximo do encontro com o Arroio Portão (P.3). Na figura 1 é possível verificar a demarcação do manancial, assim como os pontos de amostragem.

ISSN 1983-6783

3.2 Coleta de amostras de água e de sedimento

A coleta das amostras de água para a análise da qualidade microbiológica e de sedimento para o isolamento das bactérias redutoras de cromo hexavalente será realizada com o uso de frascos plásticos de 2.000 mL (2L) e vidros âmbar 1.000 mL (1L), devidamente esterilizados. Após a coleta das amostras de águas, os frascos serão imediatamente lacrados e refrigerados a 4 ± 2°C, para o transporte, mantendo-os sob refrigeração e protegidos da luz até o momento das análises.

3.3 Análises microbiológicas de qualidade da água

Para a determinação de coliformes totais e fecais (termotolerantes) será utilizada a técnica quantitativa em tubos com o uso de substrato cromogênico/enzimático Colilert® (*Idexx*). O método considera que as bactérias presentes em uma amostra estão agrupadas em colônias, mas podem ser separadas resultando em uma suspensão de células individuais. As amostras são inoculadas em volumes decrescentes em séries de 5 tubos, obtendo ao final uma possibilidade de combinação de resultados positivos e negativos que estima a provável densidade original das bactérias - Número Mais Provável (NMP) em uma quantidade de 100mL.

O Colilert® é um substrato Orto-Nitrofenil β-D-Galactopiranosídeo–4-Metil-Umbeliferone (ONPG-MUG), que à medida que os coliformes se reproduzem no meio, eles utilizam β-D-galactosidase para metabolizar o indicador de nutriente ONPG e alterá-lo de incolor para amarelo. Já a *E. coli* utiliza a enzima β-D-glucoronidase para metabolizar 4-methyl-umbelliferil-β-D-glucoronídeo (MUG) e criar fluorescência. Já que a maioria dos não coliformes não conta com estas enzimas, eles não podem se reproduzir e interferir. Os poucos não coliformes que têm estas enzimas são seletivamente suprimidos pela matriz especificamente formulada para isso. Com resultados confirmativos em 24 horas para presença de coliformes totais pelo desenvolvimento de coloração amarela e, para *Escherichia coli*, a observação de fluorescência quando a amostra estiver sob fonte com comprimento de onda de 366nm (lâmpada U.V.), não se tem a necessidade da adição de outros reagentes para confirmação. A utilização do substrato é reconhecido pela EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) e incluído no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (IDEXX, 2002).

3.4 Prospecção de isolados bacterianos biorredutores de cromo hexavalente

Será utilizada a metodologia descrita por Conceição et al (2007) para a seleção de bactérias redutora de Cr^{+6}, onde amostras de um grama de sedimento serão adicionadas a 200mL de caldo nutritivo com 500mg.L^{-1} de $K_2Cr_2O_7$ e incubadas por 24 horas, a 150rpm e a 30°C. Após este período, 200 ul serão transferidos para outro frasco com o mesmo meio e incubado nas mesmas condições (sendo este processo repetido três vezes), sendo então retirados 100ul para o plaqueamento em ágar nutritivo contendo 500 mg.L^{-1} de Cr^{+6}, realizando-se então o isolamento de colônias puras.

Os isolados obtidos serão avaliados quanto à capacidade de crescimento em caldo nutritivo contendo diferentes concentrações de $K_2Cr_2O_7$. As colônias puras inoculadas em frascos contendo 30ml de caldo nutritivo com 250 e 500mg.L^{-1} de Cr^{+6} e incubadas por 24 horas, a 150rpm e 30°C, sendo o inóculo padronizado a uma absorbância de 0,3, em espectrofotômetro a 600nm. Após incubação por 24 horas, a 150rpm e 30°C, serão determinadas a densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 600nm e a concentração final do Cr^{+6} no caldo nutritivo, com o reagente de s-difenilcarbazida em espectrofotômetro a 540nm (GRANER, 1972 *apud* CONCEIÇÃO et al, 2007).

ISSN 1983-6783

3.5 Teste de biorredução de cromo hexavalente com os isolados bacterianos obtidos

Para o teste de biorredução de Cr^{+6}, será utilizada a metodologia proposta por Conceição et al (2007), em que a atividade enzimática de redução do Cr^{+6} será determinada com o extrato celular dos isolados, através de sonicação das células em banho de gelo com três pulsos de 20 segundos, a 35W e centrifugadas a 10.000rpm, por 45 minutos, para a retirada de restos celulares. Em seguida, as células serão ressuspendidas em 10mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0), sendo quantificada a concentração de proteína no sobrenadante, conforme descrito por Bradford (1976).

Para avaliar o efeito de diferentes íons na atividade da enzima redutora de cromo, será preparada a reação com NADH (0,2mM), tampão fosfato (50mM, pH 7,0) com Cr^{+6} ($1mg.L^{-1}$) e o íon a ser testado. O volume final da reação será de 1,5ml, sendo incubado a 30°C por 15 minutos. Após este período, a solução de s-difenilcarbazida será adicionada, procedendo-se à análise em espectrofotômetro 540nm. O teste será realizado com a mesma concentração de proteína presente no extrato celular, para todos os isolados. Neste teste, os isolados vão ser comparados com o *Bacillus* sp. ES29, uma bactéria comprovadamente redutora de cromo hexavalente, isolada por CAMARGO et al. (2003).

Como inibidores, serão testados íons, adicionados à mistura de reação na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês e sulfato de sódio, todos na concentração de 1mM.

3.6 Extração do DNA dos isolados bacterianos redutores de cromo hexavalente

O DNA total dos isolados será extraído através do método de fenol-clorofórmio com modificações (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). As células previamente crescidas terão uma alíquota de 1,5mL centrifugada por 3 minutos a 12.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, será adicionado ao precipitado 700µL de TES (10mL/L de Tris 1M pH 8; 50mL/L de EDTA 0,5M pH 8 e 30mL/L de NaCl 5M), e novamente centrifugados por 5 min a 12.000 rpm. O sobrenadante será novamente descartado e então adicionado 500µL de TE1 (10mL/L de Tris 1M pH 8 e 50mL/L de EDTA 0,5M pH 8) e 25µL de lisozima e então incubado a 37°C por 1 hora. Após as amostras esfriarem a temperatura ambiente, será adicionado 108µL de dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) quente e 19µL de proteinase K e então incubado a 60°C por 15 minutos. Será adicionado 200µL de acetato de amônia 7,5M e acondicionado no gelo por 15 minutos. As amostras serão novamente centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante será transferido para novo tubo e adicionado 1 volume de clorofórmio, e novamente centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. Serão adicionados 8µL de cloreto de sódio 5M e 0,6 volumes de isopropanol gelado, mantido no gelo por 10 minutos e após centrifugado por 15 minutos a 12.000rpm. Após as amostras secarem em temperatura ambiente o precipitado será ressuspendido em 30 µL de TE2 (10mL/L de Tris 1M pH 8 e 2mL/L de EDTA 0,5M pH 8).

3.7 Amplificação parcial do gene 16S rRNA

Os isolados mais promissores nos testes de biorredução de cromo hexavalanete serão identificados através de sequências parciais do gene 16S rRNA (1400 pares de bases) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BacPaeF (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3') (STACKEBRANDT e LIESACK, 1993) e Bac1542R (5' AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC3') (EDWARDS *et al.*, 1989). A reação de amplificação terá os seguintes reagentes: 1 µL de DNA molde; 2,5 µL do tampão da *Taq* DNA polimerase 10x; 0,25 µL de uma solução com 0,15 mmol L-1 de cada DNTP; 1,5 µL de MgCl2 50 mmol L-1; 1,25 µL de cada oligonucleotídeo 10 mmol L-1; 1 U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*) e água ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. As reações serão realizadas com um ciclo inicial de desnaturação a 94ºC por 5 min, seguido por 37 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por: 1 fase de desnaturação de 1 min a 94°C, 1 fase de anelamento de 1 min a 50°C e uma fase de extensão de 1 min 10 segundos a 72°C.

ISSN 1983-6783

A extensão final terá um ciclo a 72ºC por 5 min. As reações serão realizadas em um termociclador *Veriti* 96 well (*Applied Biosystem*). Os produtos de amplificação serão corados com *blue green* e visualizados em gel de agarose 1%. Será utilizado o marcador molecular 1 Kb *plus* DNA *ladder* (*Invitrogen*). Os fragmentos obtidos serão sequenciados em uma orientação no laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia, UFRGS e após serão comparados com as sequências disponíveis no banco de dados através do programa BLASTN (*National Center for Biotechnology Information*, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

4. Considerações Finais

Este trabalho trata de um projeto do Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais da Universidade La Salle/Canoas-RS e, portanto, ainda não dispõe de resultados. No entanto, conforme a literatura pesquisada, algumas bactérias do gênero *Bacillus* tem potencial biorredutor de Cromo Hexavalente, possibilitando assim, a execução e o desenvolvimento desse trabalho.

Referências

ACKERLEY, D.F; et al. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 188: 3371-3381. 2006

BRAGA, Benedito et al. **Introdução à engenharia ambiental:** o desafio do desenvolvimento sustentável. 2 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, New York, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2015.** Brasília: SNSA/MCIDADES, 2017.212 p. Disponível em: < http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2015> Acesso em 13 mai. 2017.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde** – 4. ed. – Brasília : Funasa, 2013. 150 p. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manual_pratico_de _analise_ de_agua_2.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2017.

CAMARGO F.A. et al. Chromate reduction by chromiumresistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.32, n.4, p.1228-1233, 2003.

CODD, R. et al. Studies on the Genotoxicity of Chromium: from the test tube to the cell. **Coordination Chemistry Reviews**, v.4, n.216, p.537, 2001. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854500004082>. Acesso em: 16 mai. 2017.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**; Organizadores: Carlos Jesus Brandão ... [et al.]. -- São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

CONCEIÇÃO, Daniele; et al**.** Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo. **Ciência Rural.** Santa Maria, v.37, n.6, p.1661-1667, 2007. Disponível em: http://coral.ufsm.br/ccrrevista/. Acesso em: 16 mai. 2017.

CORTEZ, H. **Aquecimento Global e Água**. 1. ed., 2004. Disponível em: <http://www.ipcp.org.br/References/Agua/aguaCiclo/AquecimentoGlobal.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2017.

DI BERNARDO, Luiz; SABOGAL PAZ, Lyda Patricia. **Seleção de Tecnologias de Tratamento de água.** São Carlos: LDIBE, 2008.

ISSN 1983-6783

EDWARDS, U.; ROGALL T.; BLOCKERL H.; EMDE, M.; BOTTGER, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 19, p. 7843-7853, 1989.

ESTÂNCIA VELHA. **Plano Municipal de Saneamento Ambiental.** 2014. Disponível em < http://www.consorcioprosinos.com.br/downloads/EST%C3%82NCIA%20VELHA_PMSB_rev_0_pdf.pdf. > Acesso em: 13 mai. 2017. (a)

ESTÂNCIA VELHA. **Secretaria de Meio Ambiente e Preservação Ecológica**. Diagnóstico da qualidade ambiental do arroio Estância Velha. Disponível em < http://www.estanciavelha.rs.gov.br/meioambiente> Acesso em: 14 mai. 2017. (b)

GODECKE, Marcos Vinicius; et al. Resíduos de curtumes: estudo das tendências de pesquisa. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.** v(7), nº 7, p. 1357-1378, 2012. Disponível em: < https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/5779/3600>. Acesso em: 16 mai. 2017.

IDEXX. **Colilert**. Estados Unidos: 2002. Disponível em: <https://www.idexx.com/pdf/en_us/water/6406300l.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2017.

HU, J. et al. Ecological utilization of leather tannery waste with circular economy model **Journal of Cleaner Production. China:** 2010, p. 221 – 228. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222654358_Ecological_utilization_of_leather_tannery_waste_with_circular_economy_model. Acesso em: 17 mai. 2017.

LLOYD, Jonathan R. Microbial reduction of metals and radionuclides. **FEMS Microbiology Reviews**. 27 411- 425. 2003.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Willians and Wilkings, 1980. 928p.

MITTEREGGER JÚNIOR, H. et al. Avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do Arroio Estância Velha, região coureira-calçadista, utilizando *Allium cepa.* **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**. v.1, p.147-151, 2006. Disponível em: < http://institutossenai.org.br/public/files/avaliacao-das-atividades-toxicas-e-mutagenicas-da-agua-e-do.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2017.

MOTA, J. da S. **Eco-Eficiência:** avaliação da sustentabilidade de indústria de couro no ms. Brasília, 2001. 106 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade Brasília, Brasília, 2001.

MWINYIHIJA, Mwinyikione. Essentials of ecotoxicology in the tanning industry. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology.** Vol. 3(13), pp. 323-331, 2011. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/journal/JECE/article-abstract/E5BDF8C2174>. Acesso em: 16 mai. 2017.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **National Library of Medicine.** USA. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Acesso em: 19 mai. 2017.

NETTO, José M.; RICHTER, Carlos A. **Tratamento de água - tecnologia atualizada.** São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1991.

OLIVEIRA, Joana. P. W.; SANTOS, Raissa. N.; PIBERNAT, Cristiane. C.; BOEIRA, Jane. M. Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando Allium cepa e Eichhornia crassipes como bioindicadores**. Biochemistry and Biotechnology Reports.** v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/13186>. Acesso em 14 mai. 2017.

PARVAZE, Ahmad Wani; OGUNBIYI Haruna Ayoola. Bioreduction of Cr (VI) by Heavy Metal Resistant *Pseudomonas* Species**. Journal of Environmental Science and Technology***, 8: 122-130,* 2015.

PEREIRA, Aline Ramalho Brandão; FREITAS, Diego Antônio França de. **Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes Impactados.** Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. v(6), nº 6, p. 975 – 1006, 2012.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITÃO, M. A. S.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLO, P. Heavy metal-inducedoxidative stress in algae. ***J. Phycol.*** , v. 39, p. 1008-1018, 2003.

ISSN 1983-6783

RAHATGAONKAR, A. M.; MAHORE, N. R. A Selective Bioreduction of Toxic Heavy Metal Ions from Aquatic Environment by *Saccharomyces cerevisiae.* **E-Journal of chemistry.** Vol. 5, No.4, pp. 918-923, 2008.

RODRIGUES, Simone C.; PRADO, Isaura M.M. **Agentes poluidores de Águas**. Revista Arquivos do MUDI. Maringá, v. 8, p 40-45, 2004. Disponível em < http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/20549/10785>. Acesso em 14 mai. 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3 ed. Nova York: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SIMÕES, M. L. G.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo de diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. ***HOLOS Environ***. 94, v.5, n.2, 2005.

SHIKLOMANOV, I. S. **World Water Resources – A New Appraisal and Assessment for the 21 st Century.** Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization – UNESCO, 1998. p.7

SOUZA, EG., *et al*. Impactos ambientais no setor coureiro-calçadista em Campina Grande – PB: uma análise quanto à utilização do cromo no processo produtivo. In:***Gestão sustentável dos recursos naturais*: uma abordagem participativa.** Campina Grande: EDUEPB, 2013, pp. 251-271. Disponível em: http://books.scielo.org/id/bxj5n/pdf/lira-9788578792824-11.pdf. Acesso em: 16 mai. 2017.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. **Nucleic acids and classification.** London: Academic Press, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality.** World Health Organization. Genebra: 2011. 564p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf> Acesso em 16 mai. 2017.