

À professora Dra. Paula Morais agradeço ter-me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, bem como o incansável apoio, paciência, motivação e disponibilidade para a execução deste trabalho.

À Rita Branco agradeço toda a disponibilidade, paciência, apoio e ajuda na execução do trabalho.

Ao Tiago Natal-Luz agradeço toda a ajuda e disponibilidade nos ensaios como os colêmbolos.

Ao Dr. Luís Manso-Preto e a Dra Lúcia Soares agradeço toda a disponibilidade na análise de amostras pelo Método 7199.

A toda a minha família agradeço toda a compreensão, todo o apoio incondicional, paciência e força.

À Ana Cainço, à Ana Pires, à Joana, á Laura, à Mariana e ao Paulo por toda a paciência, ajuda, amizade e sobretudo pelos bons momentos que passámos ao longo destes dois anos.

A todos os meus colegas de laboratório agradeço, todo o apoio, companheirismo, paciência, e sobretudo boa disposição que demonstraram ao longo deste ano.

A todos, o meu muito obrigado.



Índice de Figuras e Tabelas

Abreviaturas

Resumo.....	V
<i>Abstract</i> .....	IX
1. Introdução.....	-1-
1.1. Crómio (Cr).....	- 3 -
1.2 Solo.....	- 6 -
1.3 Interação do solo com o Crómio .....	- 8 -
1.4. Biossensores .....	- 13 -
1.4.1 O Componente Biológico.....	- 15 -
1.4.2. Sistema de Transdução do sinal .....	- 17 -
1.4.3. Critérios importantes no desenvolvimento de um biossensor.....	- 18 -
1.5. Métodos de quantificação do Cr (VI):.....	- 20 -
1.6. Espectroscopia de Fluorescência ou Fluorimetria .....	- 21 -
1.7. Método da difenilcarbazida .....	- 22 -
1.8. Avaliação ecotoxicológica dos solos .....	- 22 -
2. Objetivos.....	-25-
3. Materiais e Métodos.....	-29-
3.1. Amostras de solo.....	-31-
3.2. Estirpes bacterianas e construções .....	-31-
3.3. Soluções .....	-31-
3.4. . Meios de Cultura .....	-32-
3.5. Protocolo Experimental .....	-32-
3.5.1. Cultivo das células bacterianas (adaptado de Branco et al., 2013).....	-32-
3.5.2. Curva (s) de calibração.....	-32-
3.5.3. Quantificação de Crómio (VI) (adaptado de Branco et al., 2013) .....	-33-
3.5.4. Contaminação artificial dos solos (adaptado de Joan Cáliz et al., 2012) .....	-33-
3.5.5. Extração de Cr(VI) no solo (adaptado de et al., 2005; Ivask et al., 2002).....	-33-
3.5.6. Teste ecotoxicológico (adaptado de Natal-Luz et al., 2011) .....	-33-
3.5.6.1 Organismos teste e condições de cultura .....	-34-
3.5.6.2 Teste de reprodução com colêmbolos .....	-34-

3.5.6.3	Determinação de EC50s .....	-34-
3.5.7.	Análise Química de Cr (VI) – Método de difenilcarbazida .....	-35-
3.5.8.	Análise química de Cr (VI) -Cromatografia Iônica (Método EPA 7199) .....	-35-
3.5.9.	Análise Estatística .....	-36-
4.	Resultados	
4.1.	Otimização das condições de crescimento das construções bacterianas na presença de Crômio (VI).....	-39-
4.2.	Otimização das condições de quantificação do crômio pelos biossensores.....	-40-
4.3.	Curva de calibração dos biossensores.....	-43-
4.4.	Curva de calibração do método de difenilcarbazida.....	-45-
4.5.	Otimização da metodologia de extração do Cr (VI) presente no solo.....	-45-
4.6.	Determinação do Cr (VI) presente no solo.....	-49-
4.7.	Avaliação da especificidade e sensibilidade dos biossensores.....	-58-
5.	Discussão.....	-61-
6.	Conclusão.....	-67-
7.	Referências Bibliográficas.....	-71-

## Índice de Figuras e Tabelas

<b>Figura 1</b> -Mineral cromite (adaptado de <a href="http://www.psem.ph/downloads/articles/chromite.jpg">http://www.psem.ph/downloads/articles/chromite.jpg</a> ).-	3 -
<b>Figura 2</b> -Diagrama representativo da capacidade mutagénica e toxicidade do Cr (VI) nas células (adaptado de Cheung e Gu, 2007).....	5 -
<b>Figura 3</b> - Mecanismo de transporte, toxicidade e resistência do cromato em células bacterianas (adaptado de Ramirez-Diaz et al., 2008).....	6 -
<b>Figura 4</b> -Composição e textura dos diferentes tipos de solo (adaptado de Cavalcanti, 2010).- 7 -	-
<b>Figura 5</b> – Processos biogeoquímicos que afetam as espécies de crómio presentes no meio ambiente aquático (adaptado de Unceta et al., 2010).....	8 -
<b>Figura 6</b> - Espécies presentes a diferentes valores de pH (adaptado de Dhal et al., 2013). ...	11 -
<b>Figura 7</b> - Ciclo de oxidação-redução do crómio no solo (Kotaš and Stasicka 2000). ....	12 -
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática de um biossensor. (Adaptado de Vargas-bernal et al., 2012) .....	13 -
<b>Figura 9</b> -Classificação dos biossensores (adaptado de Lei, et al., 2006; Mello e Kubota, 2002; Andrade, 2010).....	14 -
<b>Figura 10</b> - Mecanismos de funcionamento do biossensor microbiano (Adaptado de Strosnider, 2003).. .....	16 -
<b>Figura 11</b> -Transposição Tn <i>Otchr</i> da estirpe <i>Ochrobactrum tritici</i> 5bv11 (adaptado de Branco et al., 2008).....	17 -
<b>Figura 12</b> - Diagrama esquemático dos plasmídeos.....	17 -
<b>Figura 13</b> -Fluorímetro <i>Multi-well</i> . .....	21 -
<b>Figura 14</b> - Otimização das condições de crescimento para a pCHRGFP1 <i>E. coli</i> . LB-meio <i>Luria Bertani</i> (LB); MMT-meio mínimo tamponizado com Tris; MMT+gluc. – Meio mínimo tamponizado com Tris suplementado com 0,3% de glucose.....	39 -
<b>Figura 15</b> - Otimização das condições de quantificação do Cr (VI). Variação da fluorescência em relação ao tipo de placa, ao comprimento de onda utilizado, o tempo de incubação e a concentração de cromato.....	41 -

<b>Figura 16-</b> Otimização das condições de quantificação da fluorescência emitida pelas construções bacterianas, para diferentes intervalos de comprimento de onda, em microplaca <i>multi-well</i> 96 poços transparente.....	- 41 -
<b>Figura 17-</b> Otimização das condições de quantificação o Cr (VI), para os diferentes comprimentos de onda de excitação: (A) 470nm, (B) 475nm, (C) 480nm, para a microplaca <i>multi-well</i> de 96 poços transparente.....	- 42 -
<b>Figura 18-</b> Resposta do biossensor pCHRGFP1 <i>E. coli</i> para diferentes concentrações de cromato, ao fim de 0 horas (azul), 3horas (vermelho) e 5horas (verde) de incubação.....	- 43 -
<b>Figura 19-</b> Resposta do biossensor da pCHRGFP2 <i>O. tritici</i> para diferentes concentrações de cromato, ao fim de 0 horas (azul), 3horas (vermelho) e 5horas (verde) de incubação.....	- 44 -
<b>Figura 20-</b> Curva de calibração de pCHRGFP1 <i>E. coli</i> . Ao fim de 3 horas (vermelho) e 5 horas (verde). .....	- 44 -
<b>Figura 21-</b> Curva de calibração de pCHRGFP2 <i>O. tritici</i> . Ao fim de 3 horas (vermelho) e 5 horas (verde).....	- 45 -
<b>Figura 22-</b> Curva de calibração do método de difenilcarbazida.....	- 46 -
<b>Figura 23-</b> Otimização do tempo de extração de cromato de solo natural. Resultados obtidos com os biossensores desenvolvidos. ....	- 47 -
<b>Figura 24-</b> Otimização do tempo de extração do cromato do solo natural. Resultados obtidos pelo método da difenilcarbazida .....	- 48 -
<b>Figura 25 -</b> Otimização do tempo de extração de cromato de solo OCDE. Resultados obtidos com os biossensores. ....	- 48 -
<b>Figura 26 -</b> Otimização do tempo de extração do cromato do solo OCDE- Resultados obtidos pelo método da difenilcarbazida. ....	- 49 -
<b>Figura 27-</b> Quantificação do cromato no solo natural, ao longo de 28 dias, com os biossensores pCHRGFP1 <i>E. coli</i> e pCHRGFP2 <i>O. tritici</i> .....	- 51 -
<b>Figura 28-</b> Quantificação do cromato no solo natural, ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida. ....	- 51 -
<b>Figura 29-</b> Quantificação do cromato no solo OCDE, ao longo de 28 dias, com os biossensores pCHRGFP1 <i>E. coli</i> e pCHRGFP2 <i>O. tritici</i> .....	- 52 -
<b>Figura 30-</b> Quantificação do cromato no solo OCDE, ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida. ....	- 52 -

**Figura 31-** Resultado do teste da reprodução dos colêmbolos para o solo natural..... - 53 -

**Figura 32** -Resultado dos no teste da reprodução dos colêmbolos para o solo OCDE. .... - 54 -

**Figura 33-** Quantificação do cromato no solo natural com colêmbolos, ao longo de 28 dias, através de biossensores..... - 55 -

**Figura 34-** Quantificação do cromato no solo natural com colêmbolos, ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida... .. - 55 -

**Figura 35** Quantificação do cromato no solo OCDE com colêmbolos, ao longo de 28 dias, com os biossensores. .... - 56 -

**Figura 36-** Quantificação do cromato no solo OCDE com colêmbolos ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida. .... - 56 -

**Figura 37-** Valores de pH do solo natural ao fim de 0 dias (azul), 14 dias (vermelho) e 28 dias (verde). .... - 57 -

**Figura 38** - Valores de pH do solo OCDE ao fim de 0 dias (azul), 14 dias (vermelho) e 28 dias (verde). .... - 57 -

**Figura 39** - Quantificação de cromato presente em solução aquosa, pH 9 por meio dos biossensores desenvolvidos..... - 59 -

**Figura 40** - Quantificação do cromato presente em solução aquosa, pH 9, pelo método de difenilcarbazida. .... - 59 -

**Figura 41-** Quantificação de cromato em solução aquosa, pH 9 por cromatografia iônica (método EPA 7199)..... - 60 -

**Tabela 1** – Diferentes estados de oxidação do crómio (adaptado de (Zayed e Terry, 2003)....- 4 -

**Tabela 2**- Preparação da curva de calibração do método de difenilcarbazida.....- 35 -

**Tabela 3** - Concentrações usadas na contaminação dos solos durante o processo de otimização. -  
46 -

Tabela 4- Concentrações usadas na contaminação dos dois solos. ....- 49 -



% -percentagem	<b>LB</b> - <i>Luria Bertani</i>
°C – grau Celsius	<b>M</b> - molar
<b>µm</b> - micrometro	<b>Mn</b> - Manganês
<b>µg</b> - micrograma	<b>Mg</b> - Magnésio
<b>µL</b> - microlitro	<b>mmol. L</b> - milimol por litro
<b>µg/mL</b> - micrograma por mililitro	<b>mg</b> - miligrama
<b>µM</b> - micromolar	<b>mg/L</b> –miligrama por litro
<b>A</b> – absorvância	<b>mg/Kg</b> – miligrama por quilograma
<b>Al</b> - Alumínio	<b>mg/mL</b> –miligrama por mililitro
<b>Ba</b> – Bário	<b>min</b> - minuto
<b>Br</b> - Bromo	<b>mL</b> - mililitro
<b>Ca</b> - Cálcio	<b>mL/min</b> – mililitro por minuto
<b>C</b> - concentração	<b>mM</b> - milimolar
<b>cm</b> - centímetro	<b>N</b> - Azoto
<b>Cl</b> –Cloro	<b>N</b> - normal
<b>Cr</b> - Crómio	<b>Na</b> - Sódio
<b>Cr(I)</b> - Crómio	<b>NIOSH</b> – <i>National Institute of Occupational Safety and Health</i>
<b>Cr(II)</b> - Crómio divalente	<b>nm</b> - nanómetros
<b>Cr(III)</b> - Crómio trivalente	<b>O</b> - Oxigénio
<b>Cr(IV)</b> - Crómio tetravalente	<b>OCDE</b> - Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico
<b>Cr(V)</b> - Crómio pentavalente	<b>P</b> - Fósforo
<b>Cr(VI)</b> - Crómio hexavalente	<b>pH</b> – -log [H <sup>+</sup> ]
<b>DNA</b> - Ácido desoxirribonucleico	<b>rpm</b> – rotações por minuto
<b>DPC</b> - Difenilcarbazida	<b>S</b> - Enxofre
<b>E</b> - energia	<b>Si</b> - Silício
<b>EPA</b> – Environmental Protection Agency	<b>SOD</b> – Superóxido dismutase
<b>F</b> - Flúor	<b>USEPA</b> - <i>United States Environment Protection Agency</i>
<b>Fe</b> - Ferro	<b>UV</b> - Ultravioleta
<b>Fe (II)</b> - Ferro no estado oxidação +2	<b>Vis</b> -Visível
<b>Fe (III)</b> - Ferro no estado oxidação +3	
<b>g</b> - grama	
<b>GFP</b> – <i>green fluorescence protein</i>	
<b>IUPAC</b> - International United Applied Chemistry	
<b>H</b> - Hidrogénio	
<b>K</b> - Potássio	



**Resumo**



O rápido desenvolvimento da indústria como a do papel, de fertilizantes e pesticidas, de baterias, de curtumes, de ferro e aço, leva a que grandes quantidades de metais pesados sejam descarregadas no meio ambiente constituindo uma grave fonte de contaminação. Ao contrário dos contaminantes orgânicos, os metais pesados não são biodegradáveis e tendem a acumular-se nos organismos vivos, sendo tóxicos e carcinogénicos. O crómio hexavalente é um metal pesado que apresenta elevada solubilidade, mobilidade e biodisponibilidade estando, por isso, associado a diversas patologias como reações alérgicas, dermatites de contacto, cancro de pulmão. De forma a prevenir a dispersão da poluição é importante conseguir detectar concentrações de cromato presente nos solos, na água e no ar. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu em testar um sistema de biossensores capazes de detectar o crómio hexavalente em solução aquosa através da determinação da sua especificidade e sensibilidade e determinar a sua utilidade na deteção de cromato em solos correlacionando com os níveis de ecotoxicidade do solo.

Numa primeira fase, procedeu-se à otimização das condições de crescimento das construções bacterianas pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici* e das condições de quantificação do cromato. Os resultados mostraram que os biossensores tiveram melhor funcionamento quando cultivados em meio LB e seguidamente mantidos em meio MMT suplementado com 0,3% de glucose. Em relação às condições de quantificação obteve-se melhores resultados, quando se utilizou comprimento de onda de excitação de 475 nm, em microplacas de 96 poços transparentes, após 5 horas de incubação. A partir destes resultados traçou-se a curvas de calibração para os dois biossensores ( $r = 0,99$ ).

Posteriormente, otimizou-se as condições de extração e quantificação do cromato dos dois solos. Verificou-se que a recuperação do cromato introduzido no solo era máxima após três horas de agitação a 250 rpm, 25°C. Testou-se a capacidade dos biossensores em quantificar o crómio hexavalente presente em solo artificialmente contaminado com quantidades conhecidas de cromato proveniente da Escola Agrária de Coimbra (solo natural) e também em solo OCDE (solo artificial). Verificou-se que o desaparecimento do cromato no solo natural foi mais gradual e mais lento que no solo OCDE. Neste último, ao fim de sete dias a presença de cromato era praticamente nula. Determinou-se a dose máxima efetiva para o cromato (EC50) por testes ecotoxicológicos com colêmbolos para os dois solos. No solo natural a EC50 foi de 43,9 mg Cr(VI)/Kg do solo, enquanto no solo OCDE não foi possível determinar o seu valor dada a semelhança dos resultados de toxicidade para as diferentes concentrações de Cr(VI) medidas, todas elas muito baixas. Correlacionando, estes valores com os resultados obtidos pelos biossensores percebeu-se que para concentrações superiores à EC50, o desaparecimento do cromato é mais lento, o que pode ser devido à toxicidade exercida sobre a comunidade microbiana inibindo a sua capacidade em reduzir o cromato. A fim de confirmar os resultados da quantificação de cromato obtidos com base nos biossensores, todas as amostras foram

analisadas pelo método colorimétrico da difenilcarbazida, normalmente usado na detecção de cromato em soluções aquosas. Contudo, visto que este método apresenta limitações quando aplicado em matrizes complexas, recorreu-se a um segundo método químico mais sensível (Método EPA 7199) para comprovar a especificidade e sensibilidade dos biossensores desenvolvidos.

Com base em todos os resultados obtidos, concluiu-se que os biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici* são uma alternativa na detecção de cromato presente nos solos mais económica que o método EPA e sem as limitações do método colorimétrico.

**Palavras- Chave:** Crómio VI, biossensor, solos, pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*

**Abstract**





The rapid development of the industry as paper industry, fertilizers and pesticides, batteries, leather, steel and iron leads to large amounts of heavy metals discharged into the environment, resulting in a serious source of contamination. Unlike organic contaminants, heavy metals are not biodegradable and tend to accumulate in living organisms, making it toxic and carcinogenic. The hexavalent chromium is a heavy metal that has a high solubility, bioavailability and mobility and is therefore associated with several diseases such as allergic reactions, contact dermatitis and cancer of the lung. In order to prevent the dispersion of pollution it is important to map the concentrations of chromate present in soil, water and air. The aim of this study was to test, by determining the specificity and sensitivity, a system of biosensors designed to detect and quantify hexavalent chromium in aqueous solution and determine their applicability in the detection and quantification of chromate in soils.

First, we optimized the growth conditions of the biosensors pCHRGFP1 *E. coli* and pCHRGFP2 *O. tritici* and the conditions of measurement of chromate. The results showed that biosensors had better results when grown in LB medium and maintained on MMT medium supplemented with 0.3% glucose. Considering the conditions of measurement, the best results were obtained when using excitation wavelength of 47nm, 96 well with transparent microplates, after 5 hours of incubation. These conditions were used to construct the calibration curves for the two biosensors ( $r = 0.99$ ).

Later, the conditions of extraction and quantification of chromate of both soils were optimized. Chromate was maximally extracted from contaminated soils when incubated three hours with stirring at 250 rpm, 25 ° C. The ability of biosensors to quantify hexavalent chromium present in artificially contaminated soil from the Agraria School of Coimbra (natural soil) and OECD soil (artificial soil) was tested. The results showed that chromate disappear from the natural soil more gradually and slower than in OECD soil, and at the end of seven days the presence of chromate was almost zero. For ecotoxicological tests, the collembolan maximal effective dose EC50 was determined for both soils. In natural soil, the collembolan EC50 was 43.9 mg Cr (VI)/kg of soil, while in OECD soil was not possible to determine their value, because the chromate concentrations were very low and the results of collembolan survival were similar for different concentrations of Cr (VI). At chromate concentrations in the soil higher than the EC50, the disappearance of chromate was slower, which may be due to the toxicity exerted on the microbial community inhibiting its ability to reduce chromate. In order to confirm the results of chromate quantification obtained with the biosensors, all samples were analyzed using diphenylcarbazide, a standard colorimetric methodology used in the quantification of chromate in aqueous solutions. However since this method has limitations

when applied to complex matrices, a second more sensitive chemical method (EPA Method 7199) was used to demonstrate the specificity and sensitivity of biosensors developed.

With all these results, it was concluded that the biosensors pCHRGFP1 *E. coli* and pCHRGFP2 *O. tritici* are an alternative in the detection and quantification of chromate present in the soil more economic than the EPA method and without the limitations of the colorimetric method.

**Keywords:** Biosensor, chromium VI, soil, pCHRGFP1 *E. coli* and pCHRGFP2 *O. tritici*

## **1. Introdução**



### 1.1. Crómio (Cr)

#### 1.1.1. Características físico-químicas

O crómio (Cr), foi descoberto em 1798, pelo N.L. Vauquelin, é um metal de coloração cinzenta semelhante à do aço, duro, frágil que pertence ao grupo VI-B dos metais de transição, é o vigésimo quarto elemento da tabela periódica, com o peso molecular de 51.996. Este metal pesado encontra-se vastamente distribuído nas rochas, na água doce e na água do mar (Zayed et al., 2003), sendo o vigésimo primeiro elemento mais abundante na crosta terrestre com a concentração de aproximadamente 0,1-0,3mg Cr/Kg de crosta terrestre. Na natureza, o crómio não existe na forma metálica, sendo a principal fonte o mineral cromite (figura 1), que consiste numa mistura de crómio e ferro ( $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$ ) (Dhal et al., 2013).



Figura 1 -Mineral cromite (adaptado de <http://www.psem.ph/downloads/articles/chromite.jpg>).

Embora existam nove estados de valência (de -2 a +6), apenas os estados de oxidação 3+ (Cr (III)) e 6+ (Cr (VI)) são suficientemente estáveis para estarem presentes no meio ambiente (Krishna et al., 2005). Os dois estados de oxidação do crómio são drasticamente diferentes em termos de cargas, propriedades físico-químicas, reatividade química e bioquímica (Kotaš e Stasicka 2000). Na tabela 1, estão as várias espécies químicas do crómio presente no meio ambiente e a suas ocorrências na natureza.

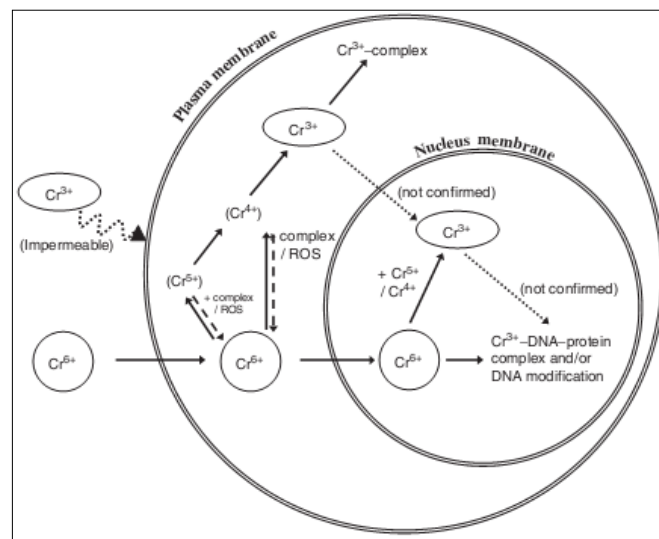
**Tabela 1** – Diferentes estados de oxidação do crómio (adaptado de (Zayed e Terry, 2003).

Espécie Química	Estado de oxidação	Exemplos	Observações
Cr elementar	Cr (0)		Não ocorre naturalmente
Cr divalente	Cr (II)	CrBr <sub>2</sub> , CrCl <sub>2</sub> , CrF <sub>2</sub> , CrSe, Cr <sub>2</sub> Si	Relativamente instável e pronto para ser oxidado para o estado trivalente
Cr trivalente	Cr (III)	CrB, CrB <sub>2</sub> , CrBr <sub>3</sub> , CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O, CrCl <sub>3</sub> , CrF <sub>3</sub> , CrN, KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12 H <sub>2</sub> O	Compostos de forma estável e ocorre na natureza na forma de mineral, como a ferro-cromite (FeCr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )
Cr tetravalente	Cr (IV)	Dióxido de Cr (CrO <sub>2</sub> ), Cr tetrafluoreto (CrF <sub>4</sub> )	Não ocorre naturalmente e representa um importante intermediário que influencia a razão de redução do Cr (V).
Cr pentavalente	Cr (V)	Tetraperoxocromato (CrO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ), Percromato de potássio	Não ocorre naturalmente. Representa um importante intermediário que influencia a razão de redução do Cr (VI).
Cr hexavalente	Cr (VI)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> , BaCrO <sub>4</sub> , CaCrO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	O segundo estado de oxidação mais estável. Raramente, ocorre na natureza, é produzido por fontes antropogénicas.

### 1.1.2. Propriedades Biológicas do Crómio

O crómio trivalente é o estado de oxidação mais estável, menos tóxico dado que não consegue atravessar as membranas celulares e é considerado como um nutriente essencial no metabolismo da glucose, lípidos e proteínas. Este estado de oxidação é o mais estável e requer considerável energia para oxidar ou reduzir esta espécie. A presença, concentração e forma do crómio (III) no meio ambiente depende de diversos processos físico-químicos, tais como a hidrólise, complexação, reações redox e adsorção (Kotàs e Stasicka, 2000). O crómio trivalente tem uma forte tendência para formar complexos octaédricos hexa-coordenados com diversos ligandos (como a água, amoníaco, ureia) ou com ligandos orgânicos com átomos dadores de eletrões (como o oxigénio, azoto ou enxofre). Normalmente, a complexação do Cr (III) aumenta a sua solubilidade, no entanto, quando os ligandos são macromoléculas, como os ácidos húmicos, o complexo torna-se menos solúvel e conseqüentemente menos móvel no meio ambiente (Matos, 2006). O crómio (III) é menos tóxico visto ser muito menos solúvel a pH fisiológico. A pH neutro esta espécie de Cr tende a precipitar na forma de hidróxido [Cr (OH)<sub>3</sub>] ou de óxido hidratado (Cr<sub>2</sub>O.H<sub>2</sub>O) (Ramírez-Díaz et al., 2008).

O crómio hexavalente (Cr (VI)) é um forte agente oxidante com elevado potencial redox no intervalo de 1,33-1,38 eV, sendo, consequentemente, responsável pela rápida e elevada produção de ROS e pela toxicidade que estes representam (Shanker et al.,2005). Por tudo isto, é altamente tóxico, cancerígeno e mutagénico (Krishna e Philip, 2005). Normalmente, está presente em solução na forma de hidrocromato ( $\text{HCrO}_4^{2-}$ ), dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) e cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) dependendo do pH da solução (Ramirez-Diaz et al., 2008). Desde 2011, o Cr (VI) ocupa o 17º lugar na lista de substâncias perigosas (<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>) dos Estados Unidos. Esta espécie de crómio encontra-se relacionada com diversas patologias como cancro de pulmão, irritação, ulceração nasal, reações de hipersensibilidade e dermatite por contacto (Ramirez-Diaz et al., 2008), ou ainda pode causar a morte de animais e humanos quando ingerido em grandes quantidades. Os compostos de Cr (VI) possuem elevada solubilidade, mobilidade e biodisponibilidade quando comparados com os compostos de Cr (III) (Kotaš and Stasicka 2000; Jeyasingh and Philip 2005). Estima-se que o Cr (VI) é 10-100 vezes mais tóxico que o Cr (III) (Viti et al., 2006) Esta diferença explica-se pela capacidade do crómio hexavalente conseguir penetrar facilmente através das membranas celulares (Kalidhasan e Rajesh, 2009) (figura 2), acumulando-se na cadeia alimentar e causando severos problemas de saúde (Patra,et al., 2010; Fu e Wang, 2011).

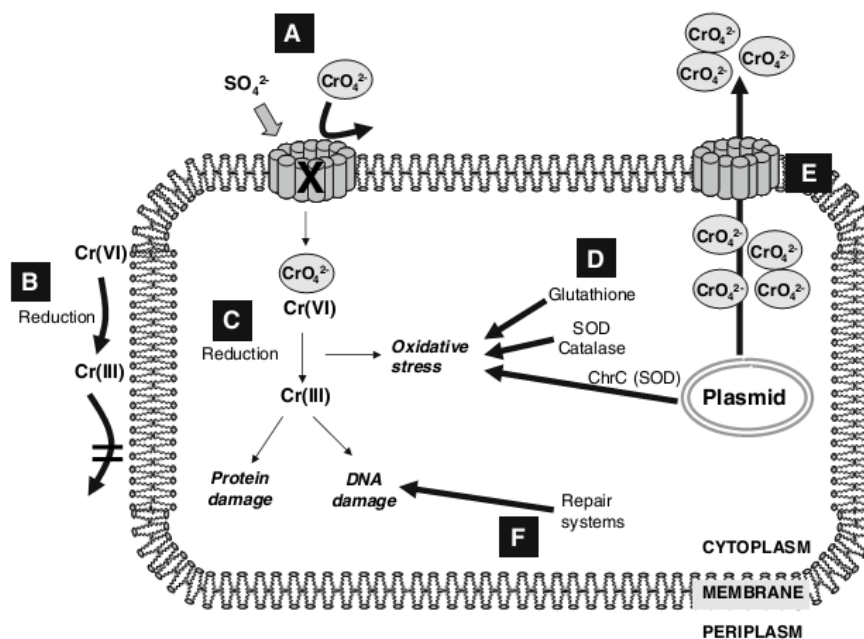


**Figura 2**-Diagrama representativo da capacidade mutagénica e toxicidade do Cr (VI) nas células (adaptado de Cheung e Gu, 2007).

### 1.1.3. Mecanismos bacterianos de resistência ao cromato

Os mecanismos de resistência a cromato podem ser mediados por plasmídeos ou causados por mutações cromossomais (Kamaludeen et al., 2003). Normalmente, os genes localizados nos

plasmídeos codificam transportadores membranares que medeiam diretamente o efluxo de íons de cromato do citoplasma da célula (Figura 3E). Os sistemas de resistência codificados pelos cromossomas bacterianos estão normalmente relacionados com estratégias como a redução específica ou inespecífica do Cr (VI), atividade desintoxicante de radicais livres, reparação dos danos no DNA, ou ainda, no processo associado com a homeostasia do ferro ou do enxofre (Ramirez-Diaz et al., 2008). A figura seguinte apresenta os mecanismos de transporte, toxicidade e resistência em células bacterianas. O cromato consegue entrar na célula através da via metabólica de entrada dos sulfatos (Figura 3A), o que reflete a analogia química entre o sulfato e o cromato. Quando a redução do cromato a Cr (III) é extracelular (Figura 3B) este já não consegue atravessar a membrana. No entanto, quando a redução ocorre dentro da célula (Figura 3C) pode causar um stress oxidativo, bem como danos no DNA e nas proteínas. Este stress oxidativo é minimizado pela ação de enzimas desintoxicantes como a glutathiona redutase, a catalase, ou a superóxido dismutase (*SOD*) diminuindo os efeitos tóxicos do cromato. Para além disso, existe na célula um sistema de reparação do DNA que participa na proteção dos danos causados pelo cromato e seus derivados (Figura 3F). (Ramirez-Diaz et al., 2008).



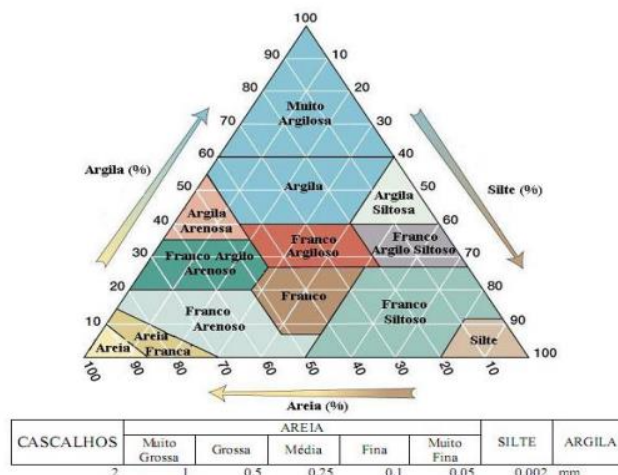
**Figura 3-** Mecanismo de transporte, toxicidade e resistência do cromato em células bacterianas (adaptado de Ramirez-Diaz et al., 2008).

## 1.2 Solo

O solo é um meio complexo e heterogêneo, resultado de alterações de gestão e organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo), sob ação da vida, da atmosfera e das trocas



de energia que aí se manifestam (Cavalcanti, 2010). Este é responsável por desempenhar diversas funções, tais como a sustentação da vida; a manutenção do ciclo da água e dos nutrientes; a proteção das águas subterrâneas; a conservação das reservas minerais e de matérias-primas; a produção de alimentos; o meio para a manutenção de atividades socioeconómicas sendo, por isso, a sua preservação de extrema importância (Andrade, 2010). A sua composição não é uniforme, apresentando quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos (entre eles, plantas, fungos, protozoários, invertebrados e outros animais). O solo típico é composto por 95 % de partículas inorgânicas e cerca de 5% de matéria orgânica. A matéria inorgânica é uma mistura de partículas primárias como a areia (diâmetro de 2-0,02mm), sedimentos ou “siltite” (diâmetro de 0,02-0,0002mm), argila (diâmetro menor que 0,002mm), óxidos e sais de metais. Quimicamente, areia é composta, essencialmente, por quartzo (SiO<sub>2</sub>), os sedimentos são minerais como feldspato, biotite, enquanto as argilas são constituídas por minerais secundários como caulinita, montmorilonita e ilita. Consoante a proporção destes diferentes tipos de partículas no solo, o solo adquire diferentes texturas (Lewis, n.d.) e consequentemente diferentes propriedades como a capacidade de retenção de água e o transporte de massa no solo. Enquanto as areias drenam rapidamente e facilitam os processos de lixiviação, os solos argilosos podem conter espaços porosos com baixa interconexão tornando a drenagem mais difícil (Cavalcanti, 2010). Na Figura seguinte estão representados os diferentes tipos de solos, consoante a sua composição e textura.



**Figura 4** - Composição e textura dos diferentes tipos de solo (adaptado de Cavalcanti, 2010). Em que “franco” consiste numa mistura grosseiramente equivalente de argila, areia, *siltite* e ácidos húmicos.

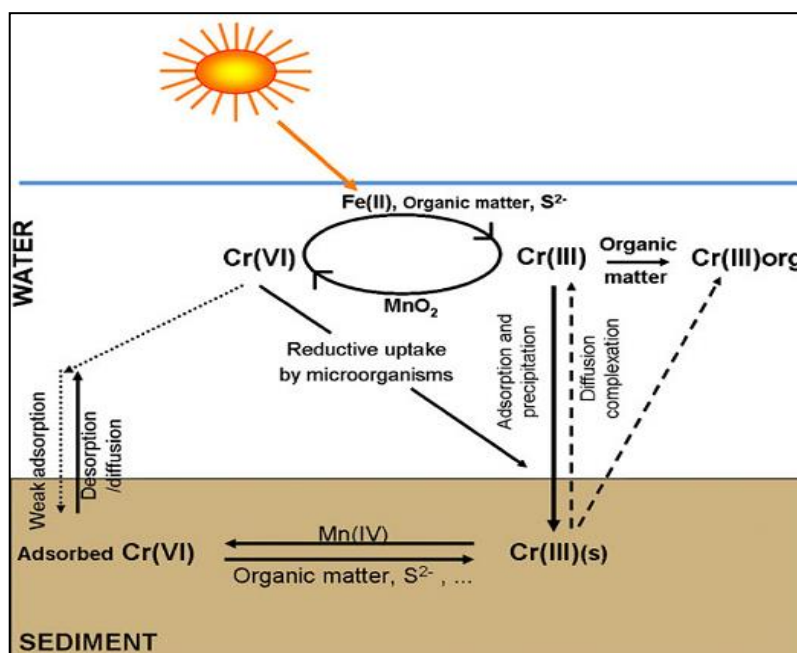
Associada à poluição dos solos existe a possibilidade de comprometer as fontes de águas subterrâneas (lençol freático). Após contactar com a superfície do solo, o contaminante ou

poluente pode ser adsorvido, arrastado pelo vento ou pelas águas de escoamento superficial, ou ainda, lixiviado pelas águas de infiltração passando para as camadas inferiores até chegar às águas subterrâneas que, por sua vez, podem facilitar o transporte do contaminante ou poluente para outras regiões. A compreensão das limitações associadas à biodisponibilidade dos contaminantes em solos é considerada uma etapa essencial na determinação da aplicação de um processo de biorremediação e no entendimento das limitações relacionadas à degradação do poluente ao longo do tempo (Cavalcanti, 2010).

As atividades antropogénicas são a principal razão da contaminação do solo com crómio. A quantidade média permitida de crómio no solo depende da composição e da utilização do solo. Por exemplo, no Canadá a quantidade média de Cr (VI) recomendada para solos destinados a agricultura e à habitação é de 0,4mg/Kg, enquanto para solos destinados para comércio e indústrias de 1,4mg/Kg (Matos, 2006). O estabelecimento destes limites levou á necessidade de desenvolver novos métodos de quantificação de crómio ou otimização dos métodos já existentes de forma a torná-los mais eficazes, sensíveis e fidedignos (Kalidhasan e Rajesh, 2009).

### 1.3 Interação do solo com o Crómio

O desenvolvimento de uma estratégia de remediação ou de um método de deteção do Cr (VI) eficiente e pouco dispendioso implica o conhecimento dos processos físicos, químicos e biológicos que afetam a mobilidade, distribuição e especiação do crómio no ambiente.



**Figura 5** – Processos biogeoquímicos que afetam as espécies de crómio presentes no meio ambiente aquático (adaptado de Unceta et al., 2010).

### **7.1.1. Fatores físicos**

Os compostos podem-se acumular na fase sólida de diversas formas, com níveis energéticos distintos, estabelecendo maior ou menor reversibilidade das suas reações (Moreira, 2004). A distribuição do crómio no ambiente é controlada por três importantes tipos de reações.

#### **Reações de oxidação-redução**

O estado de oxidação do crómio presente nos solos depende, em parte, do potencial redox e do pH do solo. Na maior parte dos casos o crómio encontra-se no estado Cr (III). Em condições redutoras, o Cr (VI) será reduzido a Cr (III) por reações redox com as espécies inorgânicas aquosas, por transferência de eletrões com superfícies minerais, por reações com substâncias não húmicas (como carboidratos e proteínas), ou por redução através das substâncias húmicas. Este tipo de reações, e conseqüentemente a presença de Cr (III) ou Cr (VI) depende do pH do solo. Em solos com pH mais baixo verifica-se uma maior capacidade de redução do crómio do que em solos mais alcalinos (Zayed e Terry, 2003). Contudo, em algumas situações também se verifica a oxidação do Cr (III) em Cr (VI), o que pode significar graves problemas ambientais. Esta reação é limitada pela concentração de crómio hidrossolúvel, pH, a força iónica e área superficial inicialmente disponível. A presença de óxido de manganês favorece este tipo de reações (Zayed e Terry, 2003).

#### **Reações de precipitação-dissolução**

As reações de precipitação e dissolução são geralmente descritas pelo produto de solubilidade, quando um sólido é dissolvido para formar o soluto dessa solução. Este fenómeno, normalmente, encontra-se associado a solos alcalinos e calcários, com concentrações relativamente altas de metais pesados e condições que favorecem a baixa solubilidade dos metais pesados ou sítios reduzidos de adsorção específica. Quer a precipitação/ dissolução quer a adsorção/ desadsorção são mecanismos influenciados pela acidez e pelo potencial redox do solo. Teoricamente, o processo de precipitação/dissolução ocorre em um determinado pH e, de maneira contrária a adsorção, é menos dependente da quantidade de reagente ou de diferentes superfícies minerais presentes no solo (Moreira, 2004).

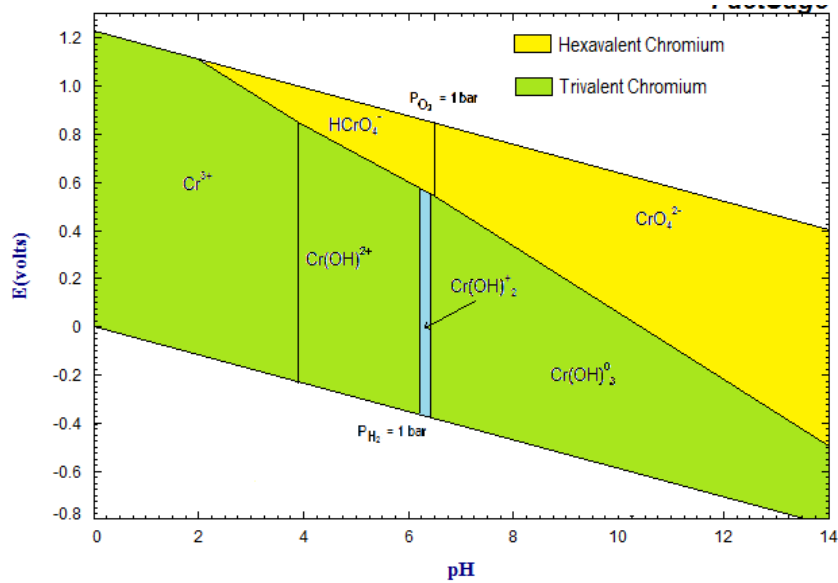
#### **Reações de adsorção-desadsorção**

As reações de adsorção e desadsorção são processos importantes na determinação da concentração de metais pesados presentes no solo em solução. Define-se adsorção como sendo a

acumulação de uma determinada substância ou de um elemento na interface entre a superfície sólida e a superfície adjacente. Os metais pesados podem ser adsorvidos por partículas do solo levando a um aumento ou diminuição da sua mobilidade (Dube et al., 2001). Quando adsorvidos por meio de ligações covalentes ou iônicas os íons estão mais fortemente retidos, tratando-se de adsorção específica. Quando as interações entre íons e as partículas do solo são de natureza electrostática, a retenção ocorre por meio de forças físicas, tratando-se de adsorção não-específica (Moreira, 2004). A adsorção de íons de metais pesados pelo solo e pelos seus constituintes é influenciada por vários parâmetros, como o pH do meio, tipo e espécie de metal pesado envolvido, competição dos metais pesados, composição e idade do solo (Bradl, 2004), o tipo de minerais presentes no solo, agentes complexantes, entre outros (Kamaludeen et al., 2003). A capacidade de adsorção do crómio afeta significativamente o transporte deste metal pesado no solo e nas águas subterrâneas. As superfícies minerais protonadas, sítios carregados positivamente, particularmente com óxido de ferro e alumínio conseguem adsorver cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) a pH 2-7. Apesar da forte afinidade de adsorção, o cromato é móvel no solo porque compete com outros aniões o que reduz a sua capacidade de adsorção. A presença de elevadas concentrações de  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  e  $\text{HCO}_3^-$  pode reduzir drasticamente a adsorção de cromato pelos solos.

### **7.1.2. Fatores químicos**

O pH do solo é um parâmetro importante no controlo das reações redox do crómio do solo. Com base neste parâmetro e no potencial redox é possível determinar a espécie de Cr predominante no solo (Figura 6). O tipo e número de formas dos compostos de Cr (VI) presentes dependem do pH do meio e da concentração total de Cr (VI). Na presença de valores baixos de pH tendem a formar-se catiões estáveis de Cr (III), enquanto para solos com pH mais alcalinos tende a formar-se aniões estáveis de Cr (VI). Quando o pH está entre um e seis as principais espécies que existem são  $\text{HCrO}_4$  e o ião dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), quando o pH é superior a sete o  $\text{CrO}_3$  forma o ião  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Kotàs e Stasicka, 2000).



**Figura 6** - Espécies presentes a diferentes valores de pH (adaptado de Dhal et al., 2013).

### 7.1.3. Fatores biológicos

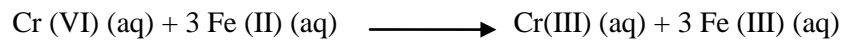
#### Matéria orgânica

A matéria orgânica é essencialmente composta por substâncias húmicas e substâncias não húmicas (Kamaludeen et al., 2003), é considerado o segundo maior componente dos solos e tem um papel significativo na mobilidade do crómio no solo. Visto que, o solo com matéria orgânica tem tendência para reduzir o Cr (VI) móvel em Cr (III) relativamente imóvel (Banks et al., 2006). Num solo, essencialmente composto por turfa, o Cr (III) é a espécie mais abundante, em consequência da sua ligação com os compostos orgânicos e com as frações minerais. Por sua vez, um solo essencialmente composto por areia e argila, o Cr (III) tende a oxidar devido à sua solubilidade em frações que são facilmente extraíveis da solução de solo. A composição do solo (textura do solo, competição de iões, reações de adsorção) e as condições no solo (pH, temperatura, presença de vegetação, tipo e a percentagem de argila presente, da quantidade de matéria orgânica) são os principais fatores que afetam a mobilidade do crómio (Dube et al., 2001; Banks, et al., 2006).

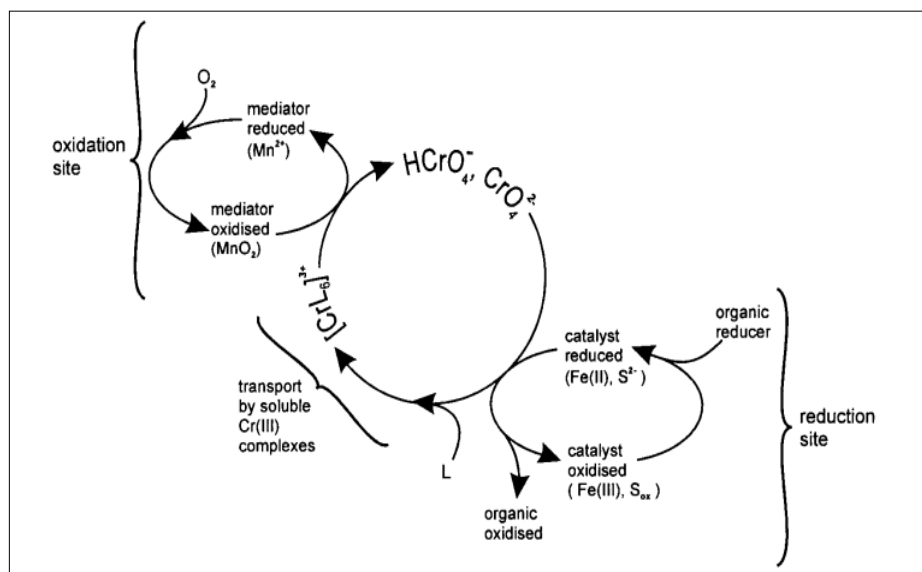
#### Ferro e Manganês

Tal como mostra a Figura 7, a concentração de ferro (II) presente no solo influencia a capacidade de redução do solo. Em 1995, Powell e os seus colaboradores usaram a capacidade

dos minerais amorfos de sulfureto de ferro, na remediação de superfícies contaminadas com Cr (VI). Mostraram que a combinação de Fe (II), matéria orgânica e baixo pH faz variar a capacidade do solo em reduzir o Cr (VI). Ou seja, em condições ácidas, observa-se um aumento da espécies de Fe (II) libertadas pelos minerais presentes no solo, que conseqüentemente levam ao aumento da redução do Cr(VI) em Cr(III) (Zayed e Terry, 2003). A reação química seguinte traduz a redução de Cr (VI) a Cr (III) em solução aquosa, na presença de ferro.



Com o objetivo de explicar a redução química do Cr (VI) por meio do ferro, foram propostos dois mecanismos. No primeiro, as substâncias húmicas convertem o Fe (II) em Fe (III) que por sua vez participa na redução do crómio (Figura 7). No segundo mecanismo, o Fe (II) pode formar  $\text{FeCrO}_4$  que complexa com o crómio (Kamaludeen et al., 2003).



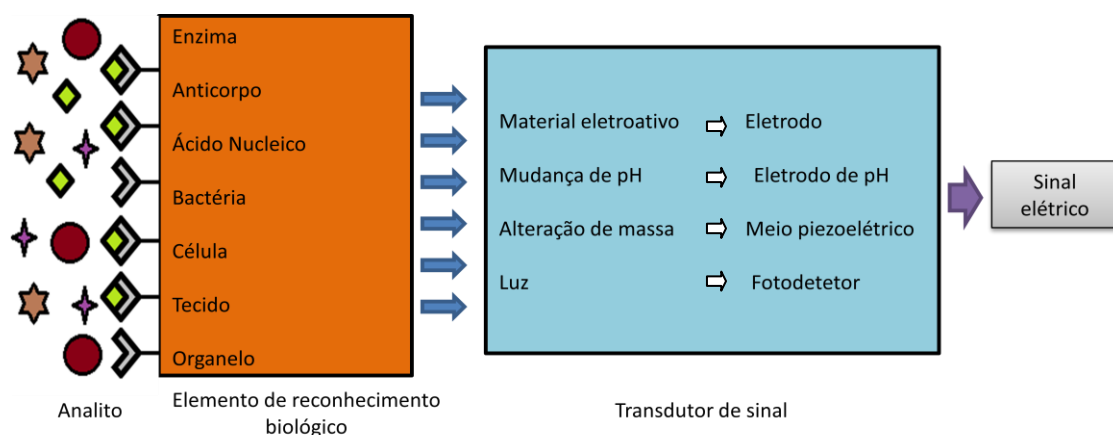
**Figura 7-** Ciclo de oxidação-redução do crómio no solo (Kotaš and Stasicka 2000).

Tal como o ferro, também o manganês influencia a quantidade de crómio hexavalente presente nos solos. Em 1979, Bartlett e James foram os primeiros a mostrar que o manganês influencia a oxidação de Cr nos solos com pH acima de 5, desde que o solo seja fresco e húmido. Embora, os elevados níveis de Cr (VI) resultem de contaminação antropogénica nomeadamente de indústrias, parte do crómio hexavalente deve-se à elevada atividade redox de alguns compostos, tais como, o oxigénio elementar e os hidróxidos e óxidos de manganês, que conseguem oxidar quantidades significativas de Cr (III) em Cr (VI).As reações de oxidação-

redução do crômio-manganês podem ser afetadas por vários fatores tais como, o conteúdo de água no solo, iões inorgânicos e os compostos orgânicos. Os óxidos de manganês tem uma elevada área de superfície e uma elevada capacidade de troca de iões, atuando como “scavengers” de metais pesados (Kamaludeen et al., 2003)

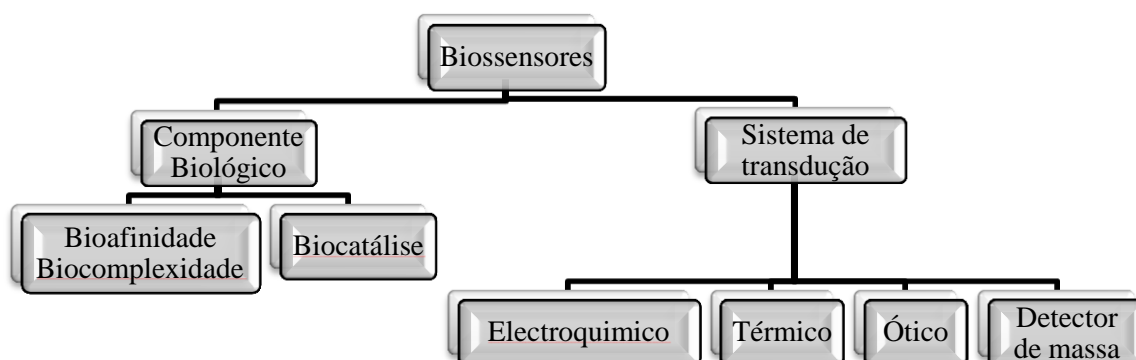
#### 1.4. Biossensores

Os métodos de análise padrão clássicos usados para determinar o crômio presente nas amostras ambientais são a análise por fluorescência de raio X, por plasma acoplado indutivamente à espectrometria de emissão atômica, por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, entre outras. Todavia, estas técnicas não permitem a especiação do crômio, que, como já foi referido, possuem níveis de toxicidade distintos. A especiação do estado de valência requer um complexo pré-tratamento das amostras, como por exemplo, quelatação, precipitação, extração ou cromatografia, que para além de ser dispendioso requer tempo e trabalho laboratorial especializado (Zlatev et al., 2006). Para além disso, os métodos tradicionais não permitem distinguir qual a concentração de metal biodisponível (e por consequência potencialmente tóxico) da concentração de metal indisponível ou inerte (potencialmente não tóxico) aos organismos presentes no ambiente. Estes métodos são, por isso, muito limitativos dado que o conhecimento da concentração de metal ou composto biodisponível é essencial para determinar a toxicidade, o potencial de bioacumulação e para escolher o processo de remediação mais eficiente (Costa, 2010). Para ultrapassar estas limitações, e como alternativa aos métodos tradicionais, surgiram os biossensores, uma ferramenta promissora na monitorização ambiental em tempo real.



**Figura 8** - Representação esquemática de um biossensor. (Adaptado de Vargas-bernal et al., 2012)

De modo geral, o biossensor define-se como sendo um sensor químico que usa propriedades de reconhecimento de componentes biológicos com atividade catalítica ou reações de afinidade em contacto íntimo com um transdutor de sinal. De acordo com a *IUPAC* (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define-se como sendo “um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa, através do uso de um elemento de reconhecimento biológico que está em contacto direto com o elemento de transdução”. O potencial de aplicação de um biossensor está na sua capacidade em medir a interação dos contaminantes com os sistemas biológicos através da capacidade de reconhecimento biomolecular (Cavalcanti, 2010). Este tipo de sensores apresentam características únicas como elevada seletividade, relativo baixo custo de construção, potencial de miniaturização, facilidade de automação, construção de equipamentos de forma simples e portátil (Costa, 2010). De acordo com o elemento biológico ou com o transdutor usado na construção do biossensor, este pode pertencer a diferentes classes (Figura 9).



**Figura 9** -Classificação dos biossensores (adaptado de Lei, et al., 2006; Mello e Kubota, 2002; Andrade, 2010).

De entre as diferentes classes, as mais desenvolvidas são os biossensores enzimáticos, os microbiológicos, os quimiorreceptores e os imunossensores. Embora, até hoje os mais utilizados na detecção de analitos específicos sejam os biossensores enzimáticos, com o avanço da tecnologia moderna, a utilização dos microrganismos tem vindo a ser avaliada e cada vez mais usada, devido à sua elevada sensibilidade a alterações no ambiente microbiano (Cavalcanti, 2010).

Dentre os diferentes tipos de biossensores, os mais utilizados em estudos ambientais, quer em processos de biorremediação, quer na análise da ecotoxicidade e monitorização da toxicidade de metais pesados e compostos químicos, são os biossensores microbianos, ou seja, biossensores

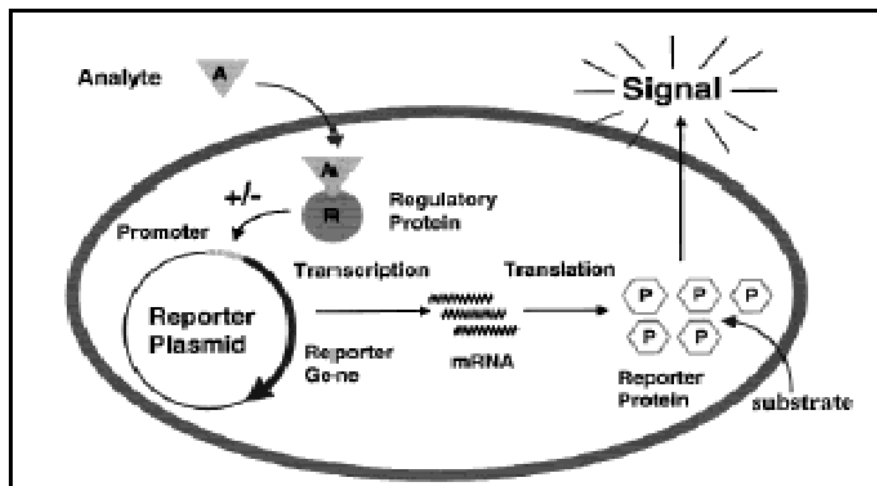


que usam como elemento de reconhecimento as células microbianas naturais ou geneticamente modificadas. A utilização de microrganismos, ao contrário dos outros biocomponentes permite preservar as proteínas no seu ambiente natural, protegendo-as da inativação por meio de agentes tóxicos externos e ainda evitar etapas de purificação. Com este tipo de biossensor é possível obter informações sobre o funcionamento do analito dentro da célula e relacioná-las com os seus efeitos (inibitórios, estimulantes ou tóxicos). Outra vantagem da utilização de microrganismos, especialmente bactérias, é o facto de proliferarem muito rapidamente sob condições aeróbias e/ou anaeróbicas em meios de cultura relativamente baratos (Cavalcanti, 2010; Costa, 2010). Os biossensores microbianos são amplamente usados na monitorização de contaminantes químicos no meio ambiente, como por exemplo, de metais pesados e metalóides (Liu et al., 2012; Michel et al., 2006; Nivens et al., 2004). As bactérias podem ser utilizadas como biossensores para demonstrar a toxicidade de uma variedade de meios ambientais, incluindo o solo, sedimentos e água através do acoplamento de bactérias a transdutores que convertem uma resposta celular em sinais detetáveis. Os biossensores bacterianos são concebidos por emparelhamento de um gene repórter (que gera um sinal) com um componente de deteção do contaminante que responde a alterações químicas ou físicas, como a exposição a um analito específico. Quando exposto a estas alterações o sensor estimula o gene repórter através de uma via bioquímica na célula que, por sua vez, produz uma resposta mensurável, como por exemplo, emissão de luz visível, que é indicativo do grau de mudança física ou química (Strosnider, 2003). Ou mais especificamente, o gene sinalizador é colocado sob o controlo de um promotor, muitas vezes proveniente de um gene de resistência ao composto em estudo, que é transcrito apenas na presença intracelular desta substância (Costa, 2010).

### 1.4.1 O Componente Biológico

Nos últimos anos, através do uso de engenharia genética foi possível criar microrganismos geneticamente modificados com genes sinalizadores, ou com o silenciamento de certas enzimas de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade dos biossensores (Costa, 2010).

O género *Ochrobactrum* e a espécie *Ochrobactrum anthropi* foram criados em 1988 para os organismos anteriormente conhecidos por grupo CDC Vd. Mais tarde surgiram outras cinco espécies de entre as quais a espécie *Ochrobactrum tritici*. Estas espécies caracterizam-se por ser Gram-negativas, estritamente aeróbicas, não-fermentativas, citocromo oxidase-positivo e produção de índole negativo. A taxonomia molecular coloca o género *Ochrobactrum* no  $\alpha$ -subgrupo da Proteobacteria (Teyssier et al., 2005).



**Figura 10** - Mecanismos de funcionamento do biossensor microbiano (Adaptado de Strosnider, 2003). O biossensor representado é um biossensor bioluminescente que, ao contrário do biossensor usado neste trabalho, necessita da adição de substrato para que o produto da tradução emita luz.

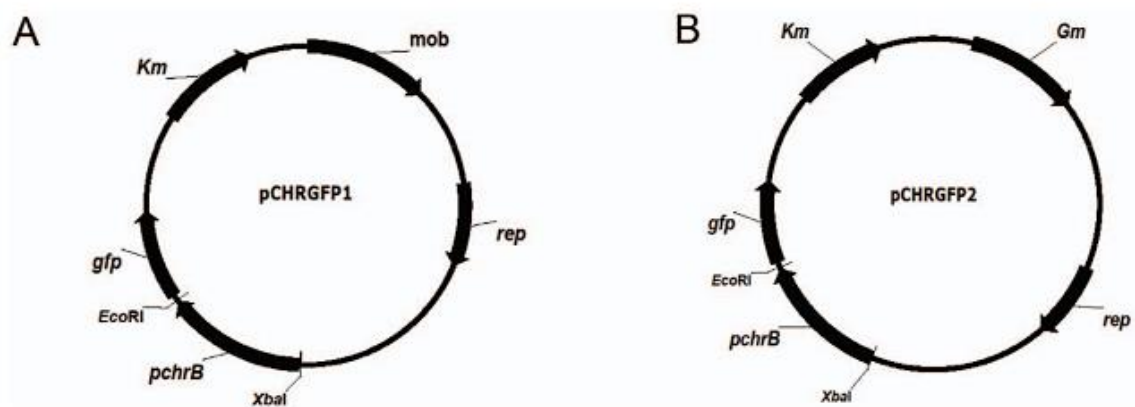
A estirpe *Ochrobactrum tritici* 5bv11 foi isolada da comunidade microbiana de uma estação de tratamento de águas residuais contaminadas com elevadas concentrações de crómio (Francisco et al., 2002). Esta estirpe contém genes que conferem resistência a elevadas concentrações de Cr (VI), que se encontram localizados no transposão *TnOtchr* (Figura 11). Este transposão é delimitado pelos genes *tnpR* (Resolvase) e *tnpA* (transposase) e contém no seu interior quatro genes relacionados com a resistência a cromato (*chrF*, *chrC*, *chrA*, *chrB*). (Morais et al., 2011).

A elevada resistência ao cromato de *O. tritici* 5bv11 é conferida pelo gene *chrA*. Este gene funciona como uma bomba quimiosmótica no efluxo de cromato do citoplasma, através de uma força motriz de protões (Ramirez-Diaz et al., 2008). A presença do gene *chrA* aumenta a capacidade da estirpe crescer em locais com elevadas concentrações de Cr (VI), enquanto a sua ausência anula por completo esta capacidade ((Branco et al., 2008). O gene *chrB* atua como um gene regulador da sensibilidade a cromato do operão CHR. Ao contrário do que acontece com outras bactérias em que o operão é induzido também por sulfato, neste caso o gene *chrB* da *O. tritici* 5bv11 apenas é induzido por Cr (VI). Em relação aos genes *chrF* e *chrC* considera-se que não tem papel importante no desenvolvimento de resistência ao Cr (VI). À proteína codificada pelo gene *chrC* são atribuídas funções superóxido dismutase, enquanto a função do gene *chrF* ainda não é conhecida (Branco et al., 2008).



**Figura 11-**Transposição TnOtchr da estirpe *Ochrobactrum tritici* 5bv11 (adaptado de Branco et al., 2008).

Com esta informação e com base nas técnicas de biologia molecular, foi desenhado um plasmídeo com o promotor *chr* e o gene *chrB* (Figura 12). Para além da sensibilidade a cromato, foi também inserido no plasmídeo o gene *gfp* de modo a ser possível quantificar a interação da bactéria com o cromato. O plasmídeo foi inserido na estirpe tipo de *Ochrobactrum tritici* e na estirpe tipo de *Escherichia coli* obtendo-se assim dois biossensores: pCHRGFP1 *E. coli* (A) e pCHRGFP2 *O. tritici* (B).



**Figura 12-** Diagrama esquemático dos plasmídeos. (A) Plasmídeo pCHRGFP1:pPROBE-NT com o promotor *chr* e o gene *chrB* a montante do gene *gfp*. (B) Plasmídeo pCHRGFP2:pCHRGFP1 com o gene de resistência a gentamicina clonado no gene *mob*. As setas indicam a direção da transcrição (adaptado de Branco, et al., 2013).

#### 1.4.2. Sistema de Transdução do sinal

O transdutor é usado para converter o sinal químico em um sinal elétrico, que poderá ser processado e reproduzido. Este sinal é proporcional à concentração do analito, permitindo medições quantitativas em tempo real (Costa, 2010).

Os genes repórteres que geram respostas fluorescentes ou luminescentes são mais atrativos, dado que a quantificação da luz emitida por parte dos microrganismos pode ser medida por um simples fotómetro. Os genes repórter mais usados são o *lux* e o GFP. No entanto, genes como o *lacZ* são também muito utilizados.

A bioluminescência baseia-se na utilização de genes presentes em bactérias naturalmente bioluminescentes como *Vibrio fischeri*, permitindo acompanhar o processo em tempo real. Existem duas estratégias para desenvolver estes biossensores microbianos: forma induzível e a forma constitutiva (Ivask et al., 2009). Na forma induzível, o gene repórter *lux* é ligado a um promotor regulado pela concentração de composto de interesse. Assim a resposta bioluminescente varia consoante a concentração de composto de interesse. Na forma constitutiva o gene repórter é fundido com promotores que são continuamente expressos, desde que o organismo vivo seja metabolicamente ativo (Lei et al., 2006). Exemplos de biossensores bioluminescentes comercialmente disponíveis são o Microtox®, BioTox™, LUMIStox™, ToxAlert™ (Ivask et al., 2009).

O gene *lacZ* da *Escherichia coli* que codifica a  $\beta$ -galactosidase é amplamente usado como gene repórter em biossensores. A  $\beta$ -galactosidase, ao contrário dos outros genes repórteres, não necessita de oxigénio ou quaisquer outro cofactore de crescimento (como a FMNH<sub>2</sub>). para ser produzida. Contudo, enquanto a deteção do produto da *gfp* e do *lux* se baseia na deteção fotométrica da luz emitida e da luz fluorescente, respetivamente, a quantificação da  $\beta$ -galactosidase envolve mais trabalho (Hansen e Sørensen 2001).

A GFP (*green fluorescent protein*) é uma proteína produzida pelo *Aequorea victoria*, que emite fluorescência na zona do visível do espectro eletromagnético (Strosnider et al., 2003). Esta proteína tem sido que cada vez mais usada na produção de proteínas de fusão em que o gene de interesse é fundido com o gene da GFP, tornando possível a miniaturização da localização da proteína *in vivo* (Jansson, 2003). Nos biossensores, a GFP permite avaliar a biodisponibilidade *in situ* e reportar concentrações de poluentes relevantes (Branco et al., 2013). Em comparação com as outras proteínas luminescentes, a GFP envolve custos metabólicos mínimos, não implica a adição de substrato, nem a perturbação do metabolismo celular (Stiner e Halverson, 2002) e ainda permite o uso da fluorimetria e da microscopia de fluorescência para monitorizar a expressão do gene de forma a avaliar a sua biodisponibilidade e estabilidade (Liao et al., 2006).

### 1.4.3. Critérios importantes no desenvolvimento de um biossensor

Existem diferentes fatores a ter em conta no desenvolvimento de um biossensor, como o tipo de recetor, o método de imobilização, a concentração de biocomponentes imobilizado e as

condições eletroquímicas entre outros. As principais propriedades que definem um biossensor são:

### **I. Sensibilidade**

Define-se como sendo a relação entre o sinal elétrico produzido e o sinal biológico no transdutor. Normalmente a sensibilidade é usada como critério no processo de otimização, no entanto, como as propriedades estão interligadas, nem sempre a maior sensibilidade significa ótimas condições de trabalho. É necessário avaliar o biossensor tendo em conta outras características como a reprodutibilidade, estabilidade, facilidade de construção, tempo de resposta e (Andrade, 2006).

### **II. Estabilidade**

A estabilidade é uma medida em termos de atividade relativa, ou seja, a razão percentual entre atividade de um biossensor após um período de funcionamento e a atividade de um biossensor acabado de ser produzido, só é considerado estável quando o valor da atividade relativa se torna estável. A estabilidade operacional da resposta é um dos principais problemas na construção de um biossensor com potencial aplicação comercial. Este parâmetro pode variar consoante uma série de parâmetros como: a geometria do sensor, os métodos de preparação, o recetor e transdutor escolhidos e as suas condições operacionais, a concentração de analito, o tipo de contato que existe entre o analito e o biossensor, a temperatura, o pH, a presença de solventes orgânicos e ainda a composição da matriz da amostra (Andrade, 2010).

### **III. Tempo de resposta**

Consiste no tempo necessário para que uma variação na concentração do analito seja mensurável, com variação no sinal de saída do biossensor. Este parâmetro envolve diversos parâmetros, tais como, a cinética das reações, a capacidade de difusão do substrato na solução e a transferência de cargas através da camada enzimática (Andrade, 2010).

### **IV. Reprodutibilidade**

Consiste no potencial em serem obtidos resultados semelhantes a partir de biossensores produzidos sob as mesmas condições. A avaliação deste parâmetro é feito com base no desvio-padrão obtido entre o número de amostras de cada experiência e quão significativo é este valor em relação ao valor médio obtido (Andrade, 2010).

### 1.5. Métodos de quantificação do Cr (VI):

Tendo em conta os diversos efeitos nefastos do crómio hexavalente, tornou-se necessário desenvolver um método padrão que permita quantificar o Cr (VI) presente no ambiente. Muitos dos estudos desenvolvidos, são feitos com o objetivo de quantificar os níveis de cromato nas águas residuais. Poucos analisam a presença de cromato nas matrizes sólidas (como o solo) e até hoje, ainda não foi estabelecido um método padrão para a extração de Cr (VI) dos diversos tipos de matrizes sólidas. Posto isto, é importante realizar pesquisas relacionadas com as diferentes etapas do processo de análise e determinação da quantidade de Cr (VI) presente em matrizes sólidas. Os processos de análise de um composto envolvem basicamente (1) a amostragem, (2) preparação das amostras, (3) deteção das espécies de interesse e (4) tratamento dos dados analíticos. Geralmente, a etapa de preparação das amostras é a mais difícil laboratorialmente. Nesta etapa devem ser evitadas quaisquer contaminações, perdas de analito, erros e especialmente a degradação da espécie original. Em muitos dos casos é na etapa de preparação que ocorrem cerca de 50% dos erros e que se gasta perto de 60% do tempo total de análise (Matos, 2006).

Em 1977, o NIOSH (*National Institute for Occupation Safety and Health*, EUA) propuseram um método para a determinação de Cr (VI) em partículas atmosféricas. Consiste na análise espectrofotométrica com o uso de difenilcarbazida (DPC) como reagente cromogénico, adicionado após a extração ácida de partículas de ar filtrado. A reação da DPC com o Cr (VI) a pH entre  $1.0 \pm 0,3$  está na base do método mais comum para a determinação do Cr (VI) em soluções aquosas. Embora, seja considerado como um método muito sensível, altamente específico, relativamente simples e ainda capaz de quantificar somente Cr (VI) mesmo que exista no meio Cr (III), este método espectrofotométrico sofre com a presença de compostos interferentes, que podem ser solubilizados durante a extração de Cr (VI). Estes incluem: (a) a potencial redução dos compostos que reagem rapidamente com o Cr (VI), sob as condições ácidas do método DPC padrão e (b) as espécies que absorvem a 540 nm, que é o comprimento de onda para medir a absorvância do complexo colorido DPC-Cr(VI) (Pettine e Capri, 2005b).

Em 1996, USEPA (*United States Environment Protection Agency*) começou por estabelecer três critérios essenciais na construção de um método de extração de Cr (VI): (1) a solução deve extrair ou solubilizar todas as formas de Cr (VI); (2) as condições de extração não devem induzir a redução de Cr (VI) para Cr (III); (3) o método não deve causar oxidação de Cr (III) nativo contido na amostra para Cr (VI). Posteriormente, publicou o método 3060 (Malherbe et al., 2011), um método de extração de crómio hexavalente de matrizes sólidas (solo, lamas, sedimentos e resíduos semelhantes) que se baseia num processo de digestão alcalina e que satisfaz os três critérios anteriores para um largo espectro de matrizes sólidas. Este método usa a digestão alcalina para solubilizar os compostos solúveis e insolúveis de Cr (VI) nas amostras de solo. A

amostra é digerida com solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,28 M / NaOH 0,5M e aquecida até 90-95°C durante 60 minutos, de forma a dissolver o Cr (VI), estabilizar a amostra e evitar a redução de Cr (VI) para Cr (III). Após a digestão, é utilizada a difenilcarbazida (DPC) para quantificar o cromato hexavalente presente. Neste método, o ajuste do pH durante o processo de digestão é essencial para o sucesso da extração. Em 2003, Panichev e os seus colaboradores demonstraram que a extração do Cr (VI) a pH mais alcalino é mais eficiente que a extração ácida, visto que em meio alcalino os compostos de cromato são mais solúveis o que, por sua vez, minimiza processos de inter-conversão entre as diferentes formas redox de crómio.

Ao longo dos anos tem sido desenvolvidos diferentes métodos para determinar o Cr (VI) presente em matrizes sólidas. Embora consigam manter as interferências no mínimo, não as conseguem remover totalmente (Pettine e Capri 2005a).

### 1.6. Espectroscopia de Fluorescência ou Fluorimetria

A espectroscopia de fluorescência, ou simplesmente fluorimetria é um tipo de espectroscopia eletromagnética, em que a sua análise se baseia na fluorescência emitida pela amostra. A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta analítica extremamente sensível, amplamente aplicada na resolução de problemas que requerem baixos limites de deteção, apresenta simplicidade instrumental, baixo custo de manutenção e análise e, ainda, permite uma ampla faixa de resposta linear sendo, por isso, uma mais-valia na análise de compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial (Sottomayor et al., 2008). Neste trabalho, o equipamento usado para quantificar a luminescência obtida será o fluorímetro com leitura *Multi-well* (Figura 13). Com este aparelho é possível analisar várias amostras ao mesmo tempo, ao longo do tempo.



**Figura 13-**Fluorímetro *Multi-well*.

### 1.7. Método da difenilcarbazida

O método da difenilcarbazida (DPC) é um método colorimétrico sensível ( $LOD = 10\mu\text{g/L}$ ) em que a determinação do crómio hexavalente é feita com base na formação de um complexo molecular com cor. Apenas o Cr (VI) presente na amostra previamente acidificada, reage com a difenilcarbazida formando um complexo de cor vermelho-púrpura mais ativo a 540nm. A intensidade deste produto colorido é medido espectrofotometricamente na zona do visível e a concentração de Cr (VI) é determinada por comparação com a absorvância da amostra com a dos padrões que sofreram igual tratamento (Matos, 2006).

Apesar da simplicidade, este método pode ser influenciado pela presença de compostos interferentes que reagem com a DPC dando origem a falsos positivos. Embora a reação seja altamente específica para o Cr (VI), isto pode acontecer com outras espécies metálicas como molibdénio, cobre, ferro, mercúrio e vanádio. A presença destes interferentes em amostras aquosas não é significativa, no entanto, torna-se um problema quando aplicado em solos ou sedimentos (Unceta et al., 2010). Em 2005, Pettine e Capri e os seus colaboradores mostram que a presença de ácidos húmicos pode interferir positivamente com os resultados obtidos pelo método da difenilcarbazida uma vez que a digestão alcalina dos solos usada para minimizar a inter-conversão de Cr (III) - Cr (VI) na maioria dos protocolos experimentais publicados, facilita a solubilização dos ácidos húmicos. Por outro lado, a presença ou adição de redutores, como o peróxido de hidrogénio, Fe (II), compostos orgânicos entre outros podem interferir negativamente com a aplicação do método em solos.

Esta reação colorimétrica com difenilcarbazida é o método utilizado pela *Occupational Health Agencies* no Canadá e nos Estados Unidos e pelo método EPA para determinação de Cr (VI) em amostras de solo, sedimentos e efluentes (Matos, 2006).

### 1.8. Avaliação ecotoxicológica dos solos

Truhaut (1969) e Butler (1978) definiram a ecotoxicologia como “o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais sobre os organismos vivos, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera”. Deste modo, os testes ecotoxicológicos têm como objetivo avaliar os efeitos tóxicos de vários compostos químicos, em diferentes concentrações, em organismos vivos de uma determinada espécie. Enquanto com os testes toxicológicos ou químicos apenas é possível perceber o efeito da concentração e das propriedades do contaminante isoladamente, com este tipo de testes é possível perceber os efeitos (sinérgicos, antagonistas ou aditivos) da interação dos contaminantes com o ecossistema e da



sua biodisponibilidade (Magalhães e Ferrão, 2008). Ao longo dos anos têm sido implementadas diferentes normas que padronizam este tipo de testes. Para ensaios que envolvem a avaliação da ecotoxicidade em solos, a OCDE definiu uma mistura artificial como solo “padrão” de forma a ser possível comparar os diferentes ensaios.

Os organismos vivos usados nos ensaios ecotoxicológicos designam-se por (bio)indicadores, uma vez que apresentam um limite de tolerância ecológica muito pequeno quando expostos a determinado tipo de substâncias químicas. Exemplos de organismos usados neste tipo de testes são os colêmbolos (*Folsomia candida*), minhocas (*Eisenia andrei*; *E. fetida*), moluscos, ácaros, isópodes entre outros.

No presente trabalho, o teste ecotoxicológico realizado foi o teste de reprodução dos colêmbolos no solo contaminado com concentrações crescentes de cromato e consequente determinação da máxima concentração efetiva do tóxico (EC50). Este tipo de bioindicadores apresentam um grande potencial para serem usados na avaliação ecotoxicológica de resíduos orgânicos presentes nos solos (Domene et al., 2007). O teste de reprodução desta espécie de colêmbolos é parâmetro mais sensível que a determinação da mortalidade, embora implique de mais tempo (Natal-Luz et al., 2011).



## **2. Objetivos**



Como resultado do rápido desenvolvimento da indústria, grandes quantidades de metais pesados são descarregados no meio ambiente. Ao contrário dos contaminantes orgânicos, os metais pesados não são degradáveis e tendem a acumular-se nos organismos vivos, tornando-se tóxicos e carcinogênicos. A maioria das tecnologias que são normalmente usadas na limpeza e detecção dos metais pesados dos solos contaminados envolvem extração físico-química, estabilização e solidificação. Estas técnicas, geralmente, tornam-se caras e levam à produção de contaminantes secundários quando aplicadas a grandes áreas de contaminação. Deste modo, o uso de microrganismos na detecção de contaminantes e na remediação dos solos tem sido cada vez mais uma alternativa aos métodos convencionais. O objetivo principal deste trabalho consistiu em testar um sistema de biossensores capazes de detectar o crômio hexavalente em solução aquosa através da determinação da sua especificidade e sensibilidade e determinar a sua utilidade na detecção de cromato em solos, correlacionando as quantidades de terminadas com os níveis de ecotoxicidade do solo.

Nesse sentido foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- I. Otimizar as condições de crescimento das construções bacterianas;
- II. Otimizar a metodologia de extração do Cr (VI) do solo;
- III. Avaliar a capacidade de detecção de cromato por duas construções bacterianas diferentes como sensores;
- IV. Avaliar a especificidade, sensibilidade dos biossensores em detectar cromato em soluções aquosas;
- V. Avaliar a especificidade, sensibilidade dos biossensores em detectar cromato em amostras de solo;
- VI. Relacionar os testes de ecotoxicidade com base em colêmbolos com a determinação do cromato pelos biossensores.



### **3. Materiais e Métodos**





#### 3.1. Amostras de Solo

No presente estudo foram usados dois tipos de solo. O solo Natural, proveniente da escola Agrária de Coimbra, composto por 62,4% de areia, 21,2% de *slite*, e 16,4% argila. O pH (KCl 1M) é de 6,9, a capacidade de troca catiónica é de 0,025cmol/g e o conteúdo de matéria orgânica é de  $3,3 \pm 0,1$  %. O segundo solo foi o solo *OCDE*, um solo considerado padrão, composto por 70% de areia, 10% de turfa (seca ao ar e crivada a 2mm) e 20% argila.

#### 3.2. Estirpes bacterianas e construções

Neste trabalho as construções bacterianas usadas foram a pCHRGFP1 *E. coli* e a pCHRGFP2 *O. tritici* (descrito em 1.4.1).

#### 3.3. Soluções

**3.3.1.** Solução stock de crómio foi uma solução de cromato de sódio 1M ( $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ ). Para tal, pesou-se 16,196 g de  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  e dissolveu-se em 100 ml de água miliQ autoclavada. A solução foi guardada num frasco estéril.

**3.3.2.** Solução de difenilcarbazida 0,5%. Pesou-se e dissolveu-se 0,5 g de 1,5-difenilcarbazida em 100 ml de acetona. A solução foi guardada a 4°C e protegida da luz. As soluções de difenilcarbazida usadas foram refeitas a cada semana dada a rápida degradação do reagente.

**3.3.3.** Solução stock de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 1M. A partir desta solução preparou-se uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,2N, que foi usada para acidificar as amostras e soluções padrão no método colorimétrico da difenilcarbazida.

**3.3.4.** Solução stock de glucose a 20%. Para tal, dissolveu-se 20g de glucose em 100 ml de água miliQ, guardou-se num frasco e autoclavou-se.

**3.3.5.** Soluções stock dos antibióticos canamicina 30mg/ml e gentamicina 25mg/ml. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e filtradas por seringa com filtros de acetato de celulose 0,2  $\mu\text{m}$ .

**3.3.6.** Solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ . Para um volume final de 100mL, dissolveu-se 33 g de sulfato de amónio em água, adicionou-se 6,5mL hidróxido de amónio e perpez-se o volume com água. Antes de utilizar a solução foi desgaseificada, durante 5-10minutos.

**3.3.7.** Solução KCl 1M. Preparada dissolvendo 7,45 g de cloreto de potássio em 100mL de água destilada.

Todas as soluções aquosas e foram feitas com água miliQ (Simplicity® UV, Millipore Corp., France) autoclavada.

#### 3.4. Meios de Cultura

**3.4.1.** Meio LB (Luria-Bertani) é um meio líquido nutricionalmente muito rico usado para o crescimento de bactérias. Para 1 litro de água destilada, pesou-se e dissolveu-se 10g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl. De seguida foi autoclavado a 121°C, durante 20 minutos.

**3.4.2.** O meio MMT (meio mínimo tamponado com Tris) é um meio nutricionalmente pobre, com baixo teor de sulfatos que impede a quelatação dos metais. Para um litro de água destilada, pesou-se e dissolveu-se 6,06 g l-1 Tris, 4,68 g NaCl, 1,49 g KCl, 1,07 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,43 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 0,03 g CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 0,3% glucose.

#### 3.5. Protocolo Experimental

##### 3.5.1. Cultivo das células bacterianas (adaptado de Branco et al., 2013)

As bactérias foram cultivadas caixas de Petri com meio LB com agar suplementado com os antibióticos (camamicina e/ou gentamicina) a 37°C durante 24 horas ou 48 horas, para a pCHRGFP1 *E. coli* and pCHRGFP2 *O. tritici*, respetivamente. Posteriormente, foram inoculadas em meio LB e incubadas a 36±1°C, overnight, a 180 rpm num agitador orbital refrigerado (Aralab agitorb 200) de modo a aumentar massa celular, que foi usado como pré-inoculo. A seguir, cada pré-inoculo foi diluído 100 vezes num novo balão de Erlenmeyer de 300mL contendo 100ml de meio LB liquido fresco e incubado durante cerca de 3 horas, a 36±1°C, a 180 rpm, num agitador orbital refrigerado até atingir a fase estacionária e uma densidade óptica de 0,2-0,3 para a pCHRGFP2 *O. tritici* e de 0,5-0,6 para a pCHRGFP1 *E.coli*. Posteriormente, as células foram centrifugadas durante 25min, a 4°C, a 4000 rpm (Eppendorf, 5810 R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em meio MMT suplementado com 0,3% de glucose, de modo a obter uma densidade óptica (DO) de, aproximadamente, 0,8. Esta suspensão foi usada como elemento de reconhecimento biológico do biossensor para a quantificação de cromato.

##### 3.5.2. Curva (s) de calibração

A fim de correlacionar o sinal fluorescência emitida pelas bactérias com a concentração de Cr (VI) presente nas amostras, traçou-se uma curva de calibração para cada uma das estirpes. A partir da solução *stock* de 1M Cr (VI), foram preparadas diferentes soluções de trabalho, as

quais foram utilizadas para preparar os diferentes padrões com concentrações entre 0-20  $\mu\text{M}$  de Cr (VI). A quantificação da fluorescência foi determinada tal como é descrita no item 2.5.3.

#### 3.5.3. Quantificação de Crómio (VI) (adaptado de Branco et al., 2013)

De modo a quantificar o Cr (VI) biodisponível em solução, adicionou-se igual volume de solução padrão e de suspensão bacteriana num tubo cónico estéril de 50mL, resultando numa solução padrão: suspensão bacteriana (1:1). Incubou-se no agitador orbital (180 rpm) a 36°C durante 5 horas. Foi medida a fluorescência em alíquotas de 200 $\mu\text{L}$  (em triplicado) numa microplaca de 96 poços, ao fim de 0, 3 e 5 horas. As leituras foram realizadas no fluorímetro (*Infinite M200*) de leituras *multi-well* com o comprimento de onda de excitação e emissão de 475nm e de 510nm, respetivamente.

#### 3.5.4. Contaminação artificial dos solos (adaptado de Joan Cáliz et al., 2012)

Quantificou-se a quantidade de cromato que fica nos diferentes solos após a redução esperada do cromato adicionado. Foram pesados 300g de solo e contaminados artificialmente com 97,6 ml (solo natural) e 54,3ml (solo artificial) de solução de cromato de sódio, de modo a obter 7 concentrações diferentes entre 0- mg/Kg). De seguida, foram divididos, de forma igual, por frascos de vidro com tampa (com 4 cm de diâmetro e 7 de altura) e devidamente guardados 4°C.

O volume de solução de cromato utilizado para contaminar os solos foi calculado de modo a não exceder a humidade de 50% da retenção de água no solo. Durante o ensaio foi medido o pH (com solução de KCl 1M numa proporção 1:6 solo: solução v:v) e a humidade dos solos (por determinação da perda de peso do solo fresco quando submetido a 105°C durante 12 horas).

#### 3.5.5. Extração do crómio (VI) no solo (adaptado de et al., 2005; Ivask et al., 2002)

Um grama de solo contaminado foi colocado um tubo cónico estéril, adicionou-se dez mililitros de água miliQ (18,2 M $\Omega$  cm) autoclavada e homogeneizou-se com o auxílio do vortex. De seguida, colocou-se a agitar num agitador orbital refrigerado a 250rpm, a 25°C, durante 3horas. Centrifugou-se as amostras a 3000 rpm, a 4°C, durante dez minutos. Decantou-se o sobrenadante para um novo tubo de falcon estéril e desprezou-se o sedimento. Numa segunda fase, procedeu-se tal como é descrito no item 2.5.3 em que, em vez de solução padrão, foi adicionado o mesmo volume de sobrenadante. Tendo em conta as concentrações de cada amostra e a sensibilidade do elemento de reconhecimento biológico, foi necessário realizar algumas diluições das amostras.

#### 3.5.6. Teste ecotoxicológico (adaptado de Natal-Luz et al., 2011)

##### 3.5.6.1. Organismos teste e condições de cultura

Os colêmbolos *Folsomia candida* usados nos ensaios foram provenientes de culturas de laboratório mantidas à temperatura constante de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com um fotoperíodo de 16:8 h luz:escuro. Estes organismos foram cultivados em recipientes de plástico com o fundo revestido por um substrato composto pela mistura de gesso de Paris com carvão ativado na proporção de 11:1 (p:p). O substrato foi mantido húmido e fermento de pão granulado foi usado como fonte de alimento (uma porção por semana a fim de evitar a deterioração da comida por fungos).

##### 3.5.6.2. Teste de reprodução com colêmbolos

Os testes ecotoxicológicos com colêmbolos foram feitos segundo as normas ISO (1999). Preparou-se um gradiente de sete concentrações (entre 0-120mg/Kg) para o solo natural e para o solo OCDE. Para cada concentração foram preparadas cinco réplicas, que consistiram num frasco de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura) com tampa, com trinta gramas de solo fresco. Em cada frasco foram introduzidos dez colêmbolos com 10-12 dias de idade e duas miligramas de fermento de pão. Os frascos foram abertos semanalmente durante alguns instantes ao longo do teste, de modo a permitir o arejamento do solo. Ao fim de catorze dias, a humidade do solo foi verificado em cada réplica por pesagem. Quando a perda de peso foi superior a 2%, este foi restaurado com a adição de água destilada. Ao fim de 28 dias, o conteúdo do frasco foi transferido para um pequeno recipiente que foi depois inundado com água. Adicionou-se algumas gotas de tinta azul e, após agitação suave, os animais flutuando à superfície foram fotografados. A partir destas imagens foi determinado o número de juvenis e de adultos sobreviventes. Os adultos não encontrados foram considerados mortos. Foi preparada uma réplica adicional sem colêmbolos para cada concentração testada de modo a poder medir-se a humidade e o pH final do teste.

##### 3.5.6.3. Determinação de EC50s

A comparação entre a reprodução observada no controlo e a reprodução observada nas concentrações testadas foi feita através de análises de variância (ANOVA) de uma via seguidos do teste pos-hoc de Dunnett. Os EC50s foram estimados através de regressões não lineares usando a equação de Hormesis. Antes da análise estatística, os pressupostos de normalidade e homogeneidade dos dados foram confirmados através do teste de Barlett. A análise estatística dos resultados foi feita através do programa **STATISTICA, versão 7**.

### 3.5.7. Análise Química de Cr (VI) – Método de difenilcarbazida

A quantificação do Cr (VI) presente nos sobrenadantes foi feita pelo método colorimétrico descrito no *Standard Methods* (Anônimo,1985). Preparou-se uma curva de calibração: a partir da solução *stock*, preparou-se uma solução de Na<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> de 10mM, e a partir desta preparou-se uma solução de trabalho contendo 5µg/mL de Cr (VI). Para traçar a curva padrão prepararam-se os seguintes padrões:

**Tabela 2-** Preparação da curva de calibração do método de difenilcarbazida.

Pa drão	Concentração Cr (VI) (µg/mL)	Volume de Cr (VI) (ml)	Volume de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2N (ml)
I	0	0	10
II	0,1	0,2	9,8
III	0,25	0,5	9,5
IV	,5	1,0	9,0
V	0,75	1,5	8,5

Colocou-se 9,9 ml solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2N em cada tubo e adicionou-se 100 µl de cada sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se 200 µl solução de difenilcarbazida 0,5% a cada amostra ou padrão. Homogeneizou-se fazendo vortex. Após 10 minutos, leu-se a absorvância a 540nm num espectrofotômetro UV/Vis (Evolution 260 Bio, Thermo Scientific), usando água como branco. Para traçar a curva de calibração foram feitos triplicados, e para as amostras foram feitos pelo menos, duplicados.

### 3.5.8. Análise química de Cr (VI) -Cromatografia Iônica (Método EPA 7199)

A análise por cromatografia iônica, consistiu a aplicação do Método EPA 7199, concebido para determinar o crômio hexavalente presente em amostras aquosas e foi realizada pelo laboratório LQA-Ambiente (Rua Delfim Lima 3534, Canelas, Canelas 4410-229 Vila Nova de Gaia). De forma resumida, o procedimento consistiu na filtração da amostra através de um filtro de 0,45µm e correção do pH (Jenway, 3510 pH meter) para pH 9-9,5 com solução tampão de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ NH<sub>4</sub>O, seguida de injeção de 50-250 µL no cromatógrafo Dionex modelo ICS-5000. Este está equipado com uma 1) pré-coluna que contém um adsorvente capaz de remover substâncias orgânicas e outras partículas que possam danificar a coluna de separação, 2) com uma coluna capilar, 3) coluna de pós-derivação com difenilcarbazida e posterior detecção do

complexo colorido foi feita ao comprimento de onda de 530 nm e 4) um computador ou integrador em que é registada a resposta do detetor.

#### **3.5.9 Análise Estatística**

Para todos os resultados experimentais obtidos foi realizado o tratamento estatístico (média e desvio padrão (SD)) com o programa Microsoft® EXCEL.

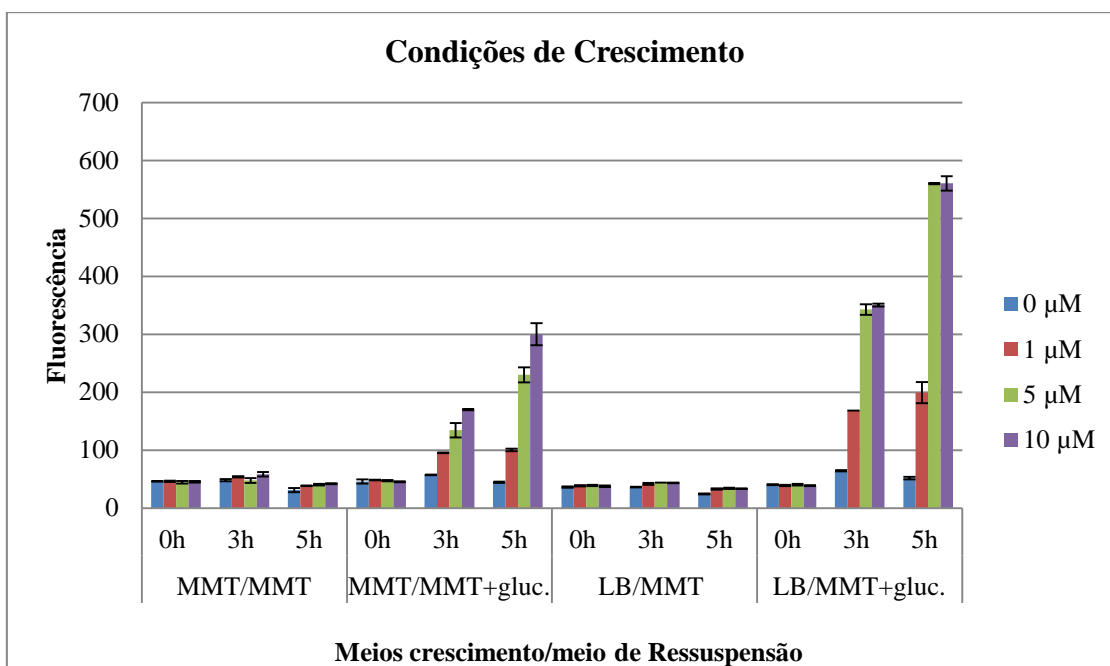
#### **4. Resultados**





**4.1. Otimização das condições de crescimento das construções bacterianas na presença de Crômio (VI)**

A Figura 14 mostra os resultados obtidos durante o processo de otimização das condições de crescimento e de manutenção da viabilidade sem crescimento das construções bacterianas. Foram comparados diferentes meios de cultura (o meio LB, meio MMT e meio MMT suplementado com glucose 0,3%) para quatro concentrações diferentes de Cr (VI), ao longo de 5 horas. Os resultados mostram que as células apresentam maior viabilidade mas sem se observar crescimento quando cultivadas em meio LB para o crescimento e o meio MMT suplementado com 0,3 % de glucose para a manutenção construções bacterianas.

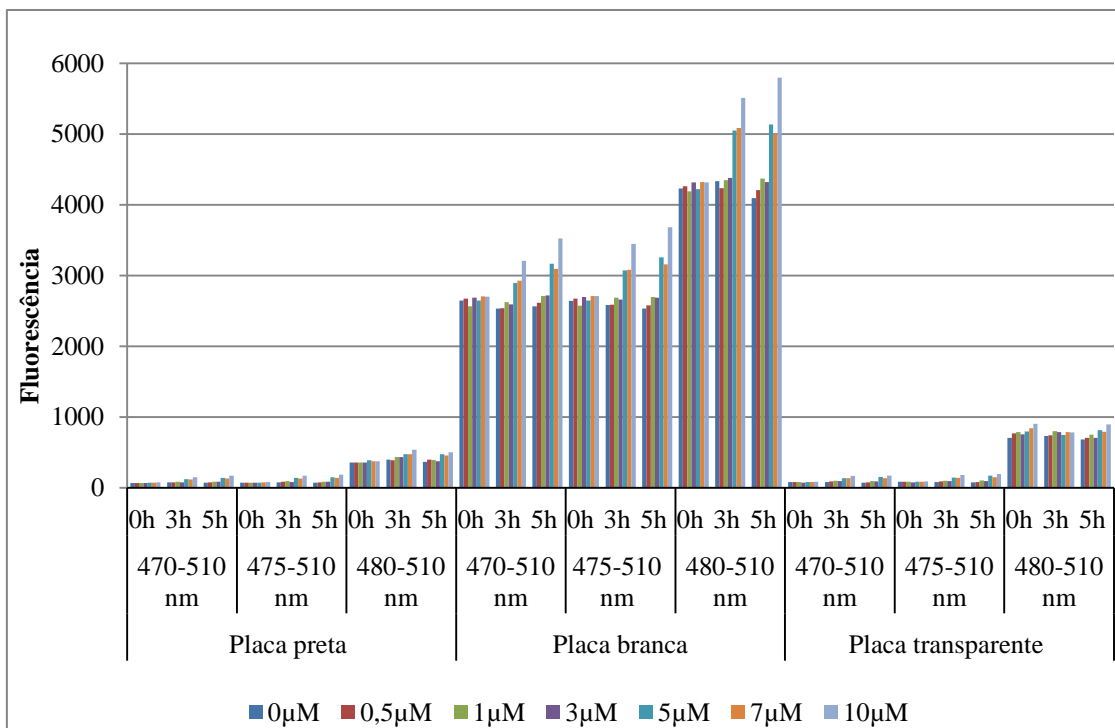


**Figura 14- Otimização das condições de crescimento para a pCHRGFP1 *E. coli*. LB-meio *Luria Bertani* (LB); MMT-meio mínimo tamponizado com Tris; MMT+gluc. – Meio mínimo tamponizado com Tris suplementado com 0,3% de glucose.**

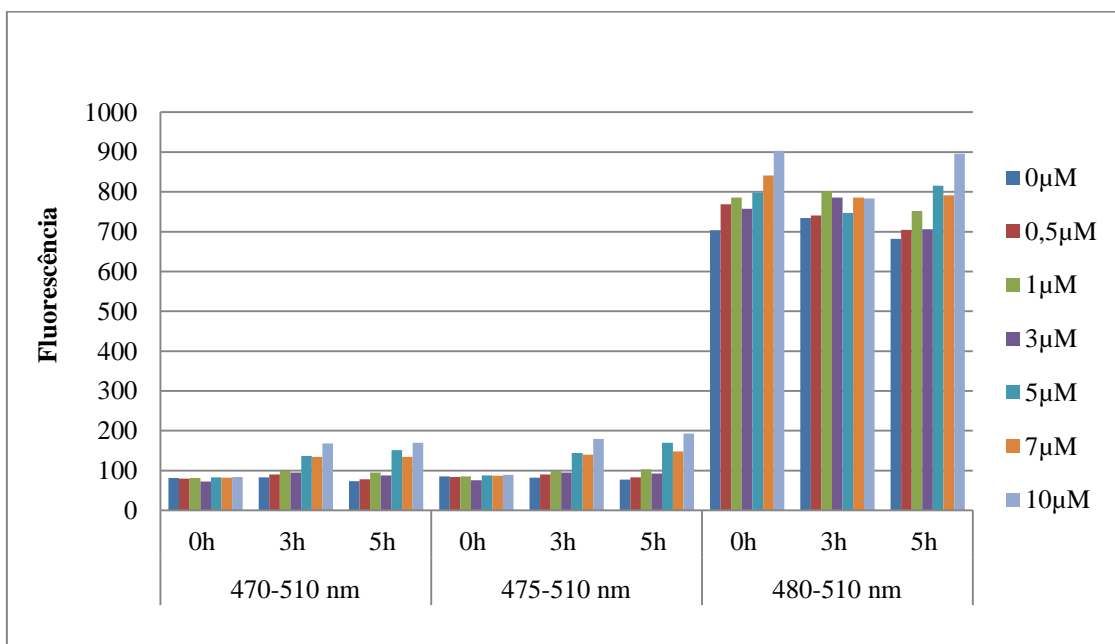
#### 4.2. Otimização das condições de quantificação do crómio pelos biossensores

Com o objetivo de otimizar a quantificação da fluorescência emitida pelos biossensores, foram testados diferentes parâmetros tais como o comprimento de onda de excitação e o tipo de microplacas *multi-well* 96 poços usadas. Para tal, comparou-se a capacidade da pCHRGFP1 *E. coli* em detectar cromato presente em solução aquosa, quando usado uma microplaca *multiwell* de 96 poços transparente, branca ou preta, e a leitura da fluorescência a três comprimentos de onda de excitação diferentes (470, 475 e 480 nm e com o comprimento de onda de emissão de 510nm. Na Figura 15 estão resumidos os resultados obtidos para as diferentes condições testadas. Em relação ao tipo de microplacas *multiwell* 96 poços, verifica-se que embora os valores de fluorescência obtidos com a microplaca branca sejam valores mais elevados, ao longo do tempo de incubação os valores de fluorescência diminuem, sobretudo para concentrações mais baixas. Os resultados obtidos com a microplaca *multiwell* preta foram semelhantes aos da microplaca *multi-well* transparente. Optou-se por esta última, uma vez que para além de permitir ler a fluorescência emitida pela suspensão, permitiu também medir a absorvância a 600nm, ou seja, a densidade ótica (DO) de forma a controlar o crescimento das células.

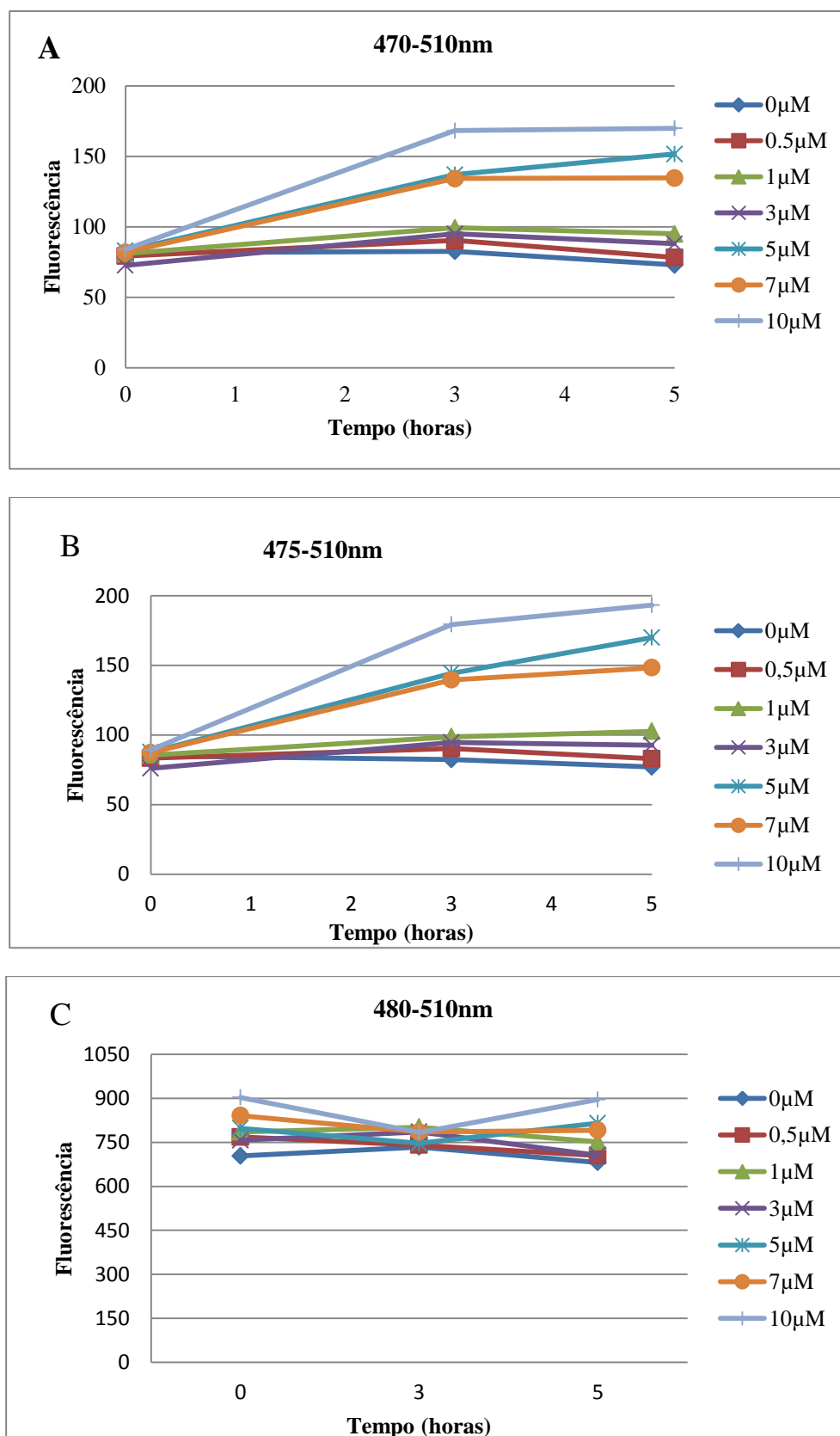
Depois de escolher a microplaca *multiwell* 96 poços mais adequada, selecionou-se o comprimento de onda de excitação mais adequado para quantificar a fluorescência emitida pelos biossensores. Nas Figuras 16 e 17, estão os resultados referentes a fluorescência emitida ao longo de cinco horas para diferentes concentrações de cromato (0-10 $\mu$ M), para os três comprimentos de onda de excitação testados em microplacas *multiwell* 96 poços transparente. Os resultados mostram que apenas nos dois primeiros comprimentos de onda (470 e 475nm) (Figura 17A-B) houve um aumento linear ao longo do tempo, em que era possível diferenciar as diferentes concentrações de cromato. Contudo, no intervalo 470-510nm observou-se uma pequena diminuição da fluorescência entre as três e as cinco horas, nomeadamente para concentrações mais baixas. Apenas para o intervalo 475-510nm é que se verificou um aumento contínuo da fluorescência durante as cinco horas.



**Figura 15-** Otimização das condições de quantificação do Cr (VI). Variação da fluorescência obtida com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* em relação ao tipo de placa, ao comprimento de onda utilizado, o tempo de incubação e a concentração de cromato.



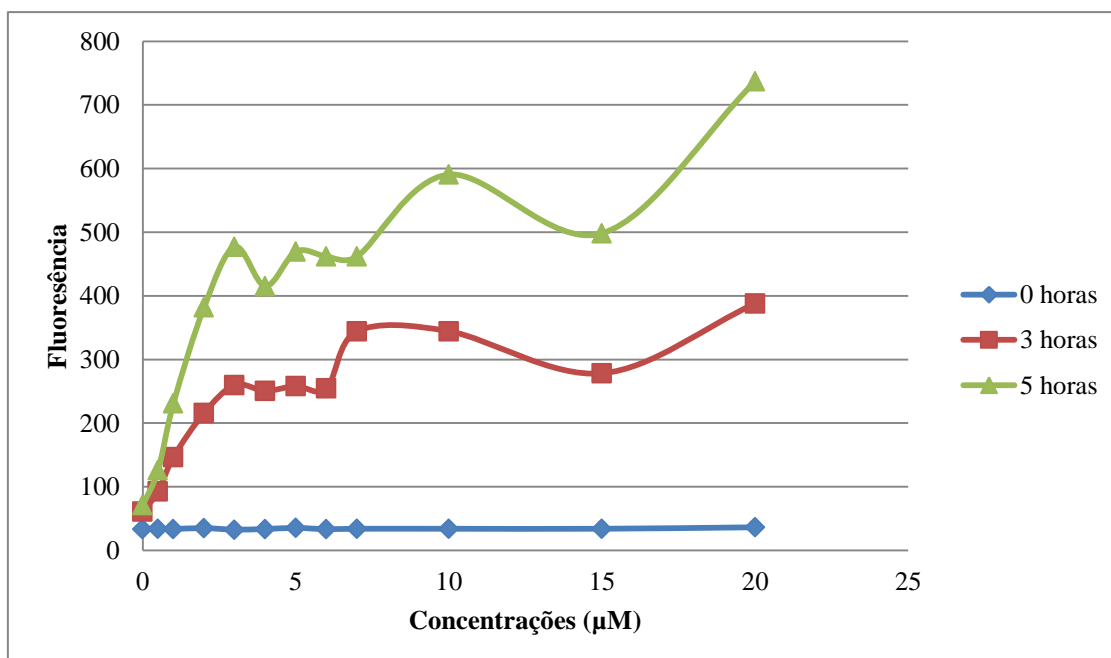
**Figura 16-** Otimização das condições de quantificação da fluorescência emitida pelas construções bacterianas, para diferentes intervalos de comprimento de onda, em microplaca *multi-well* 96 poços transparente.



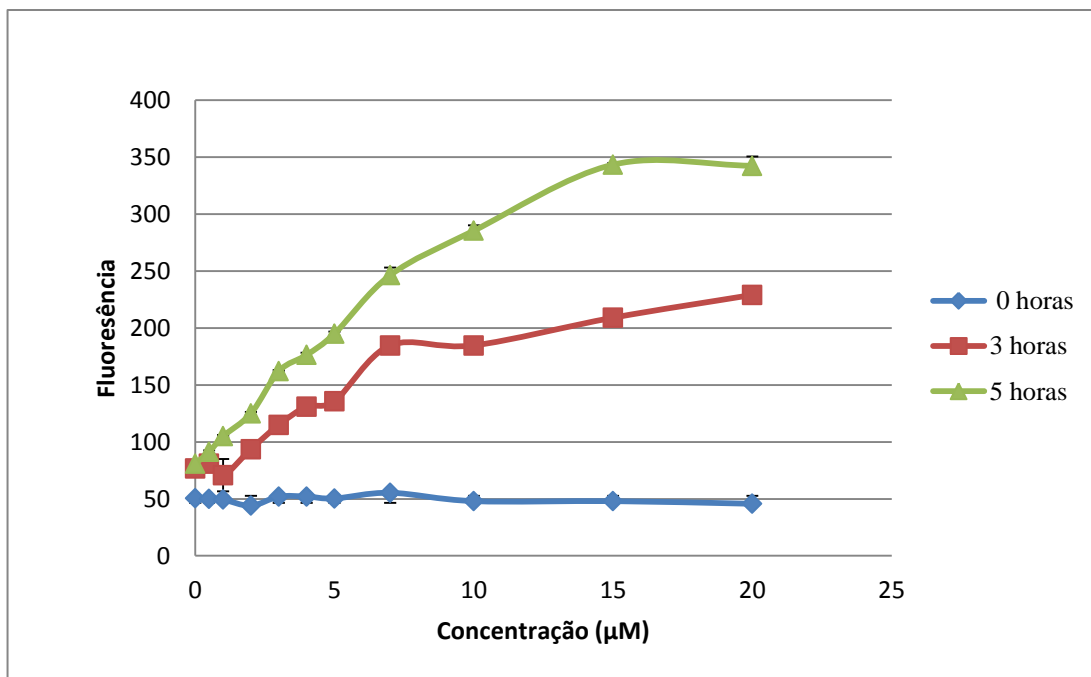
**Figura 17-** Otimização das condições de quantificação o Cr (VI), para os diferentes comprimentos de onda de excitação: (A) 470nm, (B) 475nm, (C) 480nm, para a microplaca *multi-well* de 96 poços transparente.

### 4.3. Curva de calibração dos biossensores

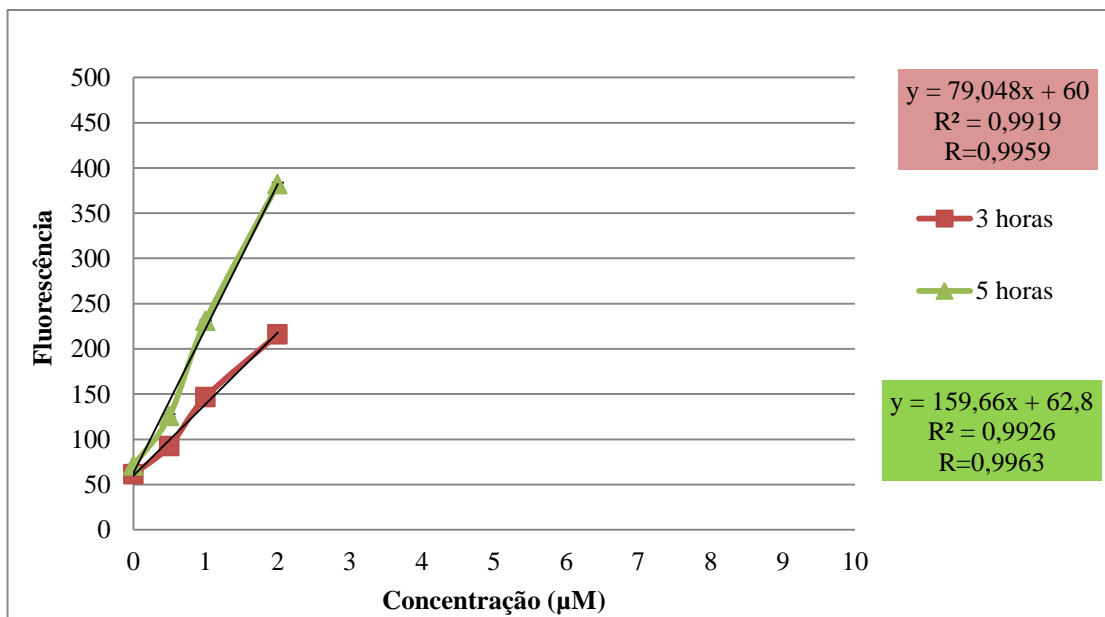
A fim de correlacionar a fluorescência emitida com a concentração de cromato, traçou-se a curva de calibração para cada uma das construções bacterianas. As figuras 18 e 19 mostram a resposta dos biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*, respectivamente, para diferentes concentrações de cromato (0-20  $\mu\text{M}$ ) ao fim de 0, 3 e 5 horas. A partir delas, e selecionando apenas as concentrações que apresentaram resposta linear, traçou-se a curva de calibração para cada biossensor (Figuras 20 e 21). Os resultados mostram que a construção pCHRGFP1 *E. coli* apresenta maior sensibilidade ou menor tolerância ao cromato quando comparada com a pCHRGFP2 *O. tritici*. É visível que para concentrações mais baixas de cromato (como 0,5-1 $\mu\text{M}$ ) a construção pCHRGFP1 *E. coli* apresenta valores de fluorescência entre 126 $\pm$ 1,73 e 231 $\pm$ 1 $\mu\text{M}$ , enquanto a pCHRGFP2 *O. tritici* apenas apresenta valores entre 91,3 $\pm$ 1,15 e 105 $\pm$ 1 $\mu\text{M}$ . Esta última construção bacteriana mostra uma resposta linear para um intervalo de concentrações maior (0-10  $\mu\text{M}$ ) que a pCHRGFP1 *E. coli* (0-2 $\mu\text{M}$ ). Para além disso, a construção pCHRGFP1 *E. coli* apresenta uma maior diferença de valores de fluorescência para duas concentrações consecutivas. Por exemplo, para a pCHRGFP1 *E. coli*, a diferença entre a fluorescência emitida para a concentração 0,5 e para 1 $\mu\text{M}$  foi de 105 unidades enquanto para a pCHRGFP2 *O. tritici* a diferença foi de 13 unidades.



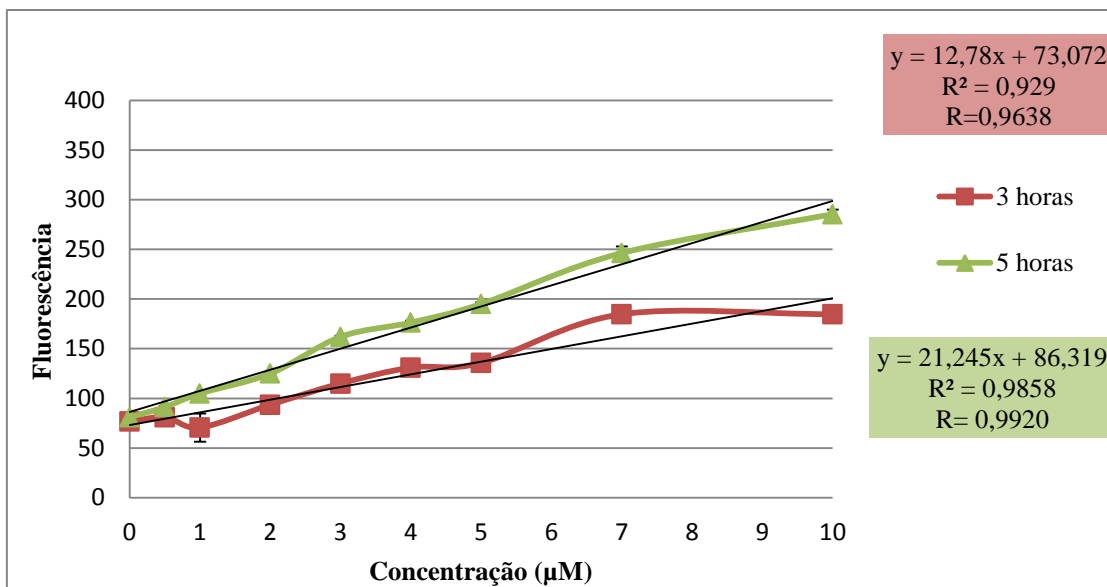
**Figura 18-** Resposta do biossensor pCHRGFP1 *E. coli* para diferentes concentrações de cromato, ao fim de 0 horas (azul), 3 horas (vermelho) e 5 horas (verde) de incubação.



**Figura 19-** Resposta do biossensor da pCHRGFP2 *O. tritici* para diferentes concentrações de cromato, ao fim de 0 horas (azul), 3horas (vermelho) e 5horas (verde) de incubação.



**Figura 20-** Curva de calibração de pCHRGFP1 *E. coli*. Ao fim de 3 horas (vermelho) e 5 horas (verde).



**Figura 21**-Curva de calibração de pCHRGFP2 *O. tritici*. Ao fim de 3 horas (vermelho) e 5 horas (verde).

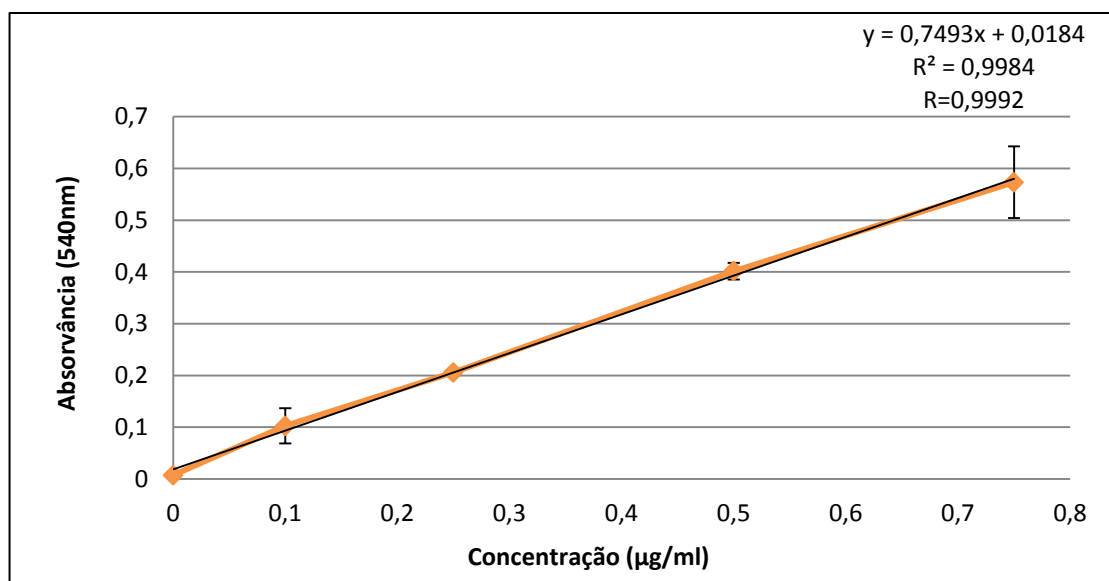
#### 4.4. Curva de calibração do método de difenilcarbazida

De modo a conseguir aplicar o método colorimétrico da difenilcarbazida na determinação do cromato presente nos solos, foi necessário construir uma curva de calibração. Para isso, foram preparados diferentes padrões (tal como é descrito nos materiais e métodos) e lida a absorvância a 540 nm (zona cor de rosa do espectro eletromagnético) de modo a quantificar a intensidade do complexo de cor vermelho-púrpura formado. Tal como mostra a Figura 22, obteve-se linearidade entre os valores obtidos para concentrações entre 0-0,75µg/ml ou seja entre 0- 14,4µM.

#### 4.5. Otimização da metodologia de extração do Cr (VI) presente no solo

Os solos usados tinham sido contaminados um mês antes do início da experiência, o que significa que a quantidade de crómio no estado de oxidação +6 presente nos solos já era reduzida no início da experiência.

A extração de Cr (VI) dos 2 tipos solo utilizados neste estudo foi testada em diferentes condições. Tendo em conta, a rápida redução do Cr (VI) a Cr (III) testou-se o tempo de agitação necessário para extrair o Cr (VI) do solo sem que ocorre-se a redução do cromato a Cr (III). A partir de amostras de solo natural e de solo OCDE contaminado artificialmente com quatro concentrações diferentes (tabela 3), testou-se tempos de agitação de 3 horas e 1 hora.



**Figura 22-** Curva de calibração do método de difenilcarbazida.

**Tabela 3** - Concentrações usadas na contaminação dos solos durante o processo de otimização.

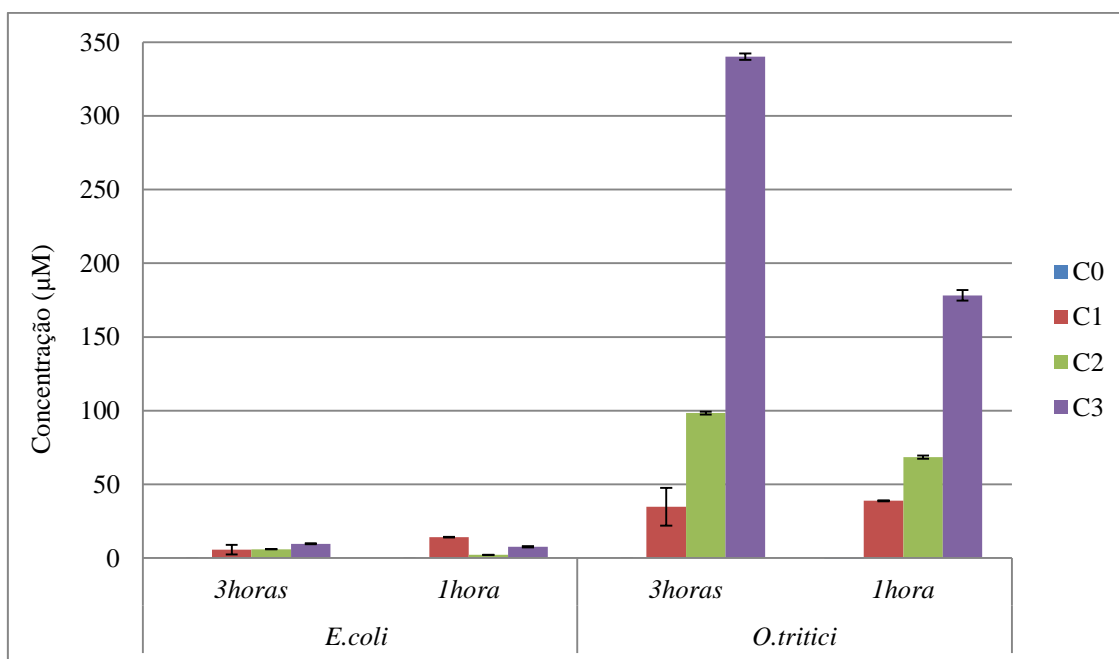
	mg/Kg	mg/100g	mg/g	mg/mL	µM
<b>C0</b>	0	0	0	0	0
<b>C1</b>	100	10	0,1	0,01	192,3
<b>C2</b>	1000	100	1	0,1	1923,1
<b>C3</b>	5000	500	5	0,5	9615,4

Para o solo natural, verificou-se que após uma hora de agitação, para as duas primeiras concentrações mais baixas (100 e 1000 mg/Kg) foi possível detetar com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli*  $14,26 \pm 0,18 \mu\text{M}$  e  $2,22 \pm 0,072 \mu\text{M}$  de cromato, respetivamente, enquanto com o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* foi possível detetar  $38,91 \pm 0,35 \mu\text{M}$  e  $68,49 \pm 1,16 \mu\text{M}$  de cromato, respetivamente. Todavia, ao fim de três horas de agitação com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* foi possível detetar  $5,73 \pm 3,34 \mu\text{M}$  e  $6,06 \pm 0,18 \mu\text{M}$ , respetivamente, enquanto com o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* foi possível detetar  $34,83 \pm 12,83 \mu\text{M}$  e  $98,38 \pm 0,98 \mu\text{M}$ , respetivamente.

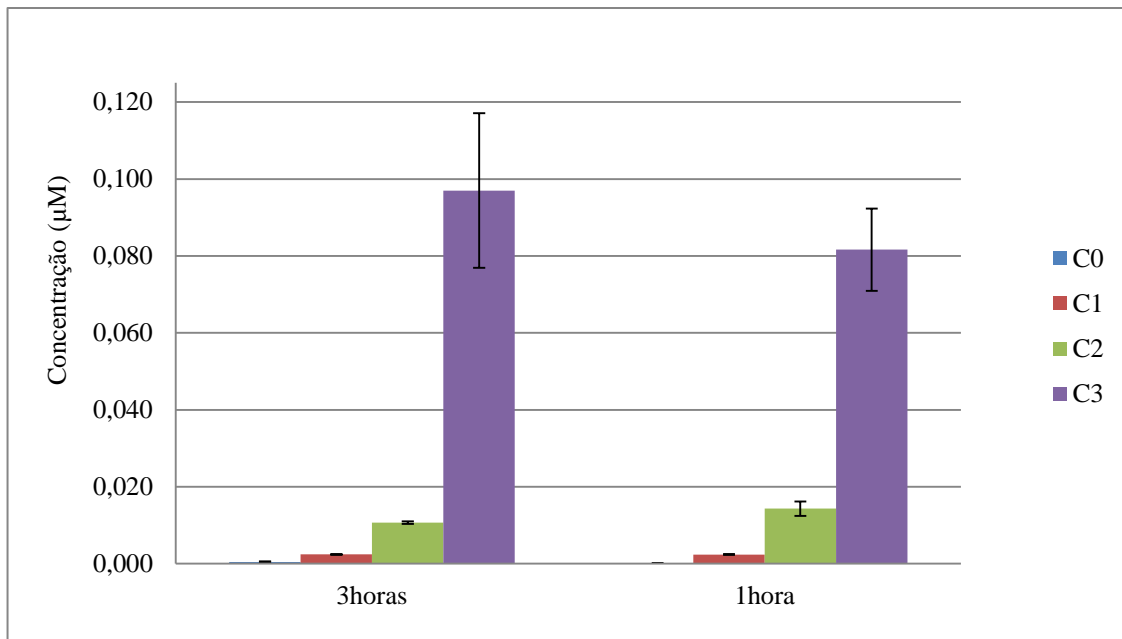


Em relação o solo OCDE verificou-se que após uma hora de agitação, para as duas primeiras concentrações (100 e 1000 mg/Kg) foi possível detetar com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli*  $0,39 \pm 0,0788\mu\text{M}$  e  $3,63 \pm 0,048\mu\text{M}$ , respetivamente, enquanto com o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* foi possível detectar  $99,71 \pm 1,22\mu\text{M}$  e  $64,25 \pm 0,95\mu\text{M}$  e, respetivamente. Todavia, ao fim de três horas de agitação com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* foi possível extrair  $0,08 \pm 0,075\mu\text{M}$  e  $1,228 \pm 0,054 \mu\text{M}$ , respetivamente, enquanto com o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* foi possível extrair  $-5,88 \pm 0,136 \mu\text{M}$  e  $59,55 \pm 0,136\mu\text{M}$ , respetivamente.

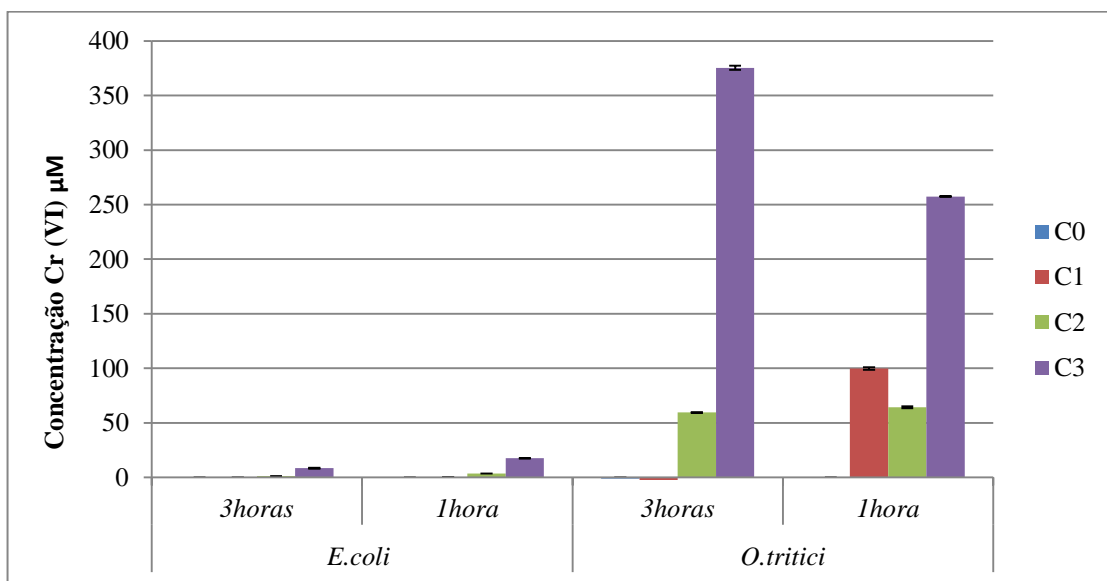
As Figuras 23 e 24, mostram os resultados obtidos durante a otimização do processo de extração do cromato presente no solo natural através da quantificação pelos dois biossensores desenvolvidos e pelo método da difenilcarbazida, respetivamente. Enquanto nas Figuras 25 e 26 estão os resultados de otimização do processo de extração do cromato obtido nas mesmas condições para o solo OCDE. Ao comparar os resultados obtidos com os biossensores, para os dois tempos de extração verificou-se que quantidade de cromato extraída foi maior após três horas de agitação para qualquer um dos solos.



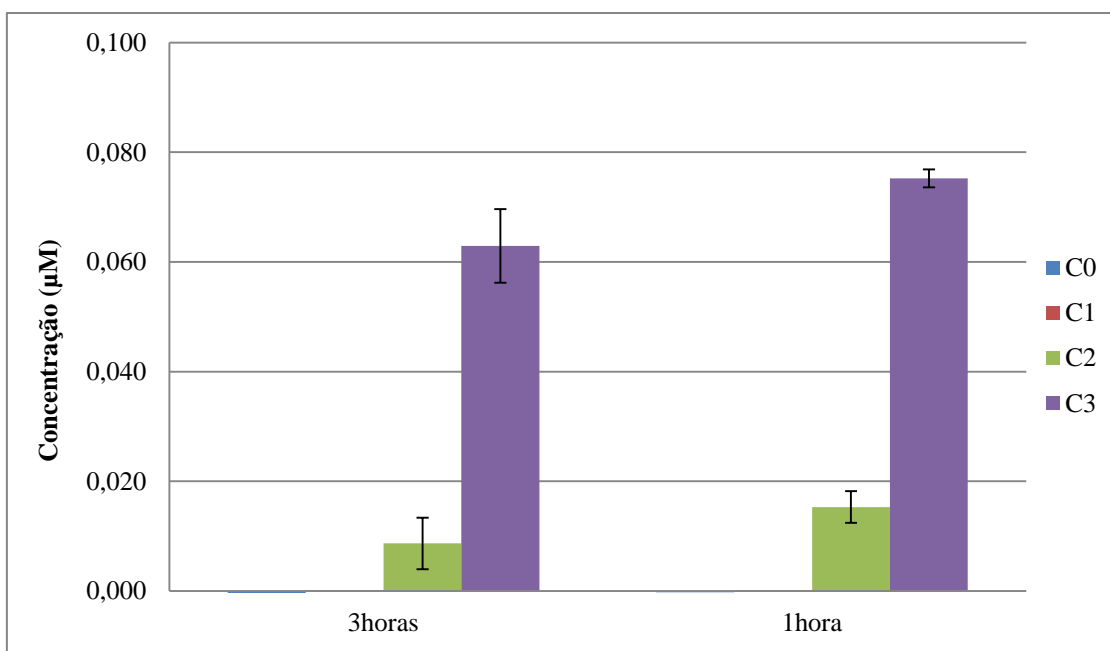
**Figura 23-** Otimização do tempo de extração de cromato de solo natural. Resultados obtidos com os biossensores desenvolvidos.



**Figura 24-** Otimização do tempo de extração do cromato do solo natural. Resultados obtidos pelo método da difenilcarbazida.



**Figura 25 -** Otimização do tempo de extração de cromato de solo OCDE. Resultados obtidos com os biossensores.



**Figura 26** - Otimização do tempo de extração do cromato do solo OCDE- Resultados obtidos pelo método da difenilcarbazida.

#### 4.6. Determinação do Cr (VI) presente no solo

O solo é uma matriz muito heterogénea, em que as suas características físico-químicas variam consoante a sua composição. Os 2 tipos de solo contaminados com cromato em concentrações conhecidas (Tabela 4) foram usados para determinar a capacidade dos biossensores em detectar cromato e ao mesmo tempo determinar a variação da concentração de cromato no solo ao longo do tempo. Para tal, foram analisadas alíquotas de um grama solo ao fim de 0, 7, 14 e 28 dias do dia da contaminação dos solos.

**Tabela 4-** Concentrações usadas na contaminação dos dois solos.

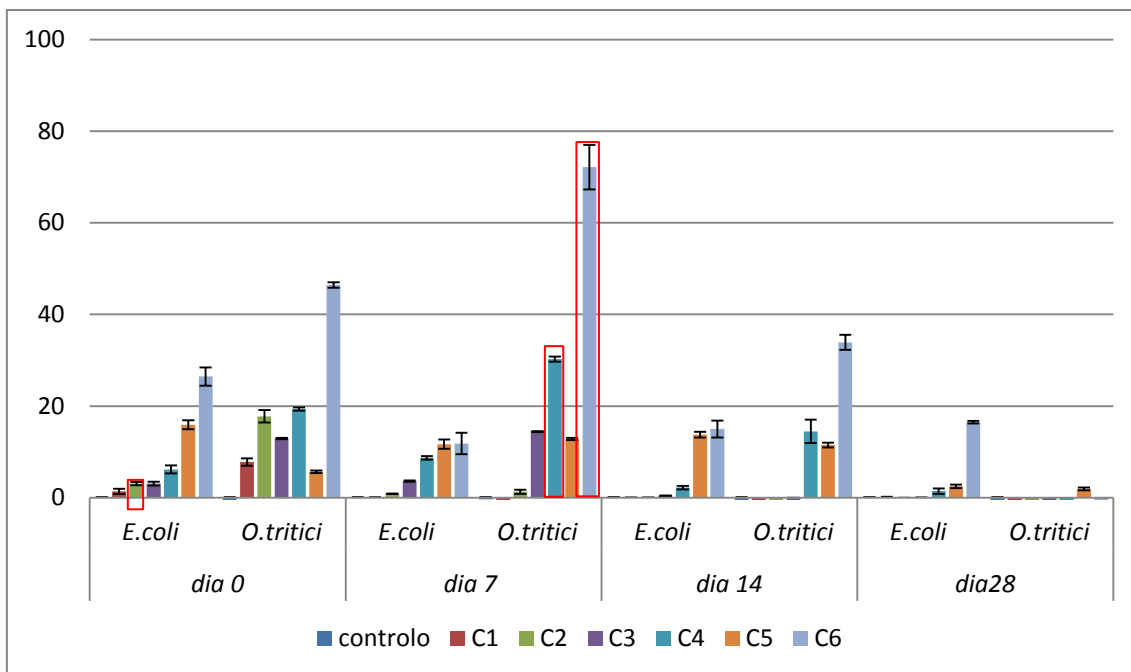
	mg/Kg	mg/300g	mg/g	mg/mL	µM
<b>C0</b>	0	0	0	0	0
<b>C1</b>	10	3	0,01	0,001	19,23
<b>C2</b>	20	6	0,02	0,002	38,46
<b>C3</b>	40	12	0,04	0,004	79,92
<b>C4</b>	60	18	0,06	0,006	115,39
<b>C5</b>	80	24	0,08	0,008	153,85
<b>C6</b>	120	36	0,12	0,012	230,77

De forma a comprovar os resultados obtidos com os biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*, as mesmas amostras foram analisadas pelo método da difenilcarbazida (descrito em 1.6.3). Ao longo dos 28 dias, através de ambos os métodos aplicados, observou-se uma diminuição do cromato presente quer no solo natural quer no solo OCDE. (Figura 27-30).

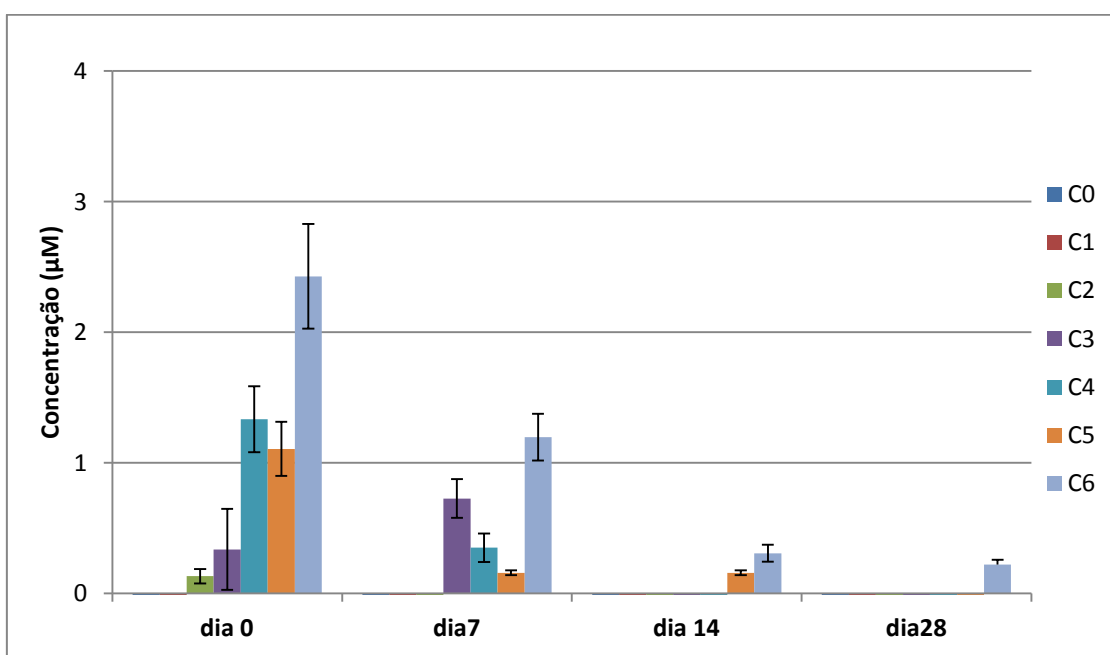
Para o solo natural, através da aplicação dos biossensores, a concentração máxima de cromato detetada no solo natural no tempo zero foi de  $26,44 \pm 1,96 \mu\text{M}$  (pCHRGFP1 *E. coli*) ou  $46,45 \pm 0,59 \mu\text{M}$  (pCHRGFP2 *O. tritici*) e ao fim de 28 dias foi de  $32,93 \pm 0,58 \mu\text{M}$  (pCHRGFP1 *E. coli*) ou  $0 \pm 0,73 \mu\text{M}$  (pCHRGFP2 *O. tritici*). Enquanto pelo método da difenilcarbazida a concentração máxima de cromato detetada ao tempo zero foi de  $2,43 \pm 0,40 \mu\text{M}$  e ao fim de 28 dias foi de  $0,22 \pm 0,04 \mu\text{M}$ . Em relação ao solo OCDE, através da aplicação dos biossensores, a concentração de cromato quantificada no início variou entre  $15,73 \pm 0,07 \mu\text{M}$  (pCHRGFP1 *E. coli*) e  $21,72 \pm 0,84 \mu\text{M}$  (pCHRGFP2 *O. tritici*) até ao desaparecimento total ao fim de sete dias. Pelo método colorimétrico da difenilcarbazida não foi possível detectar o cromato presente no solo.

De realçar, também que, no solo natural para as duas concentrações de cromato mais elevadas (80 e 120 mg/Kg), o desaparecimento do Cr (VI) foi mais lento. Por exemplo, ao fim de catorze dias, a concentração de cromato detectada para as concentrações mais baixas de contaminação (0-60 mg/Kg) foi praticamente nula, enquanto para as concentrações mais elevadas, ainda foi possível detectar entre  $13,75 \pm 0,6422$  e  $14,9 \pm 1,873 \mu\text{M}$  (com o pCHRGFP1 *E. coli*) ou entre  $11,49 \pm 0,498$  e  $33,89 \pm 1,635 \mu\text{M}$ , com o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici*. No solo natural, ao fim de 28 dias, a concentração de cromato detetada pelo biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* foi praticamente nula para todas as concentrações, com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* ainda foi possível detectar o cromato presente no solo contaminado com concentrações mais elevadas. Isto demonstra a maior sensibilidade do último biossensor.

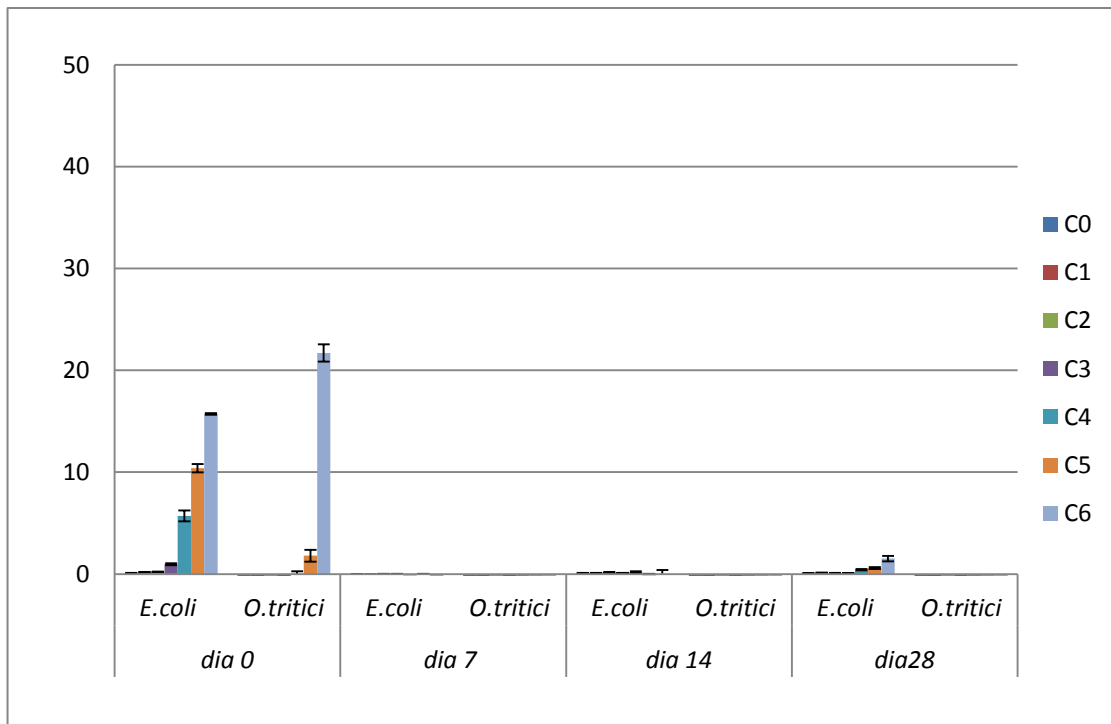
Comparando os dois métodos usados para quantificar o cromato presente nos solos, verifica-se que para a mesma quantidade de cromato introduzido no solo obtiveram-se concentrações de cromato diferentes. Para as amostras de solo natural contaminadas com concentração mais elevada de cromato (120 mg/Kg), no tempo zero através da aplicação dos biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici* foi possível detetar entre  $26,4 \pm 3,9 \mu\text{M}$  e  $46,4 \pm 0,59 \mu\text{M}$ , respetivamente, enquanto que pelo método colorimétrico da difenilcarbazida apenas foi possível detetar apenas  $2,43 \pm 0,4 \mu\text{M}$ .



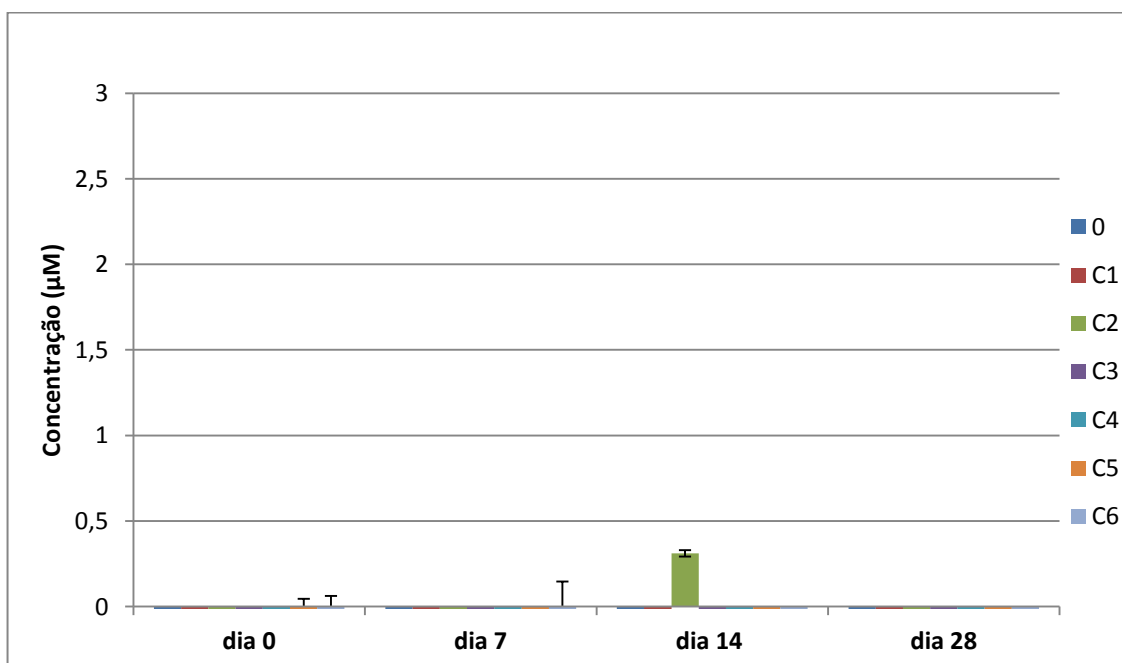
**Figura 27-** Quantificação do cromato no solo natural, ao longo de 28 dias, com os biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*. (As concentrações assinaladas com rectângulo vermelho, ultrapassaram o limite de linearidade da respectiva curva de calibração).



**Figura 28-** Quantificação do cromato no solo natural, ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida.

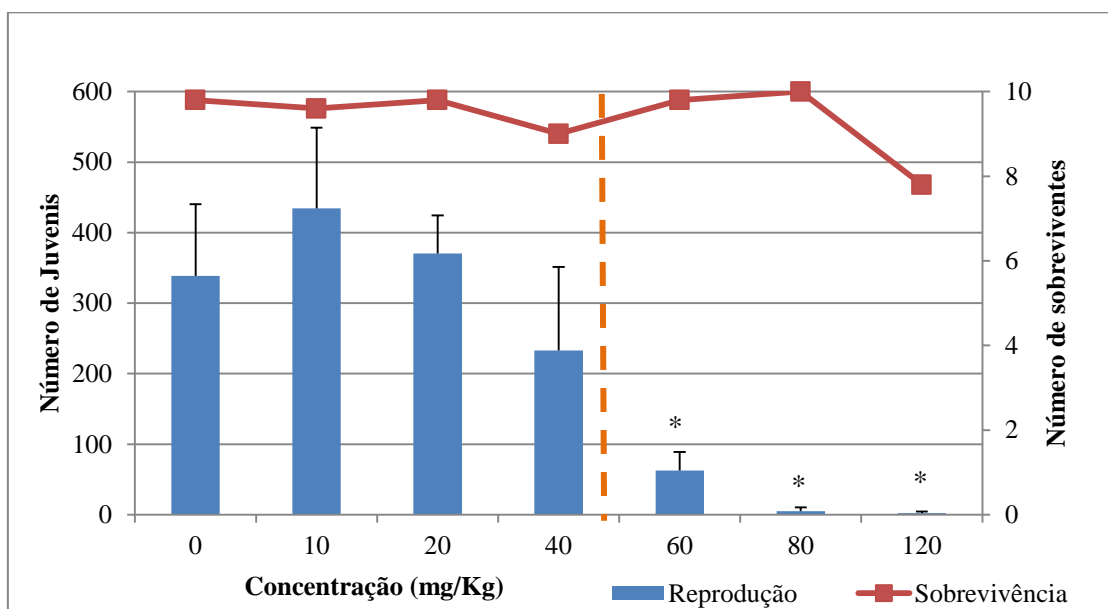


**Figura 29-** Quantificação do cromato no solo OCDE, ao longo de 28 dias, com os biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*.

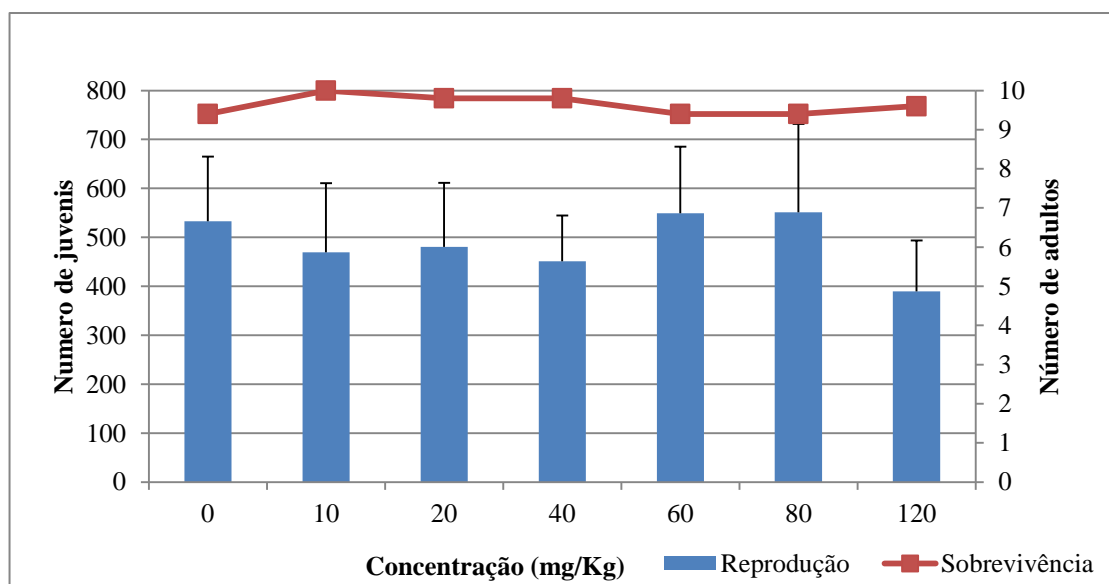


**Figura 30-** Quantificação do cromato no solo OCDE, ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida.

Avaliou-se a ecotoxicidade dos solos contaminados através da utilização de colêmbolos (*Folsomia candida*) como bioindicadores da toxicidade, segundo o método descrito por Natal-Luz e colaboradores (2011). Com o objetivo de relacionar a ecotoxicidade com a concentração de cromato e ao mesmo tempo avaliar se a toxicidade sobre os biossensores interferia na determinação do cromato presente nos solos pelos biossensores, todo o procedimento experimental utilizado foi igual ao do ensaio anterior, com o passo suplementar da adição de um número determinado de colêmbolos a cada amostra, logo após a sua contaminação. Para o teste de reprodução dos colêmbolos foram preparadas três réplicas de cada concentração e adicionados dez colêmbolos com 10-12 dias de vida. Ao fim de 28 dias contou-se o número de colêmbolos sobreviventes e juvenis. As Figuras 31 e 32 mostram os resultados obtidos no teste de reprodução dos colêmbolos para o solo natural e para o solo OCDE, respetivamente. No solo natural verificou-se que a partir da concentração de 10 mg/Kg, o número de colêmbolos total foi diminuindo com o aumento da concentração de cromato, tal como o número de adultos sobreviventes. No solo OCDE (Figura 32) quer o número de sobreviventes quer o número de juvenis foram semelhantes para as diferentes concentrações, apenas a ultima concentração (120mg/Kg) apresentou um maior decréscimo no número de juvenis. Com base na definição de EC50 concluiu-se que o seu valor para o solo natural foi de 43,9 mg/Kg, enquanto no solo OCDE não foi possível determinar o seu valor dado a semelhança dos resultados obtidos, e por estes serem muito baixos.



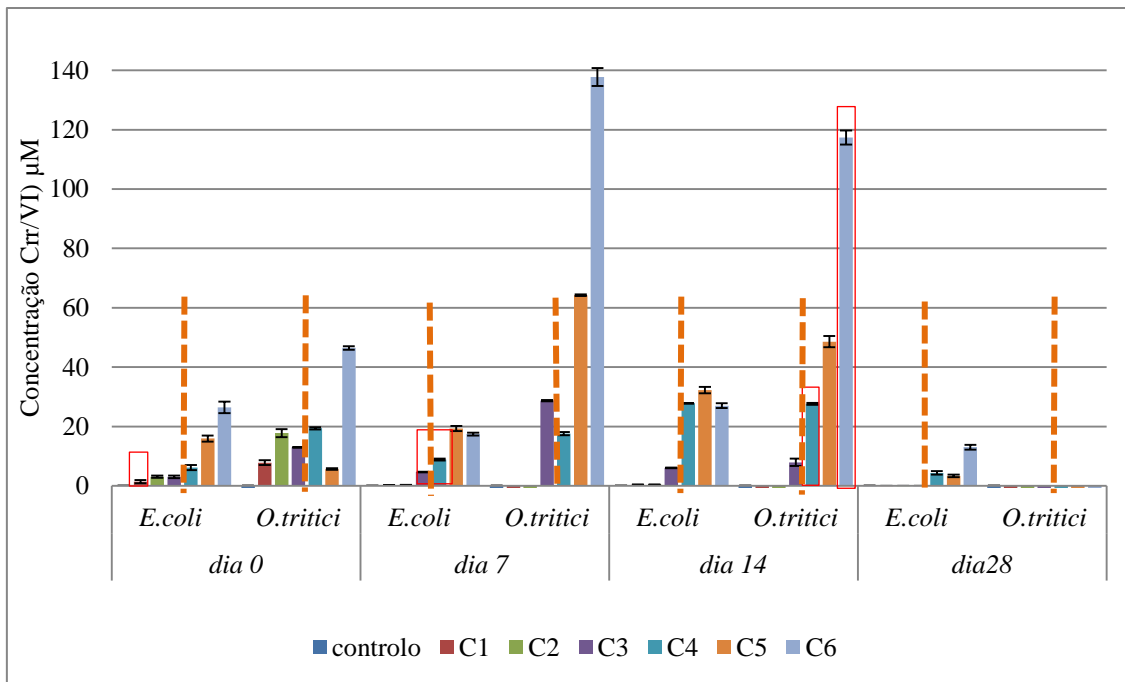
**Figura 31-** Resultado do teste da reprodução dos colêmbolos para o solo natural. A linha tracejada laranja representa a EC50 obtida (43,9 mg/Kg).



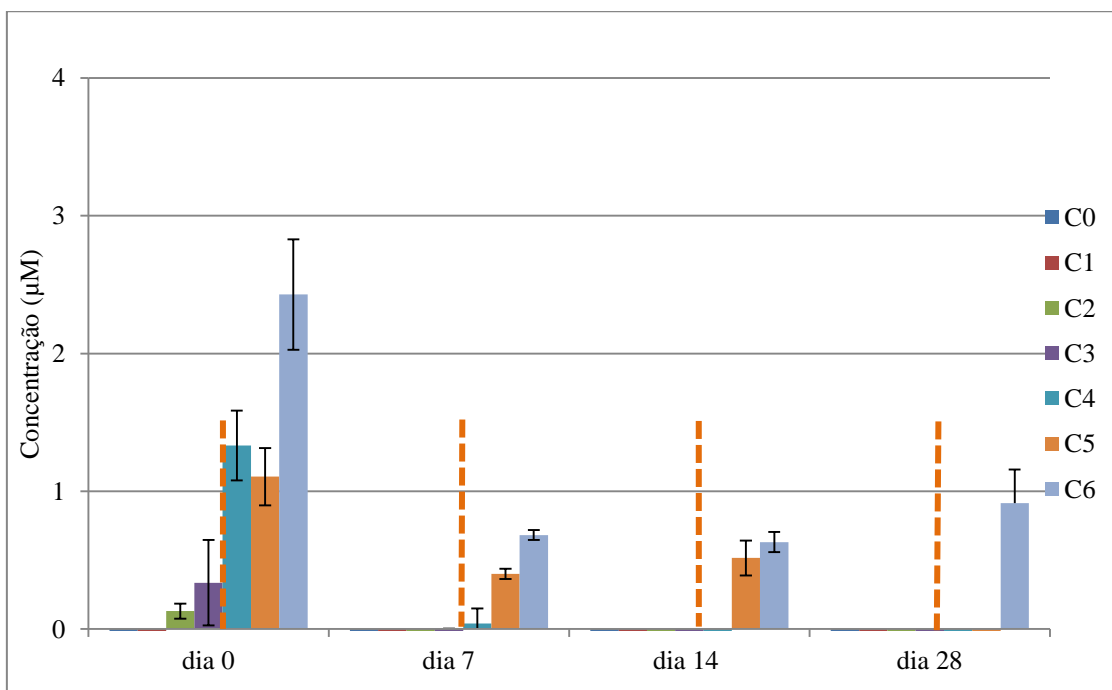
**Figura 32** -Resultado dos no teste da reprodução dos colêmbolos para o solo OCDE.

Para avaliar a possível interferência da toxicidade na quantificação de cromato pelos biossensores, foram ainda preparadas três réplicas adicionais de cada solo para cada concentração que foram analisadas ao fim de 7, 14 ou 28 dias pelos biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici* e pelo método da difenilcarbazida. Nas Figuras 33 e 34 estão resumidos os resultados obtidos para o solo natural, através dos biossensores e pelo método de difenilcarbazida, respetivamente. Tal como anteriormente (capítulo 4.6) os solos contaminados com concentrações mais baixas de cromato apresentaram uma diminuição mais rápida da concentração de cromato presente no solo. No solo OCDE (Figuras 35 e 36), observou-se o desaparecimento praticamente total ao fim de sete dias do cromato biodisponível presente no solo. Como os ensaios de contaminação e deteção de cromato presente nos solos, na ausência e na presença de colêmbolos foram feitos ao mesmo tempo, foi possível comparar os resultados e perceber a influência dos colêmbolos no solo ao longo dos 28 dias. Para a concentração anterior à EC50 no solo natural sem colêmbolos, ao fim de sete dias foi detectado  $3,62 \pm 0,15$   $\mu\text{M}$  pelo biossensor pCHRGFP1 *E. coli* e  $14,48 \pm 0,11$   $\mu\text{M}$  pelo biossensor pCHRGFP2 *O. tritici*, enquanto que no solo natural com colêmbolos, ao fim do mesmo tempo foi detectado  $4,62 \pm 0,08$   $\mu\text{M}$  pelo biossensor pCHRGFP1 *E. coli* e  $28,65 \pm 0,22$   $\mu\text{M}$  pelo biossensor pCHRGFP2 *O. tritici*.

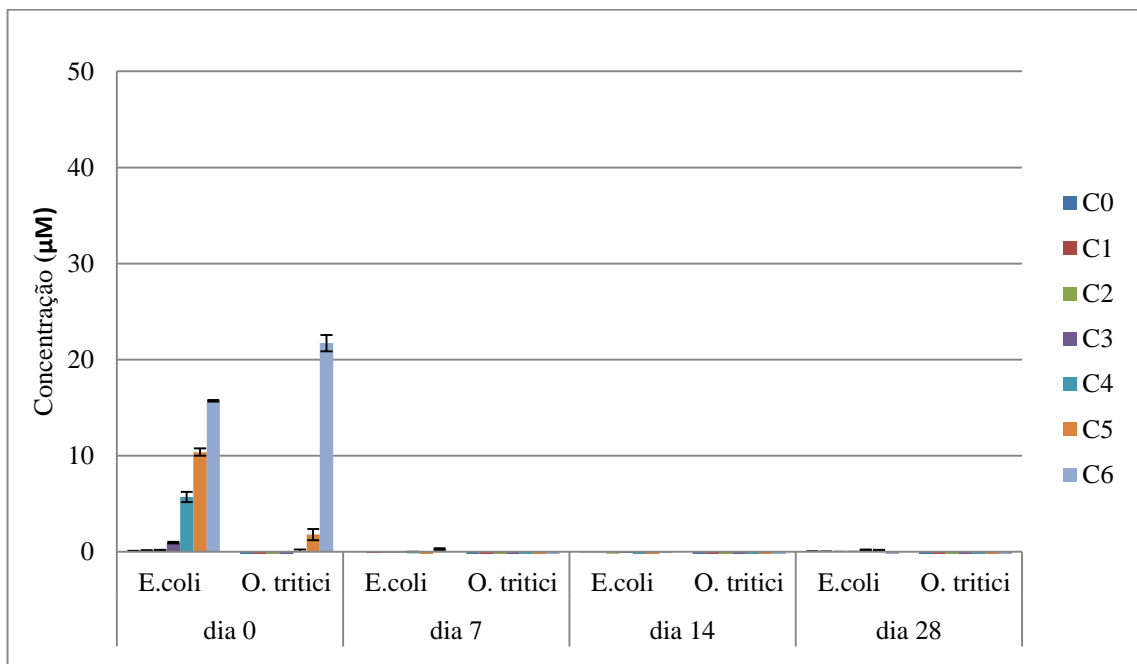




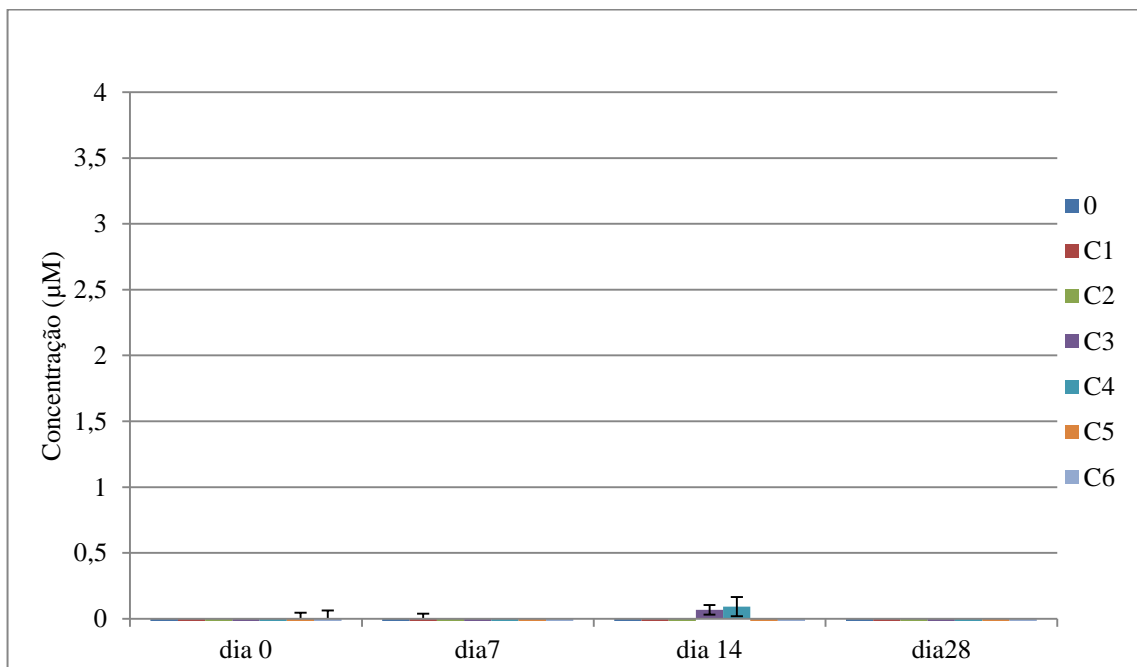
**Figura 33** Quantificação do cromato no solo natural com colêmbolos, ao longo de 28 dias, através de biossensores. (As concentrações assinaladas com rectângulo vermelho, ultrapassaram o limite de linearidade da respectiva curva de calibração). A linha tracejada laranja representa a EC50 obtida (43,9 mg/Kg).



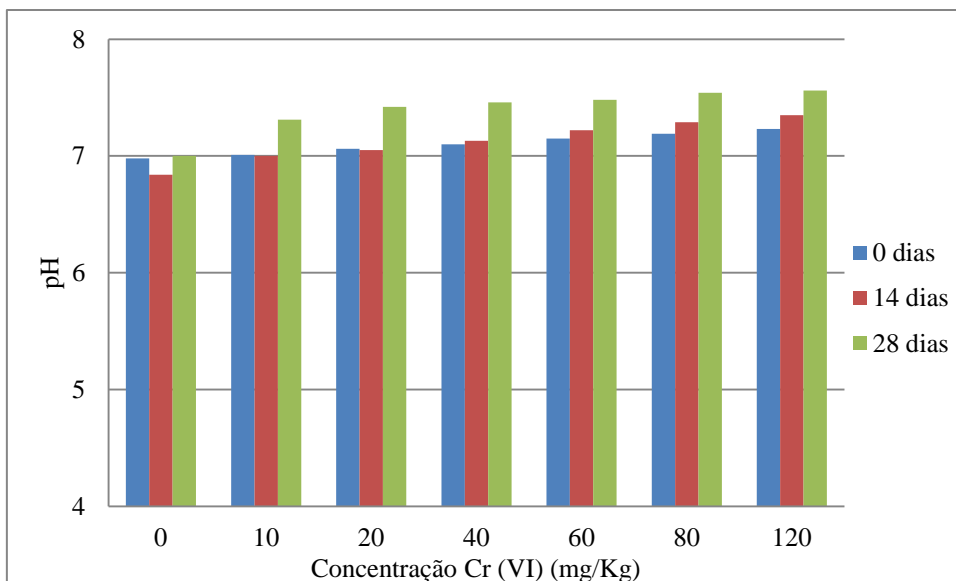
**Figura 34-** Quantificação do cromato no solo natural com colêmbolos, ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida. A linha tracejada laranja representa a EC50 obtida (43,9 mg/Kg).



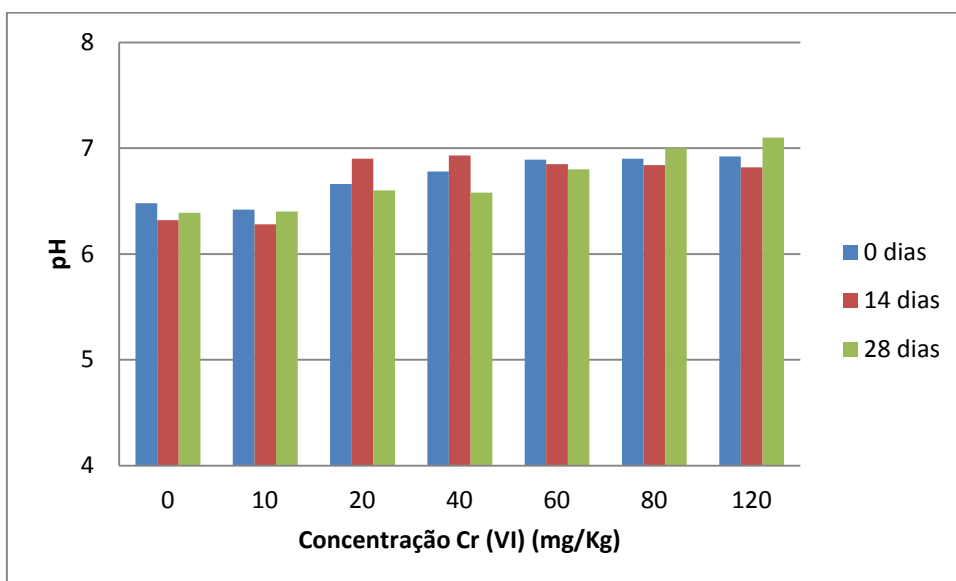
**Figura 35** Quantificação do cromato no solo OCDE com colêmbolos, ao longo de 28 dias, com os biossensores.



**Figura 36-** Quantificação do cromato no solo OCDE com colêmbolos ao longo de 28 dias, pelo método de difenilcarbazida.



**Figura 37-** Valores de pH do solo natural ao fim de 0 dias (azul), 14 dias (vermelho) e 28 dias (verde).



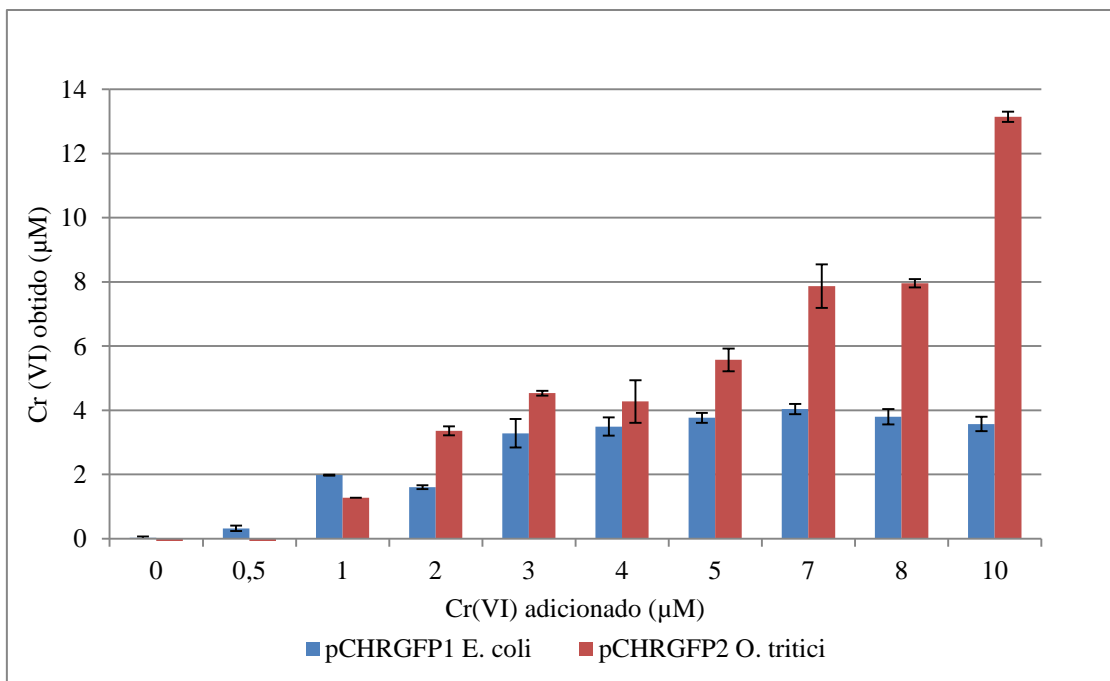
**Figura 38** Valores de pH do solo OCDE ao fim de 0 dias (azul), 14 dias (vermelho) e 28 dias (verde).

### 4.7. Avaliação da especificidade e sensibilidade dos biossensores

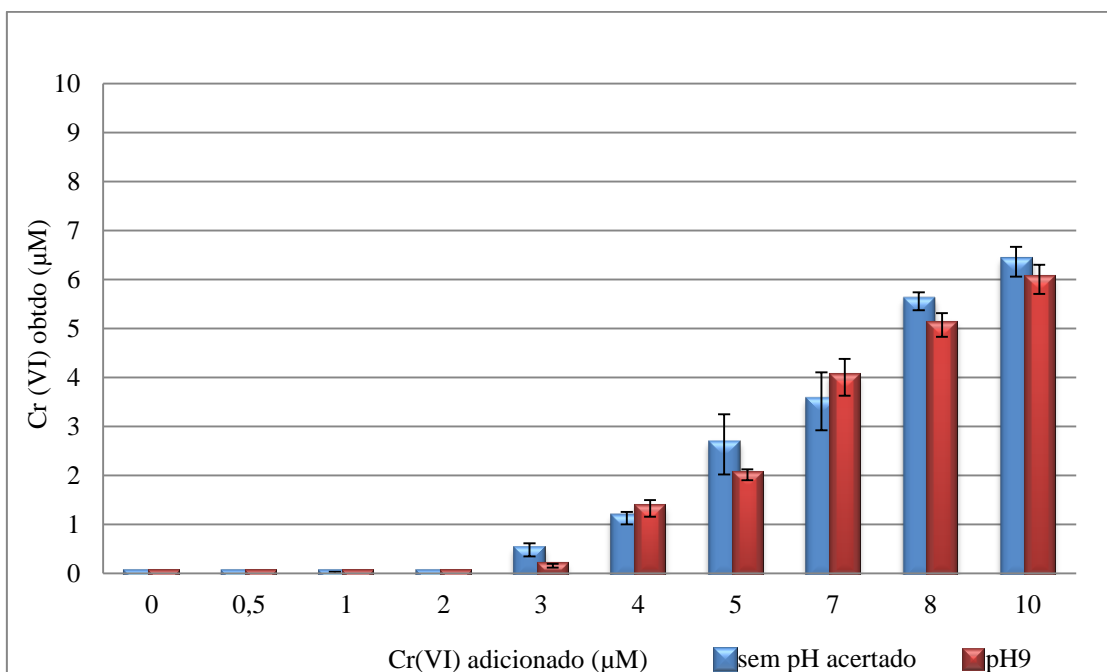
Para confirmar a especificidade e sensibilidade dos dois biossensores, em estudo, avaliou-se a sua capacidade em detectar o cromato presente em solução aquosa. Para isso, foram preparadas soluções aquosas de diferentes concentrações e analisadas pelos biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*, pelo método colorimétrico da difenilcarbazida e pelo método 7199. A Figura 39 apresenta as concentrações de cromato que os biossensores conseguiram determinar em soluções padrão com diferentes concentrações. Tal como se verificou anteriormente, para concentrações mais baixas, o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* apresentou maior sensibilidade que o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici*, bem como maior toxicidade para as concentrações mais elevadas. Assim, para concentrações até 2µM de Cr (VI) os valores obtidos pelo pCHRGFP1 *E. coli* foram mais próximos dos resultados esperados, enquanto para concentrações entre 3-10 µM os resultados obtidos pelo pCHRGFP2 *O. tritici* foram mais próximos dos resultados esperados.

A Figura 40 mostra os resultados obtidos pelo método da difenilcarbazida, em que se constatou que apenas para concentrações a partir de 3µM foi possível detectar o Cr (VI) presente em solução. Para além disso, dos três métodos usados, este foi aquele que apresentou uma maior diferença entre a concentração de cromato adicionada e a concentração de cromato obtida. Estes resultados confirmam a diferença de valores obtida na quantificação do cromato presente solo pelos dois métodos. Por fim, a Figura 41 mostra os resultados obtidos pelo método 7199 (realizado pelo laboratório LQA-Ambiente, Porto) onde se observa uma grande semelhança entre a concentração de cromato adicionada e a concentração de cromato obtida.

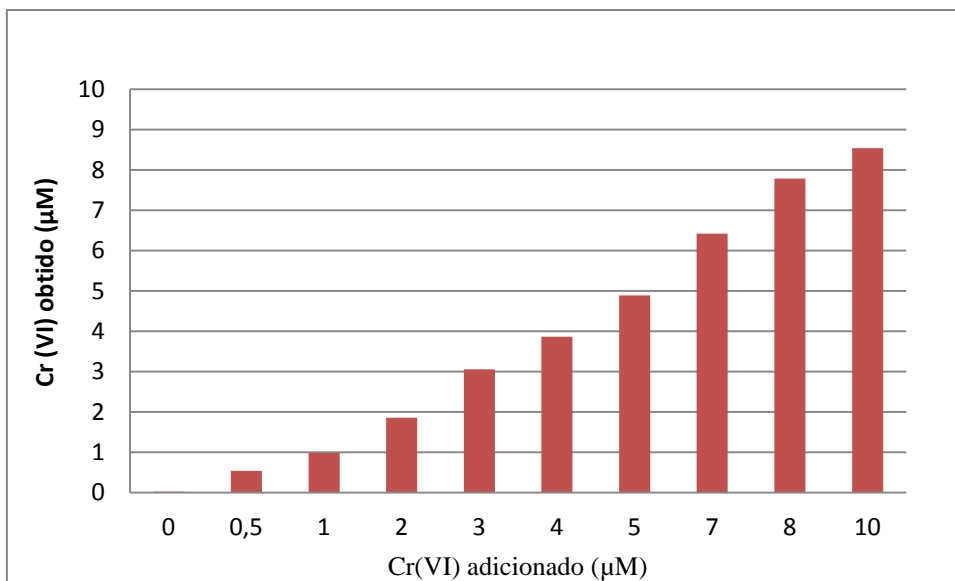
Uma vez que a análise pelo método 7199 implica a modificação do pH das amostras para pH 9-9,5 (USEPA,1996), e como o pH é um parâmetro determinante para a presença de crómio hexavalente no solo, também se analisaram com os biossensores as soluções a pH 9. Através dos biossensores não foi possível obter resultados, uma vez que as bactérias a partir das quais se obteve as construções bacterianas são neutrófilas e, para além disso, a solução indicada no método e usada para acertar o pH (descrita nos materiais e métodos – 3.3.6) era tóxica para as bactérias. Pelo método difenilcarbazida (Figura 40) a concentração de cromato detectada foi, na maior parte dos casos, menor nas soluções com pH acertado.



**Figura 39-** Quantificação de cromato presente em solução aquosa, pH 9 por meio dos biossensores desenvolvidos.



**Figura 40-** Quantificação do cromato presente em solução aquosa, pH 9, pelo método de difenilcarbazida.



**Figura 41-** Quantificação de cromato em solução aquosa, pH 9 por cromatografia iônica (método EPA 7199).

## **5. Discussão**





Existe um aumento da quantidade de resíduos libertados para o ecossistema como resultado do aumento da produção industrial. De entre os diferentes poluentes que se podem referir destacam-se os metais pesados. Estes, ao contrário dos compostos orgânicos, não são degradáveis e tendem a acumular-se nos organismos vivos, tornando-se tóxicos e carcinogénicos. A libertação de metais pesados para o ambiente, por fontes naturais ou por fontes antropogénicas leva à sua acumulação nos solos e sedimentos, criando ambientes poluídos e representam um risco potencial para os organismos do solo.

O crómio é um dos metais pesados mais presente nos resíduos industriais e com elevado nível de toxicidade, quer ambiental quer para a saúde humana. De forma a prevenir os graves problemas causados pelo Cr (VI), foram estabelecidos limites máximos de resíduos e têm sido desenvolvidos diferentes processos de biorremediação. A fim de avaliar a eficácia dos processos de biorremediação e de identificar os locais contaminados com cromato, é importante conseguir detectar a presença de cromato mesmo em baixas concentrações. Este trabalho teve como objetivo testar a especificidade e sensibilidade na deteção de cromato de dois biossensores desenhados no nosso laboratório e avaliar a sua capacidade de detectar de o cromato em solução, quando aplicado em solos, comparando as quantidades obtidas com a avaliação da ecotoxicidade dos dois tipos de solo contaminados com diferentes concentrações de cromato.

Numa primeira fase, procedeu-se à otimização das condições de crescimento das construções bacterianas. Obtiveram-se melhores resultados quando se usou LB para o crescimento e o meio MMT suplementado com 0,3% de glucose para a manutenção das construções bacterianas durante o período de incubação para deteção do cromato. Verificou-se ainda que a adição de glucose era importante para manter a viabilidade celular. Posteriormente, optimizou-se o processo de quantificação do cromato. Os resultados do processo de optimização mostraram que era mais vantajoso realizar a leitura das fluorescências em microplaca *multi-well* 96 poços transparente, medindo a fluorescência no intervalo de comprimentos de onda 475-510 nm. De entre os diferentes comprimentos de onda de excitação testados, os resultados da fluorescência obtidos a 475 nm apresentaram uma maior incremento dos valores de fluorescência entre as diferentes concentrações, nomeadamente entre 0 e 1µM (intervalo de linearidade da pCHRGFP1 *E. coli*) (Figura 4), ao fim de três e cinco horas de incubação.

Através das curvas de calibração traçadas para cada uma das construções bacterianas, verificou-se que o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* apresenta maior sensibilidade para o cromato em comparação com o pCHRGFP2 *O. tritici*, e é mais afetado pela toxicidade. As espécies bacterianas usadas (*E. coli* e *O. tritici*) foram isoladas de diferentes ambientes naturais, e têm fisiologia e homeostasia ao metal diferentes. Uma vez que a fisiologia microbiana e a homeostasia a metais pesados são os fatores mais importantes que determinam a toxicidade dos metais pesados para células microbianas (Koyhe e Haferurg, 2007), este facto pode justificar as

diferenças entre os dois biossensores. Estas diferenças estão de acordo com os resultados apresentados por Branco et al (2013), em que foram usadas as mesmas construções bacterianas na detecção de cromato em águas residuais.

A fim de aplicar os biossensores na detecção de cromato dos solos, começou-se por otimizar o processo de extração do Cr (VI) do solo. Diferentes protocolos publicados de extração do cromato dos solos apresentam diferentes condições de extração (como a solução de extração utilizada, o tempo e a temperatura de extração). Neste trabalho, com base nos resultados apresentados por Grabarczyk et al. (2006) e Ivask et al. (2004) definiu-se a temperatura de extração de 25°C. Em relação ao tempo de extração foram testados diferentes tempos. Concluiu-se que o tempo de agitação ótimo para extrair o Cr (VI) do solo sem ocorrer a sua redução a Cr (III) era 3 horas. Estes resultados confirmam a metodologia usada por Sethunathan et al. (2005) na extração da fração solúvel de cromato presente nas amostras de solo, em que colocam as amostras em agitação durante duas horas. Testou-se, então a capacidade dos biossensores em detectar o cromato biodisponível no solo natural proveniente da Escola Agrária de Coimbra (composto por 62,4% de areia, 21,2% de *slite*, e 16,4% argila) e no solo OCDE (composto por 70% de areia, 10% de turfa (seca ao ar e crivada a 2mm) e 20% argila), depois destes terem sido contaminados com concentrações conhecidas de cromato. A variação da concentração de cromato biodisponível no solo foi determinada ao longo de 28 dias. Verificou-se que, em ambos os solos, e de uma forma mais drástica no solo OCDE, ocorreu uma diminuição do cromato presente no solo. Este processo natural decorre da capacidade da matéria orgânica, do ferro e do manganês em reduzir o Cr (VI) em Cr (III) como representado na Figura 7. Para além disso, o facto do pH do solo OCDE ser mais ácido que o solo natural (Figura 37 e 38), também favoreceu o desaparecimento de cromato nos solos (Fozia et al., 2008). A diferença entre os dois solos pode ser devido ao facto da percentagem de matéria orgânica, de argila e de areia presente no solo OCDE serem maiores, o que consequentemente leva a uma maior e mais rápida redução do cromato presente no solo. Ou ainda, porque a comunidade microbiana presente nos solos apresenta diferenças na composição, que consequentemente levarão a diferenças na sensibilidade aos metais pesados (Giller et al, 1998). Uma vez que as condições foram as mesmas para os dois solos, com estes resultados conclui-se que o solo natural, por promover uma menor redução do cromato, apresenta um nível de toxicidade mais elevado para concentrações mais baixas que o solo OCDE. No solo natural, constatou-se que o desaparecimento do cromato não ocorria de igual forma para todas as concentrações de cromato inoculadas. Isto pode dever-se ao facto de elevadas concentrações de Cr (VI) provocarem uma diminuição da comunidade microbiana que, por consequência, leva ao desaparecimento do serviço que os microrganismos fazem- redução de Cr (VI) a Cr (III), ou as concentrações usadas excedem a capacidade de redução dos microrganismos presentes neste tipo de solo (Viti et al,

2006). No solo OCDE, o desaparecimento do cromato ocorreu de forma mais uniforme e mais rápida para todas as concentrações, o que nos leva concluir que este solo apresenta maior capacidade de redução do cromato e, como tal promove uma menor toxicidade ao cromato. A confirmação dos resultados obtidos através dos biossensores foi feita por um método colorimétrico normalmente usado - método colorimétrico da difenilcarbazida. Ao comparar os resultados de ambos os métodos, concluiu-se que os biossensores em estudo apresentam maior sensibilidade que o método colorimétrico da difenilcarbazida na detecção do cromato presente nos solos. Isto pode ser explicado pelas limitações do método da difenilcarbazida em detectar cromato em matrizes complexas, como por exemplo a interferência de outros metais presentes nos solos e co-extraídos com o cromato (como Mo (VI), Cu (II), Fe (III), Hg (II), e V (V)) que reagem com a difenilcarbazida, levando à formação de complexos que absorvem no mesmo comprimento de onda do complexo DPC-Cr (VI). Outro fator também importante é o facto de ser necessário colocar em condições ácidas (pH 1,0±0,3) para conseguir a formação do complexo DPC-Cr (VI) que na presença de Fe (II), sulfureto, sulfito, e alguns compostos orgânicos pode favorecer a redução de Cr (VI) a Cr (III), levando, conseqüentemente, à perda de Cr (VI) durante a análise e a subestimação da concentração de cromato presente na amostra (Pettine e Capri, 2005; Unceta et al., 2010). Conclui-se, perante os resultados referidos, que os biossensores em estudo são uma mais-valia na detecção de cromato nos solos, dado que apresentam maior sensibilidade na detecção de cromato que o método da difenilcarbazida.

Em simultâneo, avaliou-se a ecotoxicidade dos dois solos contaminados com diferentes concentrações de cromato através da determinação da taxa de morte e de reprodução de colêmbolos *Folsomia candida* reconhecidos como ferramenta para avaliação da toxicidade ambiental. Para além disso estudou-se a possibilidade da toxicidade do Cr (VI) interferir na determinação do cromato presente nos solos através dos biossensores. À semelhança dos resultados obtidos anteriormente, o teste de reprodução dos colêmbolos mostrou que a adição da mesma quantidade de cromato provoca uma maior toxicidade no solo natural que no solo OCDE. O solo natural, apresentou uma EC<sub>50</sub> de 43,9 mg/Kg, o que significa que na presença de 43,9 mg de Cr (VI) / kg de solo natural a capacidade de reprodução dos colêmbolos diminuiu 50%. O solo OCDE apresentou níveis de reprodução semelhantes para as diferentes concentrações de contaminação não sendo, por isso, possível a determinação da EC<sub>50</sub>. Até ao momento, não foi determinado por meio do teste de reprodução da *Folsomia candida* o valor da EC<sub>50</sub> do Cr(VI) no solo OCDE, apenas existe para publicado o valor da EC<sub>50</sub> para o Cr(III) (Lock e Janssen, 2002). No presente trabalho, provavelmente não foi possível determinar o EC<sub>50</sub> por as concentrações de Cr(VI) medidas nos diferentes tempos ter sido sempre muito baixa. Ao marcar nas Figuras 33 e 34 a EC<sub>50</sub> foi possível visualizar que as concentrações em que se observou um menor desaparecimento de cromato do solo foram as três concentrações superiores

à EC<sub>50</sub>, mostrando que a toxicidade do solo é influenciada pela capacidade do solo em reduzir/quelatar o Cr (VI). Tendo em conta que, o processo de contaminação, as condições de acondicionamento das amostras ao longo do ensaio e o processo de extração e quantificação do cromato para os dois solos foi igual, a comparação dos resultados obtidos para o solo natural (Figura 27 e 28) e para o solo OCDE (Figura 29 e 30) na presença de colêmbolos, mostrou que no solo OCDE o cromato biodisponível desapareceu imediatamente, enquanto que no solo natural o desaparecimento do cromato foi gradual ao longo do tempo, como demonstrado pelos valores obtidos pelos biossensores.

Ao fim de 28 dias a concentração de cromato detectada pelo método colorimétrico da difenilcarbazida e pelos biossensores, quer na ausência quer na presença de colêmbolos, foi semelhante. Todavia, o desaparecimento do cromato biodisponível foi mais lento na presença de colêmbolos, sobretudo para concentrações de cromato mais elevadas. Isto pode ser explicado pelo facto de os colêmbolos se alimentarem de bactérias, limitando a ação das bactérias no processo de redução de cromato a Cr (III). Em relação ao solo OCDE, observaram-se resultados semelhantes na ausência e na presença de colêmbolos, quer avaliado através dos biossensores quer através do método de difenilcarbazida.

De forma a comprovar a especificidade dos biossensores em detectar Cr (VI) e tendo em conta as limitações do método colorimétrico da difenilcarbazida (anteriormente referidas), foi efetuada a análise simultânea de dez soluções aquosas com diferentes concentrações conhecidas de cromato (0-10µM) por três métodos diferentes: biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici*, método colorimétrico da difenilcarbazida e o método EPA 1799 (descrito resumidamente em 2.5.6). Este último método apresenta o limite mínimo de quantificação de 0,4 µg/L, ou seja, 0,077µM de Cr (VI) e apresenta como vantagem (em relação ao método da difenilcarbazida) o facto de conseguir minimizar o efeito dos compostos interferentes presentes no solo. Dos três métodos testados, o método colorimétrico foi aquele que apresentou uma menor semelhança entre as concentrações esperadas e as concentrações obtidas. Em relação aos biossensores em estudo, foi possível mostrar, mais uma vez, a sua elevada especificidade e sensibilidade na determinação do cromato. Uma vez que os resultados obtidos a partir do método químico EPA 1799, dispendioso e demorado, são similares aos obtidos com os biossensores pCHRGFP1 *E. coli* e pCHRGFP2 *O. tritici* podemos concluir que para determinações de cromato em solo e avaliações da toxicidade de solos contaminados com crómio, podem ser utilizados os biossensores aqui testados. Para além disso, sabendo que limite máximo de crómio estabelecido pela Diretiva 86/278/CEE da Comunidade Europeia (1986) é de 1000 mg de crómio/Kg solo para solos agrícolas e tendo em conta as concentrações usadas neste trabalho (tabela 4) confirma-se a aplicabilidade do método biológico apresentado.

## **6. Conclusão**



A partir dos resultados apresentados, podem-se tirar algumas conclusões:

- O biossensor pCHRGFP1 *E. coli* para concentrações de cromato crescentes entre 0-2  $\mu\text{M}$  apresenta um aumento de fluorescência linear quando lida após 5 horas de incubação.
- O biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* para concentrações de cromato crescentes entre 0-10  $\mu\text{M}$  apresenta um aumento de fluorescência linear quando lida após 5 horas de incubação.
- O método biológico desenvolvido apresenta maior sensibilidade que o método colorimétrico da difenilcarbazida na detecção do Cr (VI) em soluções aquosas e no solo.
- O método biológico desenvolvido apresenta sensibilidade idêntica ao método EPA 7199 (cromatografia iónica) na detecção do Cr (VI) em soluções aquosas padrão.
- Ao longo do tempo (pelo menos 28 dias) o Cr (VI) presente nos solos tende a desaparecer. A rapidez com que este desaparecimento acontece depende da composição dos solos.
- Para concentrações de cromato entre 0-120 mg/Kg, o solo natural apresentou uma inibição da capacidade reprodutiva  $EC_{50}$  dos colêmbolos indicadores de toxicidade ambiental de cromato de 43,9 mg /Kg solo. No solo OCDE não foi possível determinar o seu valor.
- No solo natural, quando inoculado com cromato em concentrações inferiores à  $EC_{50}$ , o desaparecimento do cromato é mais rápido que para concentrações superiores a este valor.
- Com o biossensor pCHRGFP1 *E. coli* é possível quantificar o cromato biodisponível, presente nos solos, em concentrações entre 0-2  $\mu\text{M}$  enquanto que com o biossensor pCHRGFP2 *O. tritici* é possível detectar cromato em concentrações entre 0-10  $\mu\text{M}$ .
- Por comparação com outros métodos químicos normalmente usados na quantificação do cromato presente nos solos, o método biológico apresentado é uma alternativa mais económica e igualmente fiável.
- Tendo em conta a diferente toxicidade do Cr(III) e do Cr(VI) este método biológico apresenta a mais valia para conseguir distinguir os diferentes estados de oxidação do crómio presente nos solos.





## **7. Referências Bibliográficas**



- Andrade, D. A., Augusto, F., Cristina, I., & Fontes, S., 2010 – Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, *ECLÉTICA Química*, Vol. 35, no.3.
- Banks, M. K., Schwab, A. P., & Henderson, C. (2006). Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants, *62*, 255-264.
- Bradl, H. B. (2004, September 1). Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal of colloid and interface science*.
- Branco, R., Chung, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P., & Zhitkovich, A. (2008). The chromate-inducible chrBACF operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide. *Journal of bacteriology*, *190*(21), 6996-7003.
- Branco, R., Cristóvão, A., & Morais, P. V. (2013). Highly sensitive, highly specific whole-cell bioreporters for the detection of chromate in environmental samples. *PloS one*, *8*(1), e54005.
- Cheung, K. H., & Gu, J.-D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *59*(1), 8-15.
- Cavalcanti G., 2010 – Aplicação de biossensor bioluminescente na detecção do HPA naftaleno em solo contaminado com óleo cru. Po-graduação em tecnologia de processos químicos e Bioquímicos, Universidade federal do rio de janeiro, escola de química.
- Costa, G., 2010 - Aplicação de Biossensor microbiano Bioluminescente na Detecção de Hg (II). Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., & Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining / metallurgical solid waste : A review. *Journal of Hazardous Materials*, *250-251*, 272-291. Elsevier B.V.
- Domene, X., Alcañiz, J. M., & Andrés, P. (2007). Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan *Folsomia candida*. *Applied Soil Ecology*, *35*(3), 461-472.
- Dube, A., Kowalkowski, R. Z. T., Cukrowska, E., & Buszewski, B. (2001). Adsorption and Migration of Heavy Metals in Soil, *10*(1), 1-10.
- Francisco, R., de Abreu, P., Plantz, B. a, Schlegel, V. L., Carvalho, R. a, & Morais, P. V. 2011 - Metal-induced phosphate extracellular nanoparticulate formation in *Ochrobactrum tritici* 5bv11. *Journal of hazardous materials*, *198*, 31-9. Elsevier B.V.

- Fozia A., Muhammad A., Muhammad A., Zafar M., (2008) - Effect of chromium on growth attributes in sunflower (*Helianthus annuus*) *Journal of Environmental Sciences* 20 1475-1480
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407-18. Elsevier Ltd.
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11), 1389-1414.
- Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2001). The Use of Whole-Cell Biosensors to Detect and Quantify Compounds or Conditions Affecting Biological Systems. *Microbial ecology*, 42(4), 483-494.
- Ivask, A., Virta, M., & Kahru, A. (2002). Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc mercury and chromium in the soil, 34, 1439-1447.
- Ivask, A., François, M., Kahru, A., Dubourguier, H.-C., Virta, M., & Douay, F. (2004). Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters. *Chemosphere*, 55(2), 147-56.
- Ivask, A., Rõlova, T., & Kahru, A. (2009). A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC biotechnology*, 9, 41.
- Jansson, J. K. (2003). Marker and reporter genes: illuminating tools for environmental microbiologists. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 310-316.
- Jeyasingh, J., & Philip, L. (2005). Bioremediation of chromium contaminated soil : optimization of operating parameters under laboratory conditions, 118, 113-120.
- Kalidhasan, S., & Rajesh, N. (2009). Simple and selective extraction process for chromium (VI) in industrial wastewater. *Journal of hazardous materials*, 170(2-3), 1079-85.
- Kamaludeen, S. P. B., Megharaj, M., Juhasz, A. L., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2003). Chromium – Microorganism Interactions in Soils : Remediation Implications, 93-164.
- Kotaś, J., & Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 107(3), 263-83.

- Krishna, K. R., & Philip, L. (2005). Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. *Journal of hazardous materials*, 121(1-3), 109-17.
- Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors, 568, 200-210.
- Lewis, B. G. (n.d.). . soil chemistry- Environmental and ecology chemistry vol II
- Liao, V. H.-C., Chien, M.-T., Tseng, Y.-Y., & Ou, K.-L. (2006). Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 142(1), 17-23.
- Liu, P., Huang, Q., & Chen, W. (2012). Construction and application of a zinc-specific biosensor for assessing the immobilization and bioavailability of zinc in different soils. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 164, 66-72. Elsevier Ltd.
- Lock, K., & Janssen, C. R. (2002). Ecotoxicity of chromium (III) to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus*, and *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 51(3), 203-5.
- Magalhães, D. D. P., & Ferrão, S. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquático., 12(3), 355-381.
- Malherbe, J., Isaure, M.-pierre, Fabienne, S., Watson, R. P., Rodriguez-gonzalez, P., Stutzman, P. E., Davis, C. W., et al. (2011). Evaluation of Hexavalent Chromium Extraction Method EPA Method 3060A for Soils Using XANES Spectroscopy, 10492-10500.
- Mello, L. D., & Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, 77, 237-256.
- Michel, C., Ouerd, A., Battaglia-Brunet, F., Guigues, N., Grasa, J.-P., Bruschi, M., & Ignatiadis, I. (2006). Cr(VI) quantification using an amperometric enzyme-based sensor: interference and physical and chemical factors controlling the biosensor response in ground waters. *Biosensors & bioelectronics*, 22(2), 285-90.
- Morais, P. V., Branco, R., & Francisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *Biomaterials: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 24(3), 401-10.
- Moreira C., (2004). Adsorção competitiva de cádmio, cobre, níquel e zinco em solos. Tese de mestrado. Piracicaba- Estado de São Paulo -Brasil.
- Nivens, D. E., McKnight, T. E., Moser, S. a., Osbourn, S. J., Simpson, M. L., & Sayler, G. S. (2004). Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 33-46.

- Natal-da-Luz, T, Ojeda, G., Pratas, J., Van Gestel, C. a M., & Sousa, J. P. (2011). Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1715-20. Elsevier.
- Natal-da-Luz, Tiago, Tidona, S., Jesus, B., Morais, P. V., & Sousa, J. P. (2009). The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. *Journal of Soils and Sediments*, 9(3), 246-260.
- Patra, R. C., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., e Naidu, R. (2010). Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(10), 1857-1863.
- Panichev N., Mandiwana K., Foukaridis, (2003) – Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Cr(VI) in soil after leaching of Cr(VI) species with carbon dioxide. *Anal Chim. Acta* 491:81
- Pettine, M., & Capri, S. (2005a). Removal of humic matter interference in the determination of Cr(VI) in soil extracts by the diphenylcarbazide method. *Analytica Chimica Acta*, 540(2), 239-246.
- Pettine, M., & Capri, S. (2005b). Digestion treatments and risks of Cr(III)–Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments—a review. *Analytica Chimica Acta*, 540(2), 231-238.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 21(3), 321-32.
- Sethunathan, N., Megharaj, M., Smith, L., & Kamaludeen, S. P. B. (2005). Microbial role in the failure of natural attenuation of chromium ( VI ) in long-term tannery waste contaminated soil, *105*, 657-661.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5), 739-53.
- Stiner, L., & Halverson, L. J. (2002). Development and Characterization of a Green Fluorescent Protein-Based Bacterial Biosensor for Bioavailable Toluene and Related Compounds
- Strosnider, H. (2003). Whole-Cell Bacterial Biosensors and the Detection of Bioavailable Arsenic Prepared by Technology Innovation Office, (August).

- Unceta, N., Séby, F., Malherbe, J., & Donard, O. F. X. (2010). Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(3), 1097-111.
- USEPA; Method 3060A: Alkaline digestion of hexavalent chromium, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods – SW-846, U.S. Environment Protection Agency: Washington, DC, 1996.
- Vargas-bernal, R., Rodríguez-miranda, E., & Herrera-pérez, G. (2012). Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides.
- Viti, C., Mini, A., Ranalli, G., Lustrato, G., & Giovannetti, L. (2006). Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms, 34, 125-139.
- Zayed, A. M., & Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, 139-156.
- Zlatev, R., Magnin, J.-P., Ozil, P., & Stoytcheva, M. (2006). Bacterial sensors based on *Acidithiobacillus ferrooxidans* Part II. Cr(VI) determination. *Biosensors & bioelectronics*, 21(8),

### **Web world wide:**

<http://www.psem.ph/downloads/articles/chromite.jpg>

<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>)