



GOVERNO DO ESTADO
DE SÃO PAULO

Faculdade de Tecnologia de Jacareí – FATEC Jacareí

**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

ANA CLAUDIA RANUCCI DURANTE

**ISOLAMENTO, CULTURA E PRESERVAÇÃO DE *CHROMOBACTERIUM
VIOLACEUM* OBTIDA EM NASCENTE NO MUNICÍPIO DE JACAREÍ-SP,
COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS
PESADOS TÓXICOS AO MEIO AMBIENTE.**

Jacareí

Junho / 2024

ANA CLAUDIA RANUCCI DURANTE

ISOLAMENTO, CULTURA E PRESERVAÇÃO DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM* OBTIDA EM NASCENTE NO MUNICÍPIO DE JACAREÍ-SP, COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS TÓXICOS AO MEIO AMBIENTE.

Trabalho de Graduação apresentado como atividade de Conclusão de Curso para obtenção do Grau de Tecnólogo em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, pela Faculdade de Tecnologia de Jacareí – FATEC Jacareí.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Candelária Genari.

**Jacareí
JUNHO – 2024**

DURANTE, Ana Cláudia Ranucci.

Isolamento, cultura e preservação de *Chromobacterium violaceum* obtida em nascente no município de Jacareí-SP, com potencial aplicação na biorremediação de metais pesados tóxicos ao meio ambiente / Ana Cláudia Ranucci Durante. Jacareí / Faculdade de Tecnologia de Jacareí, 2024.

x, 64 f., il.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Candelária Genari

TCC - TG (graduação) – Faculdade de Tecnologia de Jacareí / Curso de Tecnologia em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, 2024.

1. *Chromobacterium violaceum* 2. Biorremediação 3. Metais pesados
4. Efluentes industriais I. DURANTE, Ana Cláudia Ranucci II. Título.

Autora: Ana Claudia Ranucci Durante

Isolamento, cultura e preservação de *Chromobacterium violaceum* obtida em nascente no município de Jacareí-SP, com potencial aplicação na biorremediação de metais pesados tóxicos ao meio ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Candelária Genari.

Trabalho de Graduação apresentado como atividade de Conclusão de Curso para obtenção do Grau de Tecnólogo em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, pela Faculdade de Tecnologia de Jacareí – FATEC Jacareí.

Banca Examinadora:

Membros Titulares

Presidente da Banca:



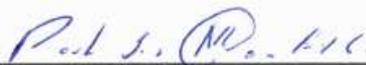
Profa. Dra. Selma Candelária Genari
Professor Orientador – Professor da Faculdade de Tecnologia de Jacareí

Data: 20/06/2024.



Profa. Dra. Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo
Professor da Faculdade de Tecnologia de Jacareí

Data: 20/06/2024.



Prof. Me. Paulo José Maria Filho
Professor da Faculdade de Tecnologia de Jacareí

Data: 20/06/2024.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha avó, pelo amor, carinho e apoio sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de viver uma nova experiência de crescimento pessoal

Agradeço aos meus pais e familiares por todo carinho e apoio que sempre me dedicaram e pelo incentivo aos meus estudos e formação acadêmica.

A minha orientadora Profa. Dra. Selma Candelária Genari pelos ensinamentos, pela dedicação e empenho, na orientação deste trabalho.

A tecnóloga em Meio Ambiente e Recursos Hídricos Renides Eller pela dedicação, empenho e parceria na parte experimental para a realização deste trabalho.

A tecnóloga em Geoprocessamento, Raquel Zózimo Molinez pela parceria e incentivo nos momentos mais desafiadores da graduação e pela contribuição no trabalho escrito.

Aos professores e membros do corpo técnico administrativo da Faculdade de Tecnologia de Jacareí – FATEC Jacareí pelos ensinamentos, pela convivência e pelos bons momentos vividos durante a minha graduação.

Aos colegas de curso pelo apoio constante, pelas diversas contribuições e conhecimento compartilhado por cada um durante a minha trajetória estudantil.

Epígrafe

"No meio da dificuldade encontra-se oportunidade.

"Se você nunca falhou, você nunca tentou algo novo."

Albert Einstein.

RESUMO

DURANTE, A.C.R. Isolamento, cultura e preservação de *Chromobacterium violaceum* obtida em nascente no município de Jacareí-SP, com potencial aplicação na biorremediação de metais pesados tóxicos ao meio ambiente. Trabalho de Graduação apresentado como atividade de Conclusão de Curso para obtenção do Grau de Tecnólogo em Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Faculdade de Tecnologia de Jacareí – FATEC Jacareí.

Nos dias atuais, a poluição por metais pesados tornou-se um sério problema ambiental que coloca em risco os ecossistemas e a saúde humana. Diante dessa problemática, técnicas de remediação, como a biorremediação utilizando organismos vivos têm demonstrado resultados expressivos e eficientes na remoção de metais pesados tóxicos do meio ambiente. Dentre os organismos vivos utilizados na biorremediação, as bactérias, em especial a *Chromobacterium violaceum* encontrada naturalmente em regiões tropicais e subtropicais, apresenta significativo potencial de aplicabilidade na minimização dos efeitos tóxicos de metais pesados no meio ambiente. Por ter a capacidade de retenção de partículas de vários metais, pode ser utilizada com potencial biotecnológico para remoção desses elementos da água. Adicionalmente, *C. violaceum* produz como metabólitos secundários, os pigmentos violaceína e desoxiviolaceína que apresentaram atividades biológicas relevantes na saúde humana, como efeitos antitumorais, antibióticos e antiparasitários. Esse trabalho objetivou isolar uma linhagem de *Chromobacterium violaceum* em água bruta de nascente situada no município de Jacareí (SP), promover a propagação em cultura de meio sólido e obter amostras congeladas para potencial aplicação futura na biorremediação de metais pesados advindos de efluentes industriais. A metodologia experimental constou de coleta, preparo e semeadura em dois meios de cultura sólidos, PCA e Ágar-peptona, para isolamento e manutenção de cepa primária selvagem de *Chromobacterium violaceum*, por repiques contínuos e cultivo a 35 °C por espalhamento. A criopreservação foi realizada em dois meios, M1 e M2, respectivamente constituídos por meio Peptona enriquecido com soro humano e 20% de glicerol, e Peptona com 10% de glicerol, com amostras mantidas a longo prazo sob temperatura de -20 °C, descongelamento após 60 dias e análise da viabilidade. Os resultados obtidos permitiram o isolamento de colônias violetas características de *Chromobacterium violaceum* advindas de amostra de água bruta superficial de nascente no município de Jacareí (SP) por plaqueamento em profundidade, ocorrendo em ambos os meios utilizados sem apresentação de diferenças significativas, porém com crescimento positivo mais favorável nas amostras coletadas no período chuvoso, mostrando-se a cultura e repiques sucessivos, um método prático e viável para a manutenção das principais características bacterianas em curto prazo. Ambos os meios de congelamento utilizados se mostraram eficientes na manutenção da viabilidade de *C. violaceum* pelo período de 60 dias de congelamento, permitindo o crescimento positivo das amostras após o descongelamento, porém com a diminuição significativa da expressão do pigmento violeta visualmente detectada no cultivo em meio sólido a 35 °C pelo tempo de cultura utilizado. Dessa forma, o presente trabalho permitiu o isolamento de linhagem *Chromobacterium violaceum* da nascente no município de Jacareí (SP), o

estabelecimento das condições de cultura e manutenção *in vitro*, assim como, seu congelamento e a manutenção de amostras da linhagem a longo prazo, com posterior descongelamento e viabilidade. Frente a obtenção da linhagem congelada, estudos adicionais sobre a diminuição da expressão visualmente detectável do pigmento violaceína nas amostras cultivadas de *C violaceum* pós-descongelamento, poderão ser mais bem investigadas em estudos futuros.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*; Biorremediação; Metais pesados; Efluentes industriais.

ABSTRACT

DURANTE, A.C.R. Isolation, culture and preservation of *Chromobacterium violaceum* obtained in a spring in the city of Jacarei-SP, with potential application in the bioremediation of heavy metals toxic to the environment. Graduate Work presented as activity Completion of course for obtaining Technologist Degree in Environment and Water Resources - Faculty of Technology Jacarei – FATEC Jacarei.

Nowadays, pollution by heavy metals has become a serious environmental problem that puts ecosystems and human health at risk. Faced of this problem, remediation techniques such as bioremediation using living organisms have shown expressive and efficient results in the removal of toxic heavy metals from the environment. Among the living organisms used in bioremediation, bacteria, especially *Chromobacterium violaceum* found naturally in tropical and subtropical regions, presents significant applicability potential in minimizing the toxic effects of heavy substances on the environment. Because it has the ability to retain particles of various metals, it can be used with biotechnological potential to remove these elements from the water. Additionally, *C. violaceum* produces as secondary metabolites, the pigments violacein and deoxyviolacein that showed relevant biological activities in human health, such as antitumor effects, antibiotics and antiparasitics. This study aimed to isolate a strain of *Chromobacterium violaceum* in raw spring water located in the municipality of Jacareí (SP), promote the propagation in solid medium culture and obtain frozen samples for potential future application in the bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. The experimental methodology consisted of collection, preparation and sowing in two solid culture media, PCA and Agar-peptone, for isolation and maintenance of wild primary strain of *Chromobacterium violaceum*, by continuous peaks and cultivation at 35 °C by spreading. Cryopreservation was performed in two media, M1 and M2, respectively constituted by Peptone enriched with human serum and 20% of glycerol, and Peptone with 10% of glycerol, with samples maintained long-term under temperature of -20 °C, thawing after 60 days and viability analysis. The results obtained allowed the isolation of violet colonies characteristic of *Chromobacterium violaceum* from raw surface water sample of spring in the municipality of Jacareí (SP) by plating in depth, in both media used without presenting significant differences, but with more favorable positive growth in the samples collected in the rainy season, showing the culture and successive peaks, a practical and viable method for maintaining the main bacterial characteristics in the short term. Both freezing media used were efficient in maintaining the viability of *C. violaceum* for the period of 60 days of freezing, allowing positive growth of samples after thawing, but with a significant decrease in the expression of violet pigment visually detected in cultivation in solid medium at 35 °C by the time of culture used. Thus, the present work allowed the isolation of *Chromobacterium violaceum* lineage from the spring in the municipality of Jacareí (SP), the establishment of culture conditions and in vitro maintenance, as well as its freezing and the long-term maintenance of strains with subsequent thawing and viability. Faced of obtaining the frozen strain, additional studies on the decrease of visually detectable

expression of the violacein pigment in the cultured samples of *C violaceum* after thawing may be better investigated in future studies.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*; Biorremediation; Heavy metal; Industrial wastewater.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Contaminação, ciclo e efeitos dos metais pesados no meio ambiente.....21
- Figura 2** – (A) – Mecanismos de captação de metal pesado em bactérias e (B) – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de agregados de cádmio presentes na camada periplasmática e no interior da célula bacteriana de *Serratia marscescens*.....27
- Figura 3** – Imagens da bactéria *Chromobacterium violaceum*. (A) – Micrografia em microscopia eletrônica de varredura; (B) – Crescimento de colônias com coloração violeta típica em meio de cultura sólido.....29
- Figura 4** – Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando chumbo adsorvido pela *C. violaceum* evidenciado pela tonalidade escurecida.....31
- Figura 5** - Estrutura química da violaceína.....31
- Figura 6** – Croqui de localização da nascente na Escola Técnica Estadual – ETEC Cônego José Bento, município de Jacareí-SP.....35
- Figura 7** – Crescimento de colônias bacterianas violáceas individuais a partir de amostra de água bruta superficial em meio de cultura PCA, após 48 h em cultivo a 35 °C. (A) – Amostra coletada em período chuvoso e (B) – Amostra coletada em período seco.....44
- Figura 8** – Primeira passagem (P1) das colônias isoladas após repique por espalhamento e crescimento da *C. violaceum* em meio de cultura PCA, após 48 h em cultivo a 35 °C.....45
- Figura 9** – Repique por esfregaço para manutenção das colônias da *C. violaceum* a curto prazo em meios de cultura sólidos após 96 h em cultivo a 35 °C. (A) – Segunda passagem (P2) e (B) – Quarta passagem (P4).....46
- Figura 10** – Crescimento e manutenção de colônias de *C. violaceum* com pigmentação violácea em nona passagem (P9), após 96 h de cultivo a 35 °C. (A) – Meio de cultura sólido PCA e (B) – Meio de cultura sólido Ágar-peptona.....48
- Figura 11** – Coloração de Gram da *C. violaceum* em objetiva de imersão de 100x apresentando coloração rosácea.....50
- Figura 12** – *Pellets* formados da *C. violaceum* em meios de congelamentos após centrifugação. (A) - M1 com glicerol 20% e (B) – M2 com glicerol a 10%.....52

Figura 13 – Descongelamento de amostras dos meios de congelamento. **(A)** - M1 e **(B)** - M2 de *C. violaceum*, após 60 dias de criopreservação (-20 °C). Semeaduras por espalhamento nos meios de cultura PCA **(A1; B1)** e Ágar-peptona **(A2; B2)**, após 72 h em cultivo a 35 °C.....54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Contaminação do meio ambiente por efluentes industriais contendo metais pesados	19
3.2 Monitoramento da qualidade ambiental	22
3.3 A remediação de metais pesados	24
3.3.1 A biorremediação de metais pesados	24
3.4 <i>Chromobacterium violaceum</i>	28
3.4.1 Histórico	28
3.4.2 Características gerais	28
3.5 Técnicas de preservação de microrganismos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais e reagentes	35
4.1.1 Equipamentos laboratoriais	35
4.2 Localização da área de estudo	36
4.3 Protocolo de coleta de amostras de água bruta superficial	37
4.4 Preparo dos meios de cultura sólidos	37
4.4.1 Meio de cultura <i>Plate Counter Agar</i> (PCA)	37
4.4.2 Meio de cultura Ágar-peptona	38
4.5 Lançamento de amostra coletada pelo método de <i>Pour Plate</i>	38
4.5.1 Isolamento das colônias de <i>Chromobacterium violaceum</i>	39
4.6 Manutenção das colônias de <i>Chromobacterium violaceum</i>	39
4.7 Coloração de Gram	39
4.8 Preparo dos meios de congelamento	40
4.8.1 Meio de congelamento (M1)	40
4.8.2 Meio de congelamento (M2)	40
4.9 Preparo de amostras congeladas de <i>Chromobacterium violaceum</i>	41

4.10 Processo de descongelamento, análise da viabilidade da <i>Chromobacterium violaceum</i> e expressão de violaceína	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Isolamento e crescimento de colônias bacterianas violáceas a partir de amostra de água bruta superficial	43
5.2 Manutenção da linhagem de <i>Chromobacterium violaceum</i>	46
5.3 Avaliação dos meios de cultura sólidos PCA e Ágar-peptona	48
5.4 Coloração de Gram	50
5.5 Congelamento de amostras de <i>Chromobacterium violaceum</i>	51
5.6 Descongelamento, análise da viabilidade da <i>Chromobacterium violaceum</i> e expressão de violaceína	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos vivem no meio ambiente e nele descartam os resíduos de suas atividades afetando diretamente a qualidade da água, do solo e do ar, assim como todos os organismos vivos. É de conhecimento que o meio ambiente possui a capacidade intrínseca de autodepuração, quando o descarte de resíduos domiciliares e industriais se encontra abaixo do limiar de capacidade em restaurar sua condição inicial (Sumampouw; Risjani, 2014).

Na atualidade, o incremento no descarte de resíduos, tanto industriais quanto urbanos, tornou-se um dos mais sérios problemas de poluição ambiental, em especial a poluição por metais pesados. Embora, esses metais sejam naturalmente encontrados no meio ambiente e alguns deles são elementos-traços essenciais para o processo de metabolismo de muitas formas de vida, inclusive a bacteriana (Bhattacharya; Naik; Khare, 2018), o descarte incorreto com a elevação de seus níveis, causa impactos significativos nos ecossistemas.

Assim, o principal problema da poluição ambiental pelos metais pesados é o significativo acréscimo de sua concentração, causando efeitos tóxicos que alteram a função normal do ecossistema. Além do mais, eles apresentam uma alta persistência, ou seja, não podem ser degradados ou removidos completamente do meio ambiente promovendo-se assim, uma acumulação ou bioacumulação (Bhattacharya; Naik; Khare, 2018).

O acúmulo desses metais pesados em ambientes aquáticos se apresenta como uma das formas mais severas de poluição e contaminação ambiental, que afeta o ecossistema e os seres humanos mediante a ingestão de águas contaminadas por esses poluentes. A toxicidade de cada elemento metálico está diretamente associada a vários fatores envolvendo questões metabólicas e a capacidade do organismo na eliminação dos compostos, sendo que seu limite geralmente será tão baixo, quanto menos útil for o elemento em questão. Quando a concentração de tais compostos excede o tolerável com conseqüente acúmulo no organismo, isso pode levar a sintomas de intoxicação metálica, que dependerá de cada elemento em particular, mas que em linhas gerais nos seres

humanos, podem estar associados a distúrbios gastrointestinais, renais e cerebrais (Alencar, 2020; Mudgal *et al.*, 2010).

Por isso, diante da capacidade de persistência e de toxicidade dos metais pesados no meio ambiente, diversas técnicas de remediação são apresentadas na literatura, indo desde processos físicos e químicos até a biorremediação, a qual se utiliza de organismos vivos, incluindo microrganismos. Neste contexto, o presente trabalho se propõe a isolar no município de Jacareí (SP), cultivar e preservar amostras congeladas de uma linhagem da bactéria *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*), presente naturalmente no meio ambiente das regiões tropicais e subtropicais, com significativo potencial de aplicabilidade na biorremediação de metais pesados com vistas à minimização dos efeitos tóxicos destes ao meio ambiente e, principalmente, a saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolamento de uma linhagem de *Chromobacterium violaceum* em água bruta de nascente situada no município de Jacareí (SP), propagação em cultura de meio sólido e obtenção de amostras congeladas para potencial aplicação na biorremediação de metais pesados advindos de efluentes industriais.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar a linhagem de *Chromobacterium violaceum* a partir de amostras de água bruta superficial da nascente localizada na Escola Técnica Estadual – ETEC Cônego José Bento, no município de Jacareí-SP;
- Padronizar as técnicas de cultura em meio sólido para *Chromobacterium violaceum* e propagação da linhagem;
- Padronização das técnicas de congelamento e descongelamento das amostras de *Chromobacterium violaceum* para potencial aplicação na biorremediação de metais pesados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Contaminação do meio ambiente por efluentes industriais contendo metais pesados

Na atualidade, as atividades antrópicas, em especial a industrial, vêm promovendo o crescimento da poluição ambiental por metais pesados tornando-se um sério problema para os ecossistemas e para os organismos vivos, incluindo os seres humanos no Brasil e no mundo (Cristiani *et al.*, 2011). Dentre as atividades que tem contribuído estão o uso prolongado de fertilizantes minerais, corretivos de acidez, resíduos urbanos e resíduos industriais, em especial o da mineração (Alencar, 2020).

A terminologia “metal pesado” tem sido bastante utilizada na literatura científica, apesar de não existir nenhuma definição consensual regulamentada por entidade científica especializada, como a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Essa denominação se aplica a um grupo heterogêneo de elementos que incluem os metais, semi-metais e não metais que possuam número atômico maior do que 20 ou peso específico maior que $6 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e, que tem sido associado com contaminação e propriedade potencial de toxicidade ou ecotoxicidade (Alencar, 2020; Duffus, 2002).

Os metais pesados podem derivar tanto de fontes naturais, como o intemperismo das rochas, deposições atmosféricas e erupções vulcânicas que promovem baixas concentrações no solo, quanto os originados de atividades antropogênicas que demonstram concentrações significativamente superior aos advindos de fontes naturais (Alencar, 2020; Burak *et al.*, 2010).

Nos efluentes industriais, a presença de metais pesados como zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), níquel (Ni), magnésio (Mg), chumbo (Pb) e cromo (Cr) podem estar em níveis indesejáveis, ou seja, acima do permitido pela legislação com potencial significativo de ocasionar toxicidade à vida aquática e terrestre, incluindo a vida humana (Alencar, 2020) conforme a **Tabela 1**. Um exemplo disso é o cádmio, um metal pesado tóxico para humanos que se encontra presente, com certa frequência, em vernizes/tintas, plásticos, fertilizantes fosfatados e resíduos de bateria e domiciliares (Chen *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Efeitos tóxicos / adversos dos principais metais pesados na saúde humana.

Efeitos dos metais pesados na saúde humana	
Metal pesado	Efeitos tóxicos / adversos
Cádmio	Respiratório, cardiovascular e renal
Cromo	Doença renal aguda e câncer
Cobre	Anemia, náusea e vômito, dano renal e hepático
Chumbo	Neurotoxicidade, dor abdominal, hipertensão, disfunção renal
Níquel	Alergias cutâneas, fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares
Zinco	Dor abdominal, náusea e vômito, diarreia, irritabilidade, anemia, necrose e alopecia
Mercúrio	Desordens neurológicas e motoras

Fontes: Patrush; Kumar; Hu, 2018; Sharma *et al.*, 2021.

Diversos estudos já têm apontado a contaminação por metais pesados em diferentes ecossistemas. Em estudo realizado na Índia foi constatado a presença de contaminação por metais pesados, como zinco, chumbo e cromo em níveis superiores ao padrão permitido na água, nas plantações, nos peixes e sedimento do rio *Cauvery* e também, nas águas superficiais e subterrâneas em *Patancheru Andhra Pradesh* (Sumampouw; Risjani, 2014).

A problemática dos metais pesados é que, em sua forma iônica livre, mesmo em baixas concentrações no ambiente, eles promovem diversas consequências ecológicas, tais como a redução na biodiversidade da biota, a contaminação dos organismos vivos e importantes alterações físico-químicas da água (Hassaan; Nemr; Madkour, 2016).

Além disso, esses metais pesados podem vir a se acumular no leito de sedimento de cursos d'água na forma dissolvida, como íons simples ou complexos e quelatos organometálicos não ionizados ou complexados, bem como partículas em suspensão (hidróxidos, óxidos e silicatos). Nessas formas, esses elementos químicos podem

alcançar elevadas concentrações, em especial, nos locais próximos ao descarte dos efluentes industriais tornando-se um sério problema de contaminação ambiental com vistas à potabilidade da água para a população (Hassaan; Nemr; Madkour, 2016).

A contaminação do ambiente aquático por metais pesados é considerada como uma das formas mais graves de poluição ambiental (Singh *et al.*, 2010). Quando esses metais estão em níveis desregulados na água podem causar impactos como degradação química do meio, alteração do potencial hidrogeniônico (pH), empobrecimento ecológico e o comprometimento no abastecimento de água que impactam diretamente sobre a saúde humana (**Figura 1**). Além do mais, os efeitos tóxicos promovidos pelos metais pesados nos ecossistemas podem reduzir a biomassa de organismos presentes no meio afetando a atividade enzimática, a estrutura das comunidades microbianas e a diversidade funcional de microrganismos menos tolerantes, tornando difícil seu controle e recuperação (Alencar, 2020). Todavia, os microrganismos tolerantes aos metais pesados podem ser utilizados como bioindicadores no monitoramento ambiental (Cristiani *et al.*, 2011).

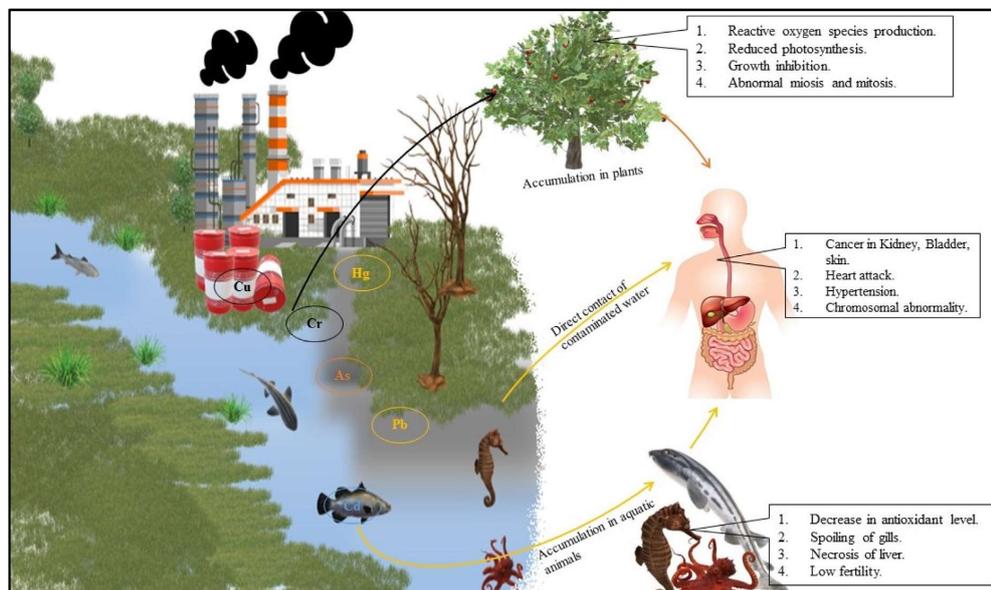


Figura 1 – Contaminação, ciclo e efeitos dos metais pesados no meio ambiente. (Fonte: Sharma *et al.*, 2021).

A toxicidade dos metais pesados sob os organismos bacterianos pode causar danos irreversíveis, em função de sua ligação as proteínas respiratórias e a produção de espécies reativas de oxigênio, afetando sua taxa de crescimento celular ou induzindo a

morte celular. Entretanto, existem bactérias que se tornam resistentes à toxicidade exercida pelos metais pesados por meio adaptativo de certos mecanismos, codificados por genes, tornando o elemento químico menos tóxico por meio de reações de redução ou de complexação (Carepo *et al.*, 2004). Essas bactérias tolerantes a metais pesados podem apresentar aplicações biotecnológicas de interesse quanto à remoção e/ou redução de poluentes e contaminantes através da biorremediação (Alencar, 2020) como descrita no item 3.3.1.

3.2 Monitoramento da qualidade ambiental

O monitoramento da qualidade ambiental é de suma importância em função do significativo grau de poluição do meio ambiente, em especial, por metais pesados.

Quando se trata do gerenciamento de ambientes aquáticos impactados pela contaminação e poluição por metais pesados, a legislação brasileira estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos d'água classificados segundo seus usos prioritários pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente através da Resolução CONAMA nº357/2005, complementada pelo art. 16 da Resolução CONAMA nº 430/2011 quanto aos padrões de emissão de parâmetros inorgânicos (metais pesados) conforme **Tabela 2** (Brasil, 2005; Brasil, 2011).

Tabela 2 - Valores máximos permitidos de parâmetros inorgânicos como padrões de lançamento de efluentes em corpos receptores.

Padrões de lançamento de efluentes	
Parâmetros Inorgânicos	Valor máximo permitido
Arsênio total	0,5 mg/L As
Bário total	5,0 mg/L Ba
Boro total	5,0 mg/L B
Cádmio total	0,2 mg/L Cd
Chumbo total	0,5 mg/L Pb
Cobre dissolvido	1,0 mg/L Cu
Cromo hexavalente	0,1 mg/L Cr ⁶⁺
Cromo trivalente	1,0 mg/L Cr ³⁺

Estanho total	4,0 mg/L Sn
Ferro dissolvido	15,0 mg/L Fe
Manganês dissolvido	1,0 mg/L Mn
Mercurio total	0,01 mg/L Hg
Níquel total	2,0 mg/L Ni
Prata total	0,1 mg/L Ag
Selênio total	0,30 mg/L S
Zinco total	5,0 mg/L Zn

Fonte: Adaptado da Resolução CONAMA nº 430/2011.

A avaliação e monitoramento desses elementos químicos são importantes, em razão de serem estáveis e apresentarem persistência no meio ambiente não podendo ser degradados e acumulando-se na biota através dos processos de bioacumulação e biomagnificação afetando sua diversidade e apresentando significativos problemas para a saúde pública (Alencar; Navoni; Amaral, 2017).

O monitoramento da qualidade ambiental pode ser feito por meio da avaliação de uma série de parâmetros sejam físico, químico e biológico.

Quando se trata do monitoramento da poluição ambiental por metais pesados em solo e água com uso de parâmetros biológicos podem ser empregadas como bioindicadoras algumas espécies de plantas, como a *Thyphas* sp. para poluição por cádmio e níquel. Também podem ser empregadas como bioindicadores algumas espécies de peixes, como *Lamellidens corrianus*, *Indonaia caeruleus* para poluição por chumbo, arsênico e cádmio e cobre, respectivamente (Sumampouw; Risjani, 2014).

Além deles, outros bioindicadores de grande interesse são as bactérias, tais como a *Serratia marscences* para poluição por chumbo e cádmio e que possui um mecanismo de proteção contra a toxicidade deste último, além da *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridia* sp. e *Arcobacter* sp. Inclui-se nesse grupo a *Chromobacterium violaceum*, foco de estudo do presente projeto, indicada como potencial para utilização na remediação de agentes de poluição por metais pesados, sendo que a mesma pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais (Cristiani *et al.*, 2011; Sumampouw; Risjani, 2014), conforme descrito no item 3.4.

3.3 A remediação de metais pesados

Os metais pesados presentes no meio ambiente podem ser remediados a partir de uma variedade de biotecnologias que vem sendo desenvolvidas e que podem se utilizar de métodos físico-químicos convencionais como a precipitação eletroquímica, separação por membrana, adsorção, troca iônica, eletroflotação, eletrocoagulação, evaporação e osmose reversa. Esses métodos apresentam como desvantagens o alto consumo de energia, serem caros, promoverem uma remoção incompleta dos metais e pelo uso de químicos geram-se poluentes secundários (Bhattacharya; Naik; Khare, 2018; Cristiani *et al.*, 2011). Quando aplicados na remoção de metais pesados da água, torna-se uma tarefa difícil em função dos altos custos de tratamento e, para se evitar esses inconvenientes existem alternativas técnicas e ferramentas mais eficientes para a remoção desses compostos do ambiente (Alencar, 2020).

Além dos métodos convencionais existem ferramentas alternativas e que vem apresentando resultados mais promissores como a biorremediação, a qual enfoca na aplicação de microrganismos, em especial as bactérias, que possuam a capacidade de remover os metais pesados do ambiente. Muitos estudos têm sido reportados na literatura com grande sucesso na remoção eficiente de metais em ecossistemas contaminados. Essa remoção ocorre através de processos ativos e passivos por meio da biodegradação ou da capacidade em acumular esses elementos químicos tóxicos de forma eficaz nos seus compartimentos celulares (Alencar, 2020; Alencar; Navoni; Amaral, 2017). Esse processo de remediação microbiológica (biorremediação) apresenta algumas vantagens como a implementação simples, baixo custo, alta especificidade e pequeno dano ambiental (Chen *et al.*, 2019).

3.3.1 A biorremediação de metais pesados

A biorremediação ou remediação baseada em microrganismos e/ou plantas são utilizados como uma ferramenta prática e efetiva para remediar, reduzir ou degradar substâncias tóxicas perigosas ao meio ambiente (Alencar; Navoni; Amaral, 2017; Dixit *et al.*, 2015). Apresenta algumas vantagens como o baixo custo de aplicação se comparado a outras técnicas de remediação, como métodos físicos e químicos e, sua elevada

diversidade de ação permite sua incorporação a uma significativa variedade de agentes contaminantes e poluentes ambientais, tais como os metais pesados (Alencar; Navoni; Amaral, 2017; Bhattacharya; Naik; Khare, 2018). Dentre os métodos de biorremediação estão a biocoagulação, a bioacumulação, a biolixiviação, biossorventes e imobilização para a remediação de metais pesados por um processo sustentável e eficiente, sem que haja significativas alterações no meio ambiente (Bhattacharya; Naik; Khare, 2018; Cristiani *et al.*, 2011).

Os microrganismos, em especial as bactérias possuem características metabólicas intrínsecas e adaptativas que as torna importantes ferramentas para a biorremediação de ambientes impactados por metais pesados. De maneira geral, as bactérias quando em contato com os metais pesados tendem a desenvolver mecanismos de tolerância a esses elementos (Alencar; Navoni; Amaral, 2017). Esses mecanismos incluem bombas de efluxo, detoxificação enzimática, sequestro iônico intra e extracelular e redução do contaminante a uma forma menos tóxica e são codificados por genes cromossomais (Gadd, 2010).

Esses organismos bacterianos também podem atuar em processos de imobilização, mobilização, transformação de metais pesados por reações de precipitação extracelular, de oxirredução, de metilação e demetilação que podem servir como meio para minimizar e até combater as consequências nocivas da poluição ambiental causada por metais pesados (Gadd, 2000).

Os microrganismos, em especial as bactérias, podem ser específicas para um ou mais metais pesados, captando-os em altas concentrações de acordo com uma variedade de mecanismos. Esses podem ser tanto por processos de metabolismo-independente (passivo) quanto por metabolismo-dependente (ativo). O processo de biosorção, captação inativa, pode ocorrer por ligação não específica do metal à superfície celular e matriz extracelular e por captação intracelular independente do metabolismo (Ayangbenro; Babalola, 2017; Bhattacharya; Naik; Khare, 2018). Além do mais, podem remover os metais pesados por meio da bioacumulação, captação ativa, onde os metais são transportados para dentro da célula microbiana (citoplasma celular) via proteínas de ligação e transportadoras na membrana celular e são quelados por alguns ligantes

metabólicos intracelulares (**Figura 2A**) (Cristiani *et al.*, 2011; Sreedevi; Suresh; Jiang, 2022).

Os processos de adsorção de metais pesados por bactérias Gram positivas e negativas são determinados pela capacidade de adsorção do envelope celular e influenciada pelas diferenças na construção das suas paredes celulares. Os sítios de ligação para metais pesados na superfície celular bacteriana são, usualmente, grupos aniônicos como os resíduos carboxila e fosfato, grupos sulfidril (SH) ou hidroxila (OH) que pelo processo de adsorção sequestra primariamente os íons metálicos catiônicos do meio e estes passam pelo processo de oxirredução diminuindo a toxicidade desses elementos (Ayangbenro; Babalola, 2017; Cristiani *et al.*, 2011; Sreedevi; Suresh; Jiang, 2022).

Na biorremediação de metais tem sido mais utilizada as bactérias Gram negativas segundo a literatura, pois este grupo apresenta um melhor aparato fisiológico quando comparado as Gram positivas. A parede celular das espécies de bactérias Gram negativas apresenta sítios para ligação de metais com um alto potencial ativo de quimiossorção pela presença de glicoproteínas, lipoproteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (Alencar; Navoni; Amaral, 2017). Podem também secretar várias proteínas e enzimas, como proteínas de ligação metálica e transportadoras, assim como a produção extracelular de substâncias poliméricas, como polissacarídeos, cápsulas, entre outros com a finalidade de remoção do metal pesado. Além do mais, elas apresentam um mecanismo de efluxo ativo de metais do citoplasma para o espaço periplasmático conduzido por ATPases localizadas na membrana interna como outro caminho para a resistência a metais (**Figura 2B**) (Ayangbenro; Babalola, 2017; Yu *et al.*, 2020).

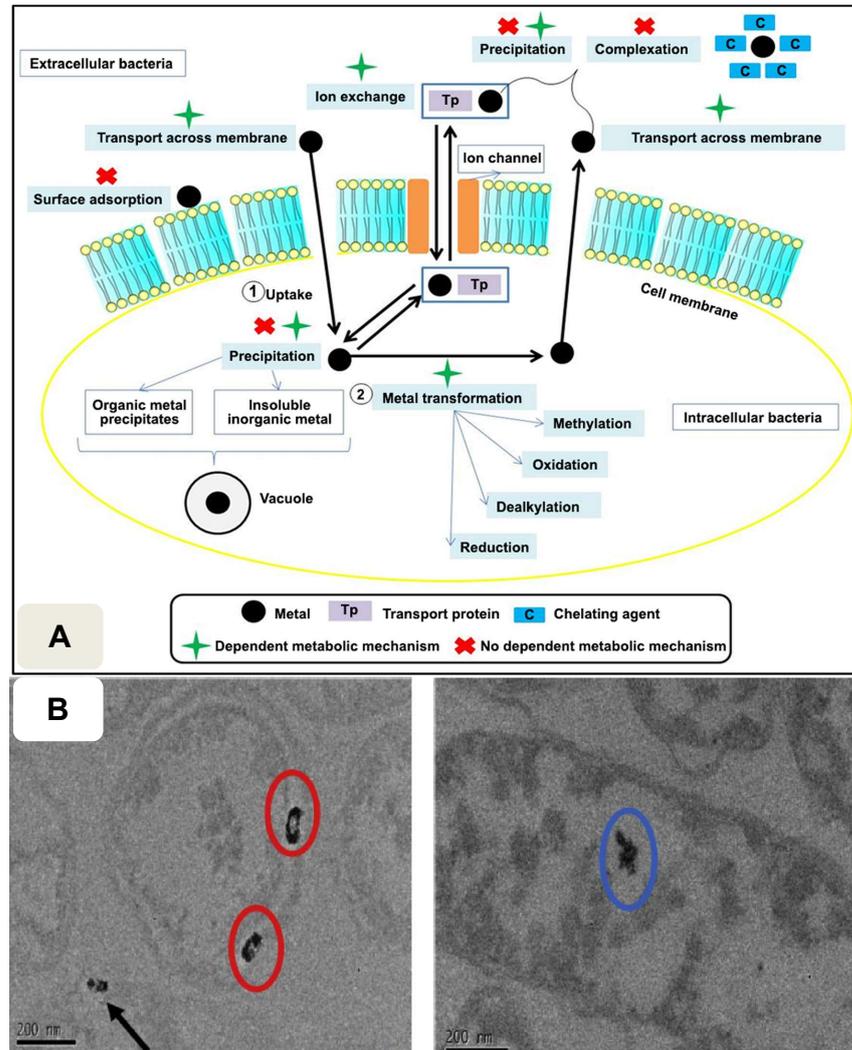


Figura 2 – (A) - Mecanismos de captação de metal pesado em bactérias e **(B)** - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de agregados de cádmio presentes na camada periplasmática e no interior da célula bacteriana de *Serratia marcescens*. (Fontes: (A) Alencar; Navoni; Amaral, 2017 e (B) Chen et al., 2019).

Dentre os diversos microrganismos potencialmente relevantes para a biorremediação de metais pesados tóxicos ao meio ambiente, como objeto deste estudo, encontra-se a bactéria *Chromobacterium violaceum* (Alencar; Navoni; Amaral, 2017).

3.4 *Chromobacterium violaceum*

3.4.1 Histórico

A *Chromobacterium violaceum* foi descrita pela primeira vez no século XIX por Boisbaudran em 1882 e, de forma independente, em 1880, por Bergonzini que durante um experimento esqueceu no laboratório uma solução controle de albumina de ovo, no qual apareceu um filme que reduzido por evaporação, obteve-se um filme fino muito denso de cor violeta. Após alguns experimentos, Bergonzini a denominou de *Cromobacterium violaceum* publicando sua descoberta e, logo em seguida, o nome foi corrigido para *Chromobacterium violaceum* por Zimmerman (Antunes, 2006; Dall' Agnol *et al.*, 2008).

No Brasil, apenas em 1976, a *Chromobacterium violaceum* foi isolada e estudada de uma amostra de água bruta recolhida na frente da estação de tratamento de água da cidade de Manaus, onde o professor Wilson Chagas de Araújo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, identificou as colônias violetas a partir de uma análise bacteriológica da amostra, sendo a primeira vez que esse microrganismo foi estudado no país. A violaceína, pigmento de coloração violeta, por sugestão do professor Caldas, do Instituto de Biofísica, UFRJ, considerou-o como um pigmento protetor da irradiação solar para a bactéria (Antunes, 2006; Pitlovanciv *et al.*, 2006).

Pelo grande interesse biotecnológico da *Chromobacterium violaceum*, no ano 2000 foi escolhida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para ser o primeiro microrganismo a ter o genoma completamente sequenciado, finalizado e publicado em 2003 pelo Consórcio Nacional Brasileiro de Sequenciamento do Genoma e estudos pós-genômicos que explorem a sua fisiologia são de grande relevância, em razão dos produtos de alguns genes apresentarem significativo potencial biotecnológico (Antunes, 2006; Grangeiro *et al.*, 2004; Pitlovanciv *et al.*, 2006).

3.4.2 Características gerais

A bactéria *Chromobacterium violaceum* é encontrada em solos e águas de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. No Brasil, essa bactéria é encontrada

em três principais ecossistemas: a Floresta Atlântica, o Cerrado e a Floresta Amazônica (Lacerda; Duarte; Fernande, 2016; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007).

A *Chromobacterium violaceum* pertence à família Neisseriaceae do subfiló β -proteobactérias, classificada como Gram negativa, de vida livre, saprófita (alimenta-se de animais e plantas em decomposição), aeróbia facultativa, com formato de bastonete e dotada de mobilidade por um único flagelo polar e flagelos laterais e subpolares (**Figura 3A**). Em meio sólido, apresenta-se como colônias de aspecto cremoso e, geralmente de coloração violeta, associada à síntese do pigmento violaceína (**Figura 3B**) (Alencar; Navoni; Amaral, 2017; Alencar *et al.*, 2019).

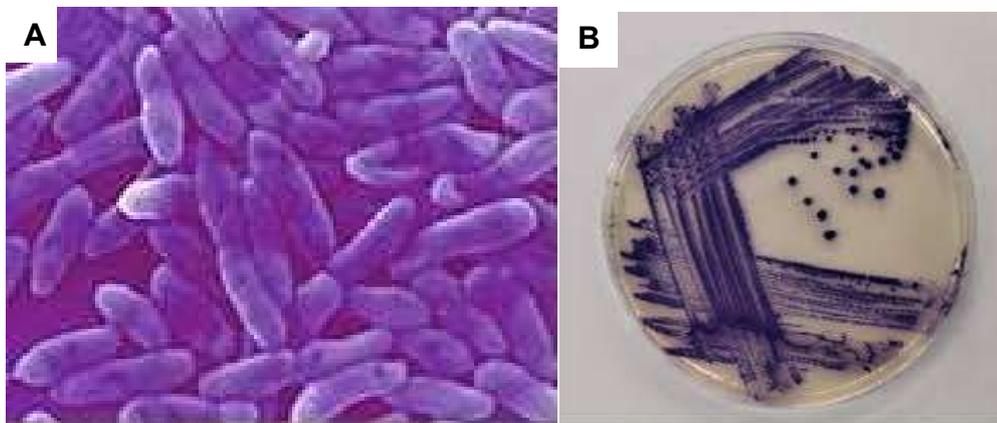


Figura 3 – Imagens da bactéria *Chromobacterium violaceum*. **(A)** - Micrografia em microscopia eletrônica de varredura; **(B)** – Crescimento de colônias com coloração violeta típica em meio de cultura sólido. **(Fontes: (A)** <https://revistapesquisa.fapesp.br/sobrevivente-das-selvas/>. **Acesso em:** 15 out. 2023; **(B)** Casagrande, 2022).

Essa bactéria Gram negativa possui um versátil metabolismo energético por meio de enzimas oxidases e redutases conferindo-lhe a capacidade de utilizar diversas fontes energéticas e se desenvolver em ambientes aeróbios e anaeróbios (Lacerda; Duarte; Fernande, 2016). Em condições aeróbias é capaz de crescer em meio mínimo suplementado com açúcares simples (glicose, frutose, galactose e ribose) como fonte de energia, já em condições anaeróbias metaboliza glicose com produção de ácido lático e fórmico, além de também utilizar aminoácidos e lipídios como fonte energética, características que lhe confere uma capacidade de distribuição sazonal. A temperatura ideal de crescimento da *C. violaceum* está entre 20 °C e 37 °C (Lacerda; Duarte; Fernande, 2016; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007).

Diante da alta competitividade e habilidade da *C. violaceum* em sobreviver sob diferentes condições ambientais estressantes, isso está relacionado à produção de uma diversidade de metabólitos secundários, como enzimas capazes de detoxificar espécies reativas de oxigênio, proteínas relacionadas à tolerância contra presença de ácidos, temperatura, substâncias antimicrobianas, bem como metais pesados (Lacerda; Duarte; Fernande, 2016). Essa variedade de enzimas e metabólitos secundários produzidos apresenta diversas aplicações industriais (bioinseticida), farmacêuticas (antimicrobiana) e ecológicas (adaptativas) (Alencar *et al.*, 2019; Alencar; Navoni; Amaral, 2017; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007). Além da presença de genes envolvidos na resistência a metais como o arsênio, ferro, cádmio, zinco, manganês, mercúrio e ouro conforme relato de vários estudos na literatura conferindo-lhe potencial atividade biorremediadora, como uma alternativa efetiva e de baixo custo para áreas impactadas por metal pesado, em especial no ambiente aquático (Alencar; Navoni; Amaral, 2017; Alencar *et al.*, 2019; Carepo *et al.*, 2004).

A versatilidade metabólica e capacidade adaptativa frente ao ferro, arsênico, magnésio, zinco, cádmio e mercúrio que a *C. violaceum* possui advêm da expressão de genes envolvidos na resistência a esses elementos e, na qual se sabe que 93 ORFs (*Open Reading Frames*) ou Sequências de Leitura Aberta promovem a síntese de proteínas responsáveis pela regulação ou metabolização desses elementos. Além desses, outros 496 ORFs operam proteínas transportadoras de membrana que controlam a concentração desses metais no meio intracelular e, a produção de cianeto de hidrogênio (HCN) que interage com diversos metais, complexando-os para formas mais estáveis e solúveis em água que está associada a um Operon, o hcnABC (LACERDA; DUARTE; FERNANDE, 2016).

Carepo *et al.* (2014) estudaram um dos mecanismos biorremediadores da *C. violaceum* frente ao metal arsênio (As). A redução do íon As(V) (arsenato) para sua forma menos tóxica o íon As(III) (arsenito) ocorre pela ação da enzima arsenato redutase. A forma menos tóxica do arsênio (As(III)) retorna ao meio por efluxo via proteína de ligação de membrana.

Em estudo realizado por Prabhakaran *et al.* (2018) com o metal crômio (Cr) foram demonstrados dois mecanismos pelos quais a *C. violaceum* promoveu sua ação

biorremediadora. Um dos mecanismos foi à adsorção (biosorção) do íon Cr(VI) a superfície celular carregada negativamente favorecida pelos grupos hidroxila, carboxila, amina e fosfato promovendo a imobilização desse metal pesado e, o outro foi a biorredução do íon Cr(VI) para a espécie química menos tóxica o íon Cr(III) por meio da interação com os grupamentos hidroxila e sulfidrila presentes nos polissacarídeos da parede celular.

No estudo de Alencar (2020), o potencial biorremediador da *C. violaceum* frente ao chumbo (Pb) foi realizado por meio de análise proteômica demonstrando os processos de biosorção e complexação iônica do Pb na estrutura celular, sem alteração estrutural significativa (**Figura 4**), além de proteínas relevantes para os processos de bioacumulação e captação intracelular de biomoléculas.

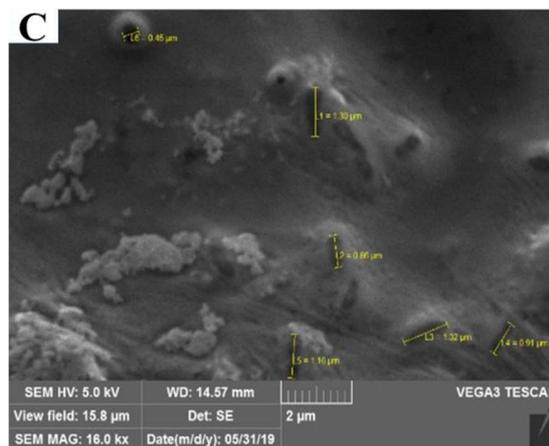


Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando chumbo adsorvido pela *C. violaceum* evidenciado pela tonalidade escurecida (**Fonte:** Alencar, 2020).

Outro marcante aspecto da *C. violaceum* é a presença de um fenótipo que desperta grande interesse e tem sido objeto de muito estudo, a produção de um pigmento violeta, a violaceína, caracterizando a coloração da colônia bacteriana em meio sólido (Pitlovanciv *et al.*, 2006). A violaceína foi primeiramente isolada em 1944 e quimicamente caracterizada alguns anos mais tarde (Hungria *et al.*, 2004). O pigmento violaceína (**Figura 5**) apresenta uma baixa solubilidade em água, pode sofrer interferência das condições ambientais e sabe-se que sua produção é favorecida sob condições de aerobiose e temperatura do meio de cultura em torno de 30 °C (Oliveira, 2005; Pitlovanciv *et al.*, 2006).

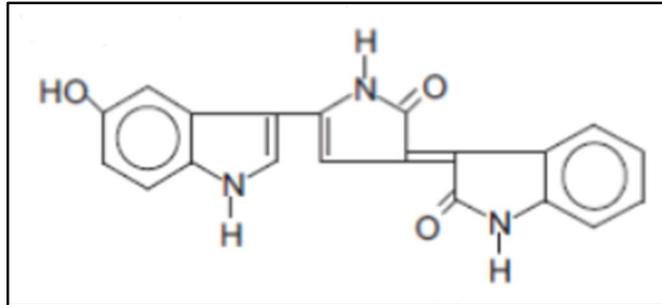


Figura 5 - Estrutura química da violaceína (Fonte: Pitlovanciv *et al.*, 2006).

Na literatura há diversos estudos sobre a *C. violaceum*, sendo a maioria voltada à expressão gênica da violaceína e sua aplicabilidade industrial (Oliveira, 2005). Apesar disso, existem vários trabalhos sobre o potencial de biorremediação da *C. violaceum* como demonstrado pelo estudo de Alencar *et al.* (2019) que avaliou os padrões de resistência fenotípica ao ferro, manganês e zinco por meio de testes de bioprospecção concluindo acerca da importância dessa bactéria como ferramenta de biorremediação de metais em áreas contaminadas por esses elementos químicos (Alencar *et al.*, 2019).

3.5 Técnicas de preservação de microrganismos

Na atualidade, surge a necessidade da preservação de microrganismos em laboratórios para diversos fins, como o ensino e a pesquisa diante do desenvolvimento científico e biotecnológico (Abreu; Tutunji, 2004; Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012). Para a escolha da forma de preservação ou manutenção mais adequada, esta deve se basear nas particularidades intrínsecas de cada microrganismo e, também nas vantagens e desvantagens de cada técnica a ser empregada (Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012).

Diversas são as técnicas de preservação conhecidas que vão desde um curto até um longo prazo, se diferenciando quanto ao tempo de conservação da viabilidade microbiana, as características dos isolados, além do custo e do tempo de execução. Na técnica de conservação a curto prazo, considerada uma técnica simples e de baixo custo, tem-se o sub-cultivo ou repique periódico dos isolados microbianos que demanda tempo e pode apresentar algumas desvantagens, como o maior risco de contaminação da amostra em função de múltiplos manuseios, a possibilidade da perda das características de resistência dos isolados, bem como o risco de ocorrerem mutações e o aumento da probabilidade de alterações na sua estabilidade genética em função dos repiques

frequentes (Abreu; Tutunji, 2004; Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012). Apesar dessa técnica ser uma das mais antigas, ela tem sido bastante utilizada para se obter a viabilidade de bactérias (Sola *et al.*, 2012).

Na técnica de conservação a médio prazo, considerada uma metodologia simples, de fácil execução e de baixo custo, tem-se a preservação realizada em ágar nutriente acrescido de óleo mineral, o qual tem atuação na redução do oxigênio disponível para o microrganismo que, conseqüentemente, reduz a taxa de multiplicação (Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012). Apesar de sua simplicidade, essa metodologia pode apresentar como desvantagens a demora no processo de reativação, bem como na instabilidade genética do microrganismo a ser preservado (Oliveira *et al.*, 2023).

Já a técnica de conservação a longo prazo, a criopreservação, é muito eficiente, pois pode manter viável por anos diferentes tipos celulares, em especial, as bactérias utilizando-se de temperaturas baixas que variam entre - 20 °C e - 196 °C. Nessa técnica, há a necessidade de uso de crioprotetores que se caracterizam por moléculas de baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e de baixa toxicidade celular, os quais são adicionados ao meio de congelamento com a função de proteger as células bacterianas de possíveis danos, como a formação de cristais de gelo decorrentes do processo de congelamento que causam injúrias na parede celular e inviabilizam as amostras (Oliveira *et al.*, 2023). Dentre os crioprotetores disponíveis no mercado, os mais utilizados são: o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etilenoglicol, o metanol e a sacarose na concentração de 10% a 15% (Abreu; Tutunji, 2004; Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012). Faz-se importante considerar que meios nutritivos devem ser evitados, pois a criopreservação visa reduzir o metabolismo do microrganismo (Oliveira *et al.*, 2023).

Cabe ressaltar que a criopreservação engloba alguns fatores críticos que devem ser considerados, como o tipo e a concentração do agente de crioproteção e a duração do processo de congelamento (Abreu; Tutunji, 2004).

Frente a não existência de um método de preservação ideal, cada laboratório mediante seus objetivos, pode definir qual o meio mais adequado a ser utilizado, de acordo com a espécie de microrganismo a ser preservada, levando-se em consideração a sua viabilidade técnica, a conservação das características do isolado minimizando a ocorrência de mutações, a disponibilidade de recurso financeiro, o tempo de

armazenamento e a finalidade da preservação (Abreu; Tutunji, 2004; Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

- Frasco de vidro âmbar com tampa de rosca para coleta de amostras de água bruta superficial;
- Vidrarias (béquer, *erlenmeyer*, bastão de vidro, pipeta graduada, espátula de aço inoxidável);
- Placas de Petri;
- Alça de platina ou bacteriológica;
- Meio de cultura *Plate Counter Agar – PCA* (KASVI);
- Peptona bacteriológica (KASVI);
- Ágar-ágar (KASVI);
- Água destilada (Quimesp Química);
- Glicerol p.a.;
- Solução de cloreto de sódio 0,9% - ampola 5 mL (Needs®);
- Seringa de 5 mL (SR *Luelock*);
- Ímã magnético;
- Gaze hidrófila;
- Tubo de ensaio com tampa de rosca;
- Estante metálica para tubos de ensaio;
- *Parafilm* (Ancor);
- Tubo cônico tipo *Falcon* de 20 mL;
- Pipeta plástica graduada de 3 mL;
- Criotubos graduados de 1 mL;
- Pipeta de 20 µL e ponteiros (Eppendorf®);
- Lâminas e lamínulas (*Precision Glass line*);
- Solução de Lugol;
- Violeta Genciana Funicada;
- Fucsina Fenicada de Gram;
- Álcool Etílico 99,3°GL p.a. (Química Moderna).

4.1.1 Equipamentos laboratoriais

- Agitador magnético com chapa aquecedora (Modelo DT3110H, DiagTech);
- Autoclave (Modelo 108, FABBE LTDA);
- Centrífuga (Modelo 206, Fanem®);
- Capela de exaustão (Lucadema);
- Microscópio óptico binocular (Modelo 180PL, Nova);

- Estufa de meio de cultura (Modelo 347 CDU, Fanem®);
- Refrigerador (Modelo CRM51, Consul);
- Balança analítica (Modelo AL 500, Marte®).

4.2 Localização da área de estudo

As amostras de água bruta superficial foram coletadas de nascente localizada na Escola Técnica Estadual – ETEC Cônego José Bento, segundo as coordenadas de latitude $23^{\circ}17'35.96''\text{S}$ e de longitude $45^{\circ}58'2.58''\text{O}$ (**Figura 6**).

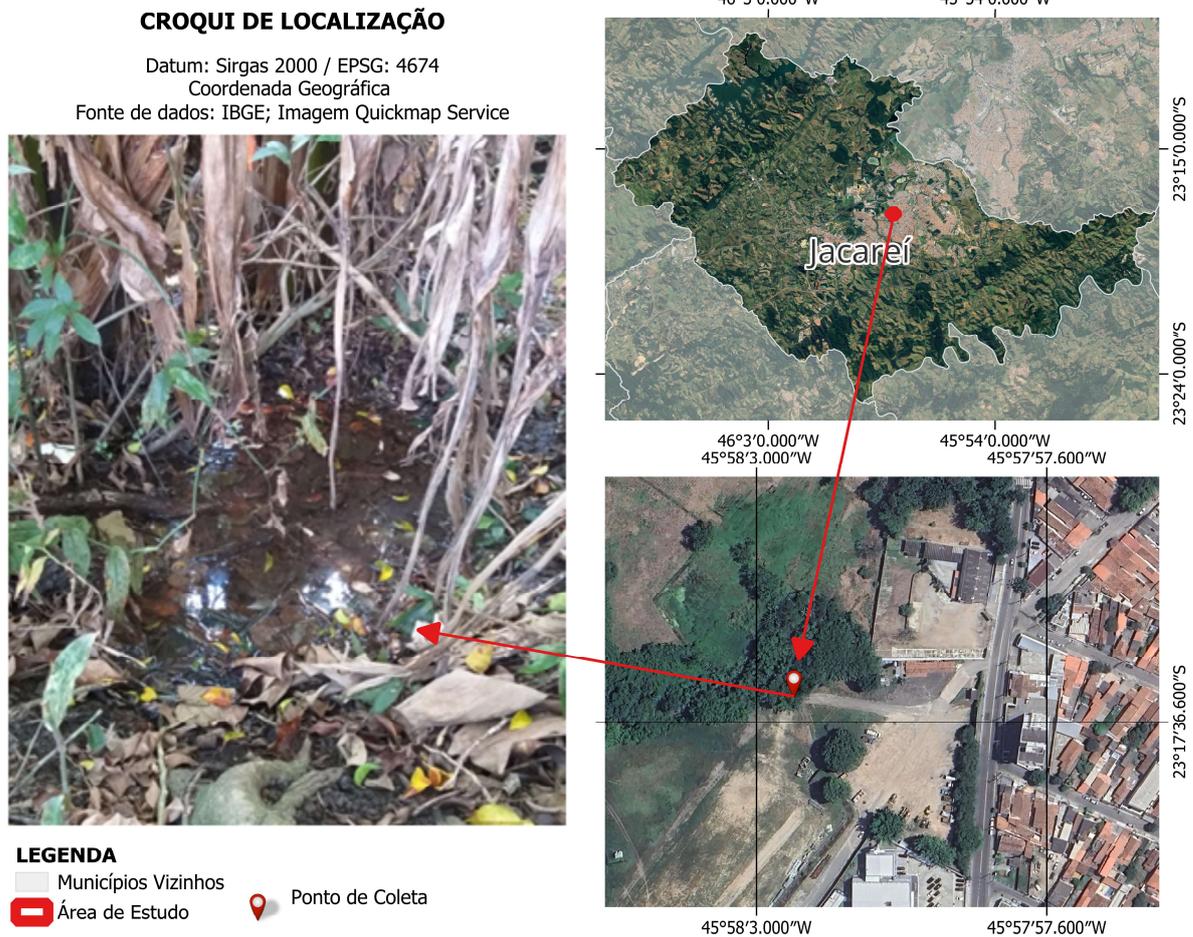


Figura 6 – Croqui de localização da nascente na Escola Técnica Estadual – ETEC Cônego José Bento, município de Jacareí-SP. (**Fonte:** elaborado pelo autor, 2024).

4.3 Protocolo de coleta de amostras de água bruta superficial

Foram coletadas duas amostras simples em duplicatas de água bruta superficial da nascente na ETEC - Cônego José Bento a 30 cm da lâmina d'água, conforme orientação em AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (2011), tanto no período seco quanto no chuvoso com temperaturas variando de 20 °C a 28 °C (Agência Nacional de Águas, 2011).

A coleta de água bruta superficial da nascente foi diretamente realizada em frasco de vidro âmbar esterilizado (100 mL) com tampa de rosca. O frasco foi previamente condicionado com a amostra antes da coleta final. O frasco com a amostra coletada foi acondicionado em saco plástico com vedação e transportado diretamente ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Tecnologia – Unidade Jacareí para lançamento imediato conforme descrito no item 4.5.

4.4 Preparo dos meios de cultura sólidos

Os meios de cultura sólidos foram preparados no laboratório de microbiologia da Faculdade de Tecnologia de São Paulo – Unidade Jacareí conforme especificação do fabricante.

4.4.1 Meio de cultura *Plate Counter Agar* (PCA)

O meio de cultura PCA (5 g/L de digestivo enzimático de caseína; 2,5 g/L de extrato de levedura; 1 g/L de glicose e 15 g/L de ágar bacteriológico), comercialmente disponível para bactérias heterotróficas foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, pesando-se 4,5 g do meio em balança analítica e adicionado a 200 mL de água destilada em *erlenmeyer* de 250 mL para hidratação. O meio de cultura foi mantido sob aquecimento e agitação branda até a fundição completa em um líquido homogêneo e de coloração amarelo translúcido em volume final de 200 mL.

Após completa solubilização, 10 mL da solução foram transferidos para tubos de ensaio com rosca utilizando-se pipeta graduada. Os meios de cultura aliquoteados foram esterilizados em autoclave com calor úmido a 121 °C por 15 minutos.

O meio de cultura PCA com pH $7,0 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi conservado por até 90 dias em temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ devidamente fechados e identificados em estante metálica.

4.4.2 Meio de cultura Ágar-peptona

O meio de cultura Ágar-peptona foi preparado no próprio laboratório utilizando-se como base equivalente a composição do meio PCA sem a fração de glicose e a substituição da fonte proteica pela peptona bacteriológica. O preparo foi efetuado com a pesagem de 2,0 g de peptona e 1,4 g de ágar, ambos em pó, misturados e hidratados cada um em 50 mL de água destilada em *erlenmeyer* de 100 e 250 mL respectivamente.

O *erlenmeyer* contendo o ágar hidratado foi mantido sob agitação branda com aquecimento até fundir completamente em uma solução de coloração amarela translúcida. Em seguida, foi adicionada a solução de peptona a 2% e agitada brandamente até completa homogeneização do meio totalizando o volume final de 100 mL.

Após completa solubilização, 10 mL da solução foram transferidos para tubos de ensaio com rosca utilizando-se de pipeta graduada. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave com calor úmido a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

O meio de cultura peptona-ágar foi conservado por até 90 dias em temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ devidamente fechados e identificados em estante metálica.

4.5 Lançamento de amostra coletada pelo método de *Pour Plate*

A amostra coletada de água bruta superficial da nascente foi lançada pelo método em profundidade ou *pour plate* para obtenção de colônias isoladas em placa de Petri.

Na placa foi inoculada 1 mL da amostra de água bruta superficial e, simultaneamente adicionado o meio PCA previamente fundido a $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $46\text{ }^{\circ}\text{C}$. Imediatamente após o lançamento realizou-se uma homogeneização por meio de movimento delicado (em forma de oito e repetido 10 vezes) para completa distribuição da amostra no meio de cultura e aguardada a solidificação das placas (adaptado de Tortora; Funke; Case, 2017).

As placas solidificadas, em triplicata, foram levadas para estufa bacteriológica a 35 °C invertidas e mantidas nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h para avaliação do crescimento das colônias bacterianas heterotróficas de interesse.

4.5.1 Isolamento das colônias de *Chromobacterium violaceum*

As colônias bacterianas no meio de cultura PCA apresentando coloração violeta foram isoladas e transferidas por esfregaço com alça de platina ou bacteriológica através da técnica de espalhamento ou *spread plate* para três placas de Petri contendo meio PCA solidificado, previamente preparado e na temperatura ambiente para o esfregaço. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica por até 72 horas para o crescimento de colônias de *C. violaceum*.

4.6 Manutenção das colônias de *Chromobacterium violaceum*

A manutenção das colônias de *C. violaceum* foi realizada pelo método de curto prazo, ou seja, pelo repique contínuo a cada 96 h a 168 h das colônias em meios de cultura sólidos (PCA e Ágar-peptona), previamente preparados, em temperatura ambiente por meio de esfregaços através da técnica de espalhamento com alça bacteriológica em triplicatas mantidas em estufa bacteriológica a 35 °C durante todo o período experimental.

4.7 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi preparada em lâmina (triplicata) a partir da colônia bacteriana em estudo, sendo o esfregaço delgado, homogêneo e fixado.

A lâmina com esfregaço foi adicionada o corante Violeta Genciana Funicada, aguardado um minuto e lavado rapidamente em água destilada. Em seguida, foi adicionada a solução de Lugol, aguardado um minuto e lavada em água destilada. Na sequência, foi gotejado na lâmina o álcool absoluto e mantido por 15 segundos, lavado em água corrente e rapidamente adicionado o contra-corante Fucsina Fenicada de Gram mantido por 30 segundos, lavada a lâmina em água destilada e secada cuidadosamente em papel absorvente (Nogueira; Miguel, 2009; Tortora; Funke; Case, 2017).

As lâminas preparadas com a coloração de Gram receberam lamínulas e foram avaliadas em microscópio óptico com óleo de imersão em objetiva de 100x.

4.8 Preparo dos meios de congelamento

Os meios de congelamento foram preparados para avaliação das condições de armazenamento sob refrigeração a -20 °C pelo método de médio prazo (Sola *et al.*, 2012), sendo avaliados dois meios de congelamento descritos a seguir.

4.8.1 Meio de congelamento (M1)

O meio de congelamento (M1) foi preparado a partir de três soluções, sendo elas descritas a seguir:

A) **Solução I** – Meio peptona bacteriológica

Essa solução foi preparada conforme especificação do fabricante com a pesagem de 2,0 g de pó e hidratação em 100 mL de água destilada.

B) **Solução II** – Glicerol

Essa solução foi preparada no volume de 10 mL partindo de 4 mL de glicerol p.a. para cultura de células adicionado a 6 mL de água destilada.

C) **Solução III** – Soro

Essa solução foi preparada com 2 mL de soro estéril obtido a partir de sangue humano recém-colhido de doador voluntário (própria autora), sem uso de heparina, centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e extraído da fração de soro.

As soluções I e II foram autoclavadas e a solução III foi preparada próxima a finalização do preparo do meio de congelamento.

O meio de congelamento final foi preparado com a seguinte composição: 8 mL da solução I + 10 mL da solução II + 2 mL de soro contemplando 20 mL de volume total com glicerol a 20%.

4.8.2 Meio de congelamento (M2)

O meio de congelamento (M2) foi preparado conforme método descrito no item 4.8.1 sem o soro e com a redução na concentração do glicerol para 10%.

O meio para congelamento foi preparado a partir de duas soluções, sendo elas:

A) **Solução I** – Meio peptona bacteriológica

Essa solução foi preparada conforme especificação do fabricante com a pesagem de 2,0 g de pó e hidratação em 100 mL de água destilada.

B) **Solução II** – Glicerol

Essa solução foi preparada no volume de 10 mL partindo de 4 mL de glicerol p.a. para cultura de células adicionado a 6 mL de água destilada.

As soluções I e II foram autoclavadas.

O meio para congelamento final foi preparado com 7,5mL da solução I + 2,5mL da solução II contemplando 10 mL de volume total com glicerol a 10%.

4.9 Preparo de amostras congeladas de *Chromobacterium violaceum*

O preparo das amostras de *C. violaceum* para congelamento foi adaptado de Oliveira *et al.* (2023). Em tubos cônicos do tipo *Falcon*, previamente identificados, foram adicionados 5 mL de cada meio de congelamento (M1 e M2) em duplicatas. Em cada tubo contendo o meio de congelamento foi solubilizado todo o material de crescimento bacteriano proveniente da raspagem das colônias de *C. violaceum* com alça bacteriológica das placas de Petri mantida em estufa a 35 °C.

Os tubos cônicos contendo o meio de congelamento e as bactérias *C. violaceum* foram levados para centrifugação a 3200 rpm por dez minutos para a formação de *pellets*. O sobrenadante foi removido com pipeta automática e adicionado 10 mL de cada meio de congelamento com a ressuspensão bacteriana. Após a total ressuspensão, uma alíquota de 1 mL de cada meio foi transferida para criotubos graduados esterilizados e previamente identificados.

Os criotubos de *C. violaceum* nos meios de congelamento M1 e M2 foram mantidos em geladeira (2°C a 8 °C) por 15 a 20 minutos para resfriamento inicial, em seguida para refrigeração a -20 °C, sendo mantidas sob esta condição pelo prazo total de três a seis meses.

Para quantificação estimada do número de bactérias *C. violaceum* no inóculo de congelamento, foi retirada da amostra, diluída na proporção de 1:1000 e cultivada em meio PCA por 24 horas a 35 °C por plaqueamento, para contagem do número de

Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) viáveis, tendo-se obtido a concentração de 17×10^9 UFC/mL presentes nas amostras congeladas em ambos os meios.

4.10 Processo de descongelamento, análise da viabilidade da *Chromobacterium violaceum* e expressão de violaceína

O processo de descongelamento foi adaptado de Oliveira *et al.* (2023). Uma amostra de cada um dos meios de congelamento M1 e M2 foi avaliada, em intervalo de 60 dias com análise da viabilidade de recuperação e crescimento da *C. violaceum* e, também da produção e expressão de violaceína, ou seja, da presença de pigmentação violácea nas colônias bacterianas.

Cada amostra foi descongelada de forma rápida em banho-maria a 35°C, sendo totalmente transferida para tubo cônico do tipo *Falcon* identificado, lavado com 10 mL de solução de NaCl 0,9% (pH 7,0), homogeneizado e centrifugado a 3200 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado com 3 mL de NaCl 0,9%. Alíquotas de 200µL foram transferidos para placas de Petri em duplicatas pelo método de profundidade com meios de cultura PCA e Ágar-peptona. Sequencialmente, outras placas de Petri, em duplicata, contendo os mesmos meios de cultura solidificados (PCA e Ágar-peptona) foram semeados pelo método de espalhamento com alça bacteriológica.

Todas as placas contendo as amostras semeadas foram mantidas em estufa bacteriológica a 35°C. A viabilidade bacteriana e crescimento das culturas, assim como a expressão de violaceína foi avaliada pelo padrão de crescimento nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e crescimento de colônias bacterianas violáceas a partir de amostra de água bruta superficial

Na atualidade, a contaminação do meio ambiente com metais pesados é de suma relevância e, dentre os diversos métodos descritos na literatura, a biorremediação é uma das mais estudadas. Nesse aspecto, uma gama de bactérias Gram negativas tem seu potencial biorremediador avaliado, entre elas citam-se, principalmente, a *Chromobacterium violaceum* e a *Serratia marscescences*.

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria pertencente à família Neisseriaceae (Antunes, 2010), amplamente descrita na literatura, em especial quanto ao potencial de biorremediação de metais pesados e nas múltiplas aplicações biotecnológicas, industriais e farmacêuticas (Alencar, 2016; Lima-Bittencourt, 2007).

A *C. violaceum* é uma beta-proteobactéria, de vida livre, Gram negativa e saprófita encontrada em solo e água nos mais diversos ambientes pela alta capacidade de adaptabilidade e sobrevivência, tornando-a o maior componente da microbiota nos ecossistemas tropicais (Lima-Bittencourt, 2007).

No Brasil, a *C. violaceum* é encontrada com facilidade em três ecossistemas, Floresta Amazônica, Cerrado e Floresta Atlântica (Grangeiro *et al.*, 2004; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007). Seu isolamento ocorreu nos bancos de areia do Rio Negro, na região Amazônica e em rios e solos do Parque Nacional da Serra do Cipó (MG) de acordo com Alencar (2016). Diante dessa ampla distribuição, a obtenção de cepa selvagem de *C. violaceum* a partir de água bruta superficial em nascente no município de Jacareí (SP) foi favorecida contribuindo para garantir a amostragem.

De acordo como Guia Nacional de coleta e preservação de amostras da Agência Nacional das Águas (ANA), a coleta de amostras de água superficial é aquela que ocorre entre 0 e 30 centímetros (cm) da lâmina de água em duplicata (BRASIL, 2011). No presente estudo, a coleta de amostras de água bruta foi realizada na sub-superfície da lâmina d'água a uma profundidade de 30 cm.

A coleta de amostras em nascente no município de Jacareí (SP) foi realizada nos períodos seco e chuvoso com temperaturas similares, obtendo-se resultado positivo para o crescimento de colônias individuais com coloração violeta nas amostragens de ambos os períodos, contudo evidenciando maior crescimento de colônias na amostragem realizada no período chuvoso. O mesmo pode ser encontrado no estudo de Alencar (2019), onde a cepa selvagem da bactéria *C. violaceum* foi isolada e identificada em amostras colhidas no período chuvoso em reservatório no semiárido do Rio Grande do Norte, demonstrando assim, que essa condição favorece o isolamento dessa cepa bacteriana em amostras de água. Além das cepas selvagens foi utilizada também a cepa padrão da *C. violaceum* (ATCC 12472) nos estudos de bioprospecção para a biorremediação de metais como ferro, manganês e zinco.

A maioria dos estudos realizados na literatura com a *C. violaceum* utilizam a cepa padrão comercialmente disponível pela *American Type Culture Collection* (ATCC), a qual possui o sequenciamento completo do genoma quando aplicado nas áreas de pesquisa em genômica e proteômica.

Para o isolamento e crescimento bacteriano das colônias de interesse, o meio de cultura PCA foi escolhido por ser um meio seletivo e rico em nutrientes que fornece condições ideais para o crescimento de colônias bacterianas heterotróficas, como a da *C. violaceum*, não exigente em termos de fonte energética para o seu desenvolvimento, apesar da ampla utilização do meio Lauri Bertani (LB) nesse cultivo (Antunes, 2010; Kumar, 2022; Oliveira, 2005; Pitlovancic *et al.*, 2008). Já no trabalho de Alencar (2019), as colônias com aspecto indicativo de *C. violaceum*, com coloração violeta, obtida de amostras de água foi sub-cultivada em Ágar nutriente a 35 ± 2 °C por 24 horas.

No presente estudo, as placas de cultura foram mantidas em estufa bacteriológica a 35 °C por até 72 horas. A temperatura de 35 °C foi determinada para este estudo, pois de acordo com Lacerda, Duarte e Fernande (2016), essa temperatura encontra-se dentro da faixa ideal, entre 20 °C e 37 °C, para o crescimento da cepa bacteriana de *C. violaceum*. O resultado obtido após 48 h de incubação a temperatura de 35 °C foi o crescimento de colônias bacterianas isoladas de coloração violeta indicativas de *C. violaceum* apontadas pelas setas vermelhas nas **Figuras 7 (A e B)**.

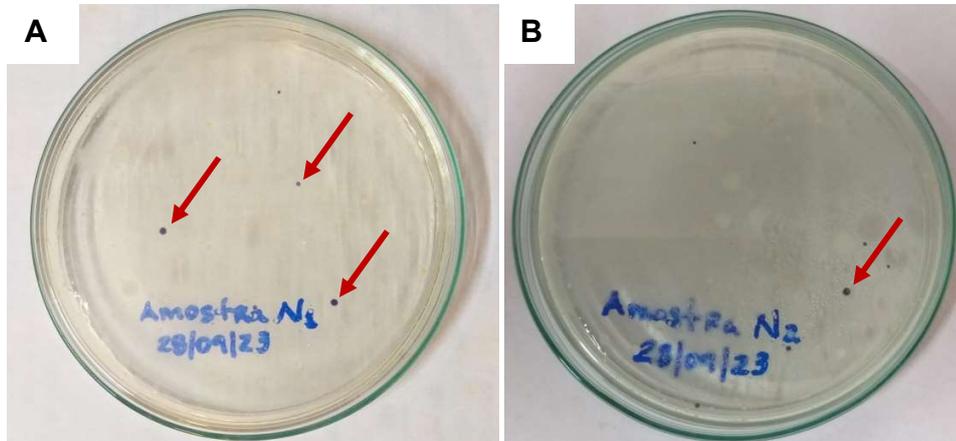


Figura 7 – Crescimento de colônias bacterianas violáceas individuais a partir de amostra de água bruta superficial em meio de cultura PCA, após 48 h em cultivo a 35 °C. **(A)** - Amostra coletada em período chuvoso e **(B)** - Amostra coletada em período seco. **(Fonte:** elaborado pelo autor, 2024).

As colônias de aparência cremosa e com coloração violeta estão presentes em meios de cultura sólidos associado com a síntese do pigmento violaceína, metabólito secundário produzido pela cepa bacteriana *C. violaceum* como sua principal característica (Alencar, 2017). O pigmento violaceína (violeta escuro) é um derivado L-triptofano, proveniente da ativação gênica específica regulada via *quorum sensing* (QS) na *C. violaceum* e que pode ser considerada como parte estratégica na manutenção de vida da colônia bacteriana (Dimitrova, Damyanova, Paunova-Krasteva, 2023; Thornhill *et al.*, 2017).

O processo de *quorum sensing*, comum em bactérias Gram negativas, pode ser entendido como um sistema regulatório auto indutivo com a capacidade de controlar a densidade populacional de microrganismos, além de outras variáveis de caráter fisiológico e fenotípico por meio de uma sinalização bioquímica intracelular de baixo peso molecular (auto indutores) e que também são secretados para o meio extracelular. A presença de moléculas sinalizadoras ligadas ao QS confere indução na produção de violaceína e, essa forma de sinalização celular pode ser influenciada por flutuações ambientais como diferenças de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, entre outros (Oliveira, 2005).

Das colônias individuais de coloração violeta no meio de cultura PCA (**Figuras 7A e B**) procedeu-se a propagação para meio de cultura sólido (PCA) fresco através da técnica de espalhamento ou esfregação com alça bacteriológica, as placas de cultura

foram mantidas em estufa bacteriológica a 35 °C e denominadas como primeira passagem (P1). O resultado observado na P1, após 48 h em estufa, foi o crescimento de colônias bacterianas violetas com aparência cremosa (**Figura 8**), indicativo de colônias de *C. violaceum* podendo ser comparada com a **Figura 3B** (presente no item 3.4.2) e amplamente descrita na literatura como colônias violetas lisas em meios laboratoriais comuns (Dimitrova, Damyanova, Paunova-Krasteva, 2023).



Figura 8 – Primeira passagem (P1) das colônias isoladas após repique por espalhamento e crescimento da *C. violaceum* em meio de cultura PCA, após 48 h em cultivo a 35 °C. (Fonte: elaborado pelo autor, 2024).

5.2 Manutenção da linhagem de *Chromobacterium violaceum*

O método de manutenção a curto prazo por meio da repicagem contínua também conhecido como sub-cultivo é um método simples e tradicional que leva em consideração o repique para novo meio de cultura com intervalo condizente e definido para o microrganismo em estudo e a transferência deve ser realizada antes que o substrato do meio seja completamente utilizado pela bactéria, ou então, que se desidrate e, diante da constante manipulação pode contribuir com a perda de características genéticas decorrente de mutações (Sola *et al.*, 2012).

No presente estudo, as colônias individuais de *C. violaceum* foram mantidas a curto prazo por meio de requipes contínuos da cepa primária selvagem em meios de cultura sólidos (PCA e Ágar-peptona) até a passagem 10 (P10) mantidas sob as mesmas condições experimentais. Cada repique, em triplicata, nos meios sólidos PCA e Ágar-peptona foi armazenado em estufa bacteriológica a 35 °C e sub-cultivada a cada 96 h a

168 h. Durante o período de cultivo e manutenção foi realizada observação diária das condições de crescimento bacteriano nas placas de cultura sendo, a partir disso, definido o melhor período para a transferência por repique, de acordo com Sola *et al.* (2012).

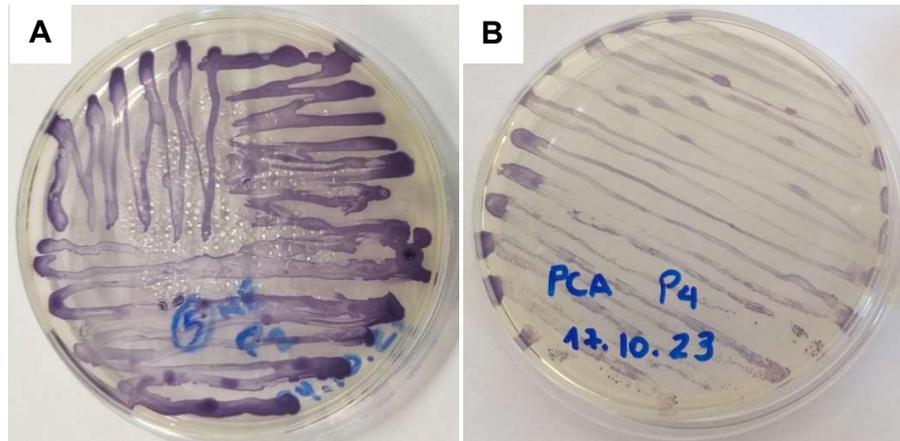


Figura 9 – Repique por esfregaço para manutenção das colônias da *C. violaceum* a curto prazo em meios de cultura sólidos após 96 h em cultivo a 35 °C. **(A)** - Segunda passagem (P2) e **(B)** – Quarta passagem (P4). (Fonte: elaborado pelo autor, 2024).

Neste estudo foi observado que a coloração violácea correspondente ao repique de segunda passagem (P2), **Figura 9A**, mostrou-se um pouco menos intensa quando comparada com a P1 (**Figura 8**). O mesmo foi encontrado no trabalho de Lima-Bittencourt (2007) que constatou variações na intensidade da pigmentação violeta do estágio inicial ao longo das sub-culturas do isolado de *C. violaceum*. O padrão de variação na intensidade da coloração violeta das colônias de *C. violaceum* também foi observado a partir do repique da quarta passagem (P4) ilustrado pela **Figura 9B** quando comparada com os estágios iniciais, possivelmente, em decorrência de mudanças na regulação da expressão gênica responsável pela síntese do pigmento violaceína, o que pode ser esperado, pois se sabe que taxas de mutações espontâneas em bactérias são elevadas (Abreu; Tutunji, 2004).

Outro aspecto acerca dessa variabilidade na expressão e intensidade do pigmento violaceína foi relatado em Kumar (2022) podendo advir da regulação via QS, de ocorrência natural e característica de bactéria Gram-negativas, como mecanismo de comunicação entre as células bacterianas por meio de moléculas auto-indutoras secretadas no meio ambiente. Na *C. violaceum*, o QS é mediado por genes homólogos que regulam uma variedade de fenótipos, tais como o pigmento violaceína, a virulência e

a formação de biofilme, os quais são mecanismos adaptativos e de competição entre múltiplas espécies presentes no meio ambiente, principalmente, quando os nutrientes são limitados (Hungria *et al.*, 2004; Kumar, 2022; Pitlovancic *et al.*, 2008).

E, por fim, a possível ocorrência de sutis alterações ou variações nas condições experimentais controladas, na condição de aerobiose e naquelas menos adversas ou mais favoráveis do que as encontradas no meio ambiente, bem como pelas sucessivas manipulações da cepa durante o curto período de propagação e manutenção da linhagem bacteriana em meios de cultura sólidos também puderam contribuir para explicar a variação ocorrida na intensidade da coloração violeta nas colônias de *C. violaceum*, além das supracitadas.

5.3 Avaliação dos meios de cultura sólidos PCA e Ágar-peptona

No presente trabalho foi proposta a avaliação de dois meios de cultura sólidos: PCA e Ágar-peptona para o crescimento e manutenção das colônias de *C. violaceum* a curto prazo.

Antunes (2006) estudou treze linhagens de *C. violaceum* que foram cultivadas em diferentes meios de cultura e o Luria Bertani (LB), frequentemente utilizado contendo fonte proteica (triptona ou peptona) em sua composição, dentre outros avaliados, apresentou o melhor resultado quando suplementado com glicose que é utilizada como principal fonte de energia. Além disso, foi relatado o crescimento tanto de colônias brancas quanto violetas a depender da linhagem. Sendo assim, os resultados positivos obtidos no presente estudo confirmam a possibilidade de cultivar e manter por repiques contínuos a cepa selvagem de *C. violaceum* preservando a coloração violeta nos meios PCA e Ágar-peptona (**Figuras 10 - A e B**) em substituição ao meio LB sem apresentar diferenças significativas, principalmente entre os meios propostos mesmo na passagem 9 (P9).

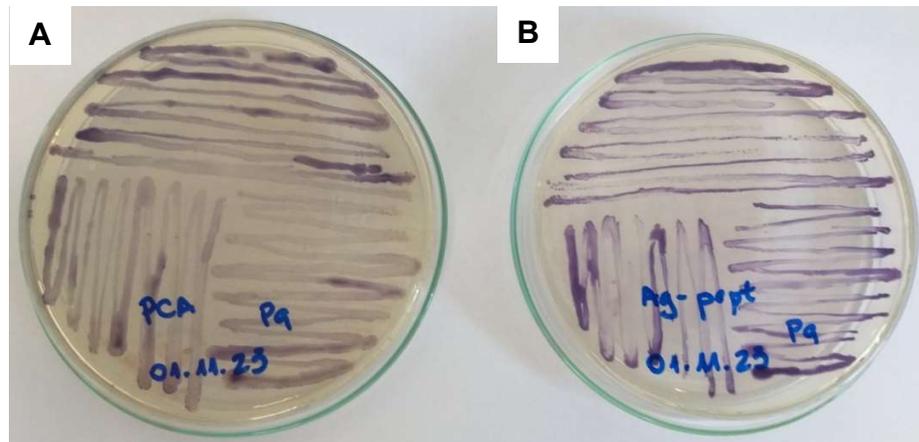


Figura 10 – Crescimento e manutenção das colônias de *C. violaceum* com pigmentação violácea em nona passagem (P9), após 96 h de cultivo a 35 °C. **(A)** – Meio de cultura sólido PCA e **(B)** – Meio de cultura sólido Ágar-peptona. **(Fonte:** elaborado pelo autor, 2024).

No mercado existe uma diversidade de meios de cultura disponíveis para atender a diferentes condições exigidas pelos microrganismos que favoreçam o seu crescimento. Na literatura, o meio de cultura LB é amplamente utilizado para o crescimento das colônias de *C. violaceum*, sendo constituído por cloreto de sódio, ágar, extrato de levedura e uma fonte proteica como a peptona ou triptona fornecendo os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Outro meio de cultura, o Ágar-caldo médio (*Agar-Broth medium*) constituído por extrato de carne e peptona foi descrito para o crescimento de cepa liofilizada de *Chromobacterium violaceum* Bergonzini (ATCC 12472™) adquirida comercialmente pelo banco de células bacterianas da ATCC conforme instruções próprias.

Apesar de outros meios de cultura serem utilizados, no presente estudo constatou-se o crescimento positivo da *C. violaceum* em ambos os meios de cultura propostos: no PCA, comercialmente disponível, contendo glicose ou dextrose em sua composição e no Ágar-peptona preparado no laboratório, o qual contém apenas fonte proteica, isso em razão dessa bactéria heterotrófica não ser exigente em termos de fonte de energia. Importante ressaltar que em condição aeróbia a *C. violaceum* utiliza açúcares como frutose, galactose, ribose e glicose e, ainda é capaz de utilizar lipídeos e aminoácidos como suplementos energéticos (Casagrande, 2022; Oliveira, 2005). Dessa forma, os dois meios de cultura sólidos, PCA e Ágar-peptona, meios simples e de fácil preparação,

utilizados no presente estudo forneceram os nutrientes essenciais para o crescimento da *Chromobacterium violaceum*.

5.4 Coloração de Gram

A coloração de Gram é um método clássico e direto para determinar diferencialmente se as cepas bacterianas em estudo se classificam como Gram positivas ou Gram negativas. De forma resumida, as bactérias classificadas como Gram positivas apresentam uma parede celular formada por uma camada espessa de peptidoglicanos, a qual irá reter os cristais formados pelo complexo violeta-iodeto (dos compostos corante Violeta Genciana Funicada e Lugol utilizados na coloração) resultando em coloração roxa/violeta ou Gram negativas, que apresentam uma fina camada de peptidoglicanos em sua parede recoberta por lipopolissacarídeos, a qual não é capaz de reter os cristais formados, resultando na coloração rosa/vermelho em função da contra coloração por Fuscina funicada (Tortora; Funke; Case, 2017).

A observação da coloração final obtida na lâmina foi vista sob microscópio óptico na objetiva de imersão de 100x.

Dentro do presente estudo, as lâminas com esfregaço de *C. violaceum* na passagem inicial, coradas conforme o método descrito no item 4.7 foram visualmente avaliadas no microscópio óptico resultando em uma coloração rosácea (**Figura 11**), compatível com Gram negativo e condizente com a classificação presente na literatura e na ATCC.

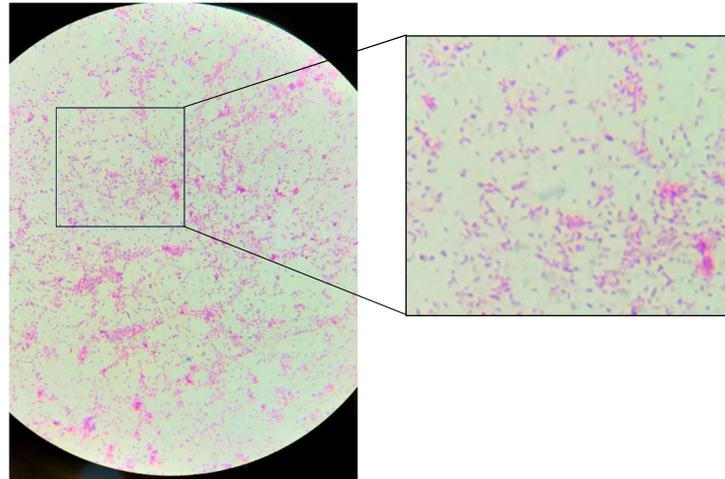


Figura 11 – Coloração de Gram da *C. violaceum* em objetiva de imersão de 100x apresentando coloração rosácea. (Fonte: elaborado pelo autor, 2024).

Outro meio para se identificar a cepa bacteriana em estudo e classificá-la como Gram negativa foi descrita por Alencar (2016), onde isolados bacterianos foram submetidos à identificação pelo sistema automatizado VITEKII sendo suspensas em solução salina estéril em tubo de ensaio, com turvação correspondente a 0,5 na escala de *MacFarland*. Na sequência, procedeu-se com a identificação automatizada das cepas isoladas após sua inoculação em cartelas plásticas específicas, destinadas a identificação de bacilos Gram negativos.

Além disso, em Alencar (2020) e Pitlovancic *et al.* (2008), o pigmento violaceína foi isolado e lido por absorvância em espectrofotometria, pois possui elevado coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,7 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em comprimento de onda (λ) de 570 nm possibilitando uma inferência indireta para identificação da cepa bacteriana, em função desse pigmento ser expresso pela *Chromobacterium violaceum*.

5.5 Congelamento de amostras de *Chromobacterium violaceum*

Como cada microrganismo apresenta peculiaridades intrínsecas, a escolha da forma de manutenção a médio e longo prazo deve basear-se na avaliação das características fenotípicas, no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação, bem como nas vantagens e desvantagens de cada método buscando-se simplicidade, não requerimento de equipamentos sofisticados, baixo custo, rapidez de

execução e elevado grau de eficiência (Abreu; Tutunji, 2004; Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012).

A criopreservação é uma técnica de preservação a longo prazo muito eficiente, podendo manter viável por anos os microrganismos em temperaturas baixas (entre -20 °C (freezer) e -196 °C (nitrogênio líquido)). Nessa técnica utiliza-se crioprotetores, moléculas de baixo peso molecular e alta solubilidade em meio aquoso, que são adicionados ao meio com a função de evitar a formação de cristais de gelo decorrente do congelamento protegendo a célula bacteriana de possíveis danos a parede celular. Os principais crioprotetores intracelular ou penetrante são o glicerol, metanol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO) (Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012). Em Oliveira *et al.* (2023) relatou-se que as bactérias Gram negativas foram estocadas em caldo *Brain Heart Infusion* acrescido de glicerol (20%) e mantidos em freezer a -20 °C por quatro anos. Após esse período a viabilidade foi avaliada a partir da reativação das cepas em meio de cultura sólido (*Müller Hinton*) e a confirmação pelo crescimento de colônias nas placas. A taxa de viabilidade para bactérias Gram negativas foi de 84,5%.

Neste trabalho, as amostras isoladas de *C. violaceum* foram preparadas para congelamento conforme protocolo descrito no item 4.9. O resultado do processo de centrifugação foi à formação de *pellets* bacterianos violeta antes da ressuspensão realizada com os meios de congelamento propostos M1 contendo em sua composição glicerol 20% e soro (**Figura 12A**) e M2 constituído por glicerol 10% (**Figura 12B**). Ao final do procedimento, os criotubos contendo as amostras foram congelados a temperatura de -20 °C considerando-se o método de manutenção de médio prazo por 3 a 6 meses.

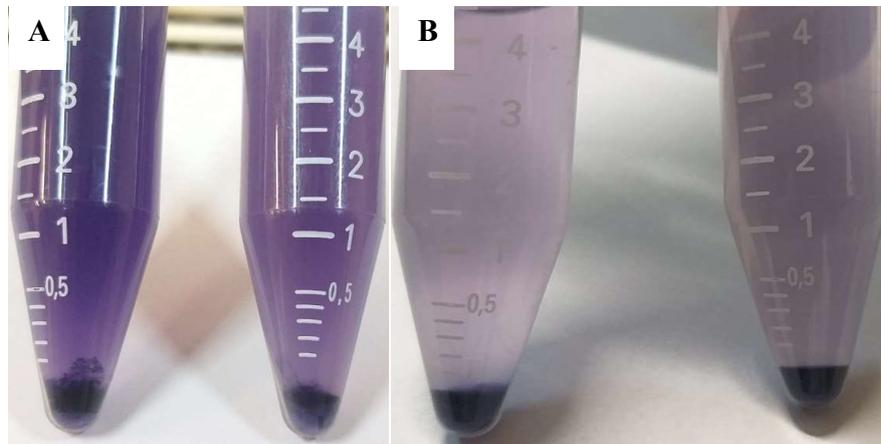


Figura 12 – *Pellets* formados da *C. violaceum* em meios de congelamentos após centrifugação. **(A)** - M1 com glicerol 20% e **(B)** - M2 com glicerol 10%. **(Fonte:** elaborado pelo autor, 2024).

Em razão do processo de centrifugação das amostras de *C. violaceum* para a formação dos *pellets* observou-se a presença de uma coloração violeta no sobrenadante em razão da presença do pigmento violaceína solubilizada no meio de congelamento. Isso pode ser considerado, pois a violaceína é um pigmento solúvel em álcoois como o etanol e, conseqüentemente, o glicerol conforme descrito em Antunes (2010).

O glicerol é um crioprotetor amplamente utilizado por ter um custo relativamente baixo, ser eficaz e bioquimicamente compatível com estruturas celulares e ser menos tóxico do que outros crioprotetores. Estudos recomendam que a concentração segura seja de 10% a no máximo 20%, pois acima pode ser nocivo aos microrganismos (Abreu; Tutunji, 2004; Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012). O glicerol utilizado nos meios de congelamento propostos no presente estudo nas concentrações de 10% (M2) e 20% (M1) atendem ao descrito na literatura, além disso, pode ter contribuído para a solubilização parcial do pigmento violaceína no sobrenadante e, possivelmente não gerando interferência direta no processo de congelamento.

Durante o processo de congelamento é importante considerar o ponto de equilíbrio, ou seja, o tempo de exposição da célula bacteriana ao agente crioprotetor antes do congelamento devendo ser em torno de 15 minutos e não ultrapassando 45 a 60 minutos devido à toxicidade oferecida pelo crioprotetor em temperatura ambiente (Abreu; Tutunji, 2004), sendo respeitado durante o procedimento experimental.

Outro ponto relevante é que a correta preservação das cepas bacterianas se torna fundamental para evitar contaminações e mutações, podendo levar à perda das

características morfológicas, fisiológicas e genéticas das bactérias, além de manter a viabilidade celular bacteriana (Castro *et al.*, 2020; Sola *et al.*, 2012).

Portanto, o meio de congelamento a médio/longo prazo permite que a linhagem selvagem de *C. violaceum* obtida em nascente no município de Jacareí-SP e isolada possa fazer parte de um Banco de Culturas do laboratório de Microbiologia da Instituição de Ensino Superior (FATEC Jacareí – Prof. “Francisco de Moura”), de tal monta a possibilitar que trabalhos sejam desenvolvidos em diferentes frentes, processos e aplicações biotecnológicas.

5.6 Descongelamento, análise da viabilidade da *Chromobacterium violaceum* e expressão de violaceína

O descongelamento de duas amostras de *C. violaceum* sob temperatura de -20 °C nos meios de congelamento M1 (glicerol 20%) e M2 (glicerol 10%) foi realizado após um período de 60 dias, conforme protocolo descrito no item 4.10.

Durante os processos de congelamento e descongelamento pode ocorrer crioinjúria ou lesão celular, processo letal relacionado à formação de extensos cristais de gelo intracelular capazes de alterar as estruturas da membrana plasmática, além de modificar o fluxo de água para o meio extracelular (desidratação) e aumentar a concentração intracelular de solutos, principalmente, na ausência de agentes crioprotetores (Sola *et al.*, 2012).

Algumas variantes devem ser consideradas na recuperação das amostras congeladas, tais como a temperatura de incubação, pH, composição do meio de cultura utilizado para o cultivo e recuperação da amostra, além da técnica utilizada no momento de descongelamento (Oliveira *et al.*, 2023; Sola *et al.*, 2012).

O descongelamento das amostras criopreservadas no presente estudo foi realizado em banho maria a 35 °C, em consonância com os resultados encontrados em Oliveira *et al.* (2023) e Sola (2012) que relataram acerca do descongelamento rápido em banho-maria a 37 °C parecer ser mais eficaz para a restauração das amostras quando comparada ao processo lento em temperatura ambiente e, em contrapartida, outro estudo recomenda o descongelamento a temperatura ambiente (Brumano *et al.*, 2011). Portanto, parece não haver um consenso quanto ao processo de descongelamento a ser utilizado,

rápido ou a temperatura ambiente, para a restauração e viabilidade das amostras bacterianas criopreservadas.

Neste estudo, após o descongelamento rápido das amostras criopreservadas de *C. violaceum* dos meios de congelamento M1 (**Figura 13A**) e M2 (**Figura 13B**), foi realizada semeadura por espalhamento, em triplicata, nas placas com meios de cultura PCA (**Figuras 13 – A1; B1**) e Ágar-peptona (**Figuras 13 – A2; B2**), cultivadas em estufa bacteriológica a 35 °C por até 72 h para avaliação da recuperação e crescimento das colônias de *C. violaceum*.

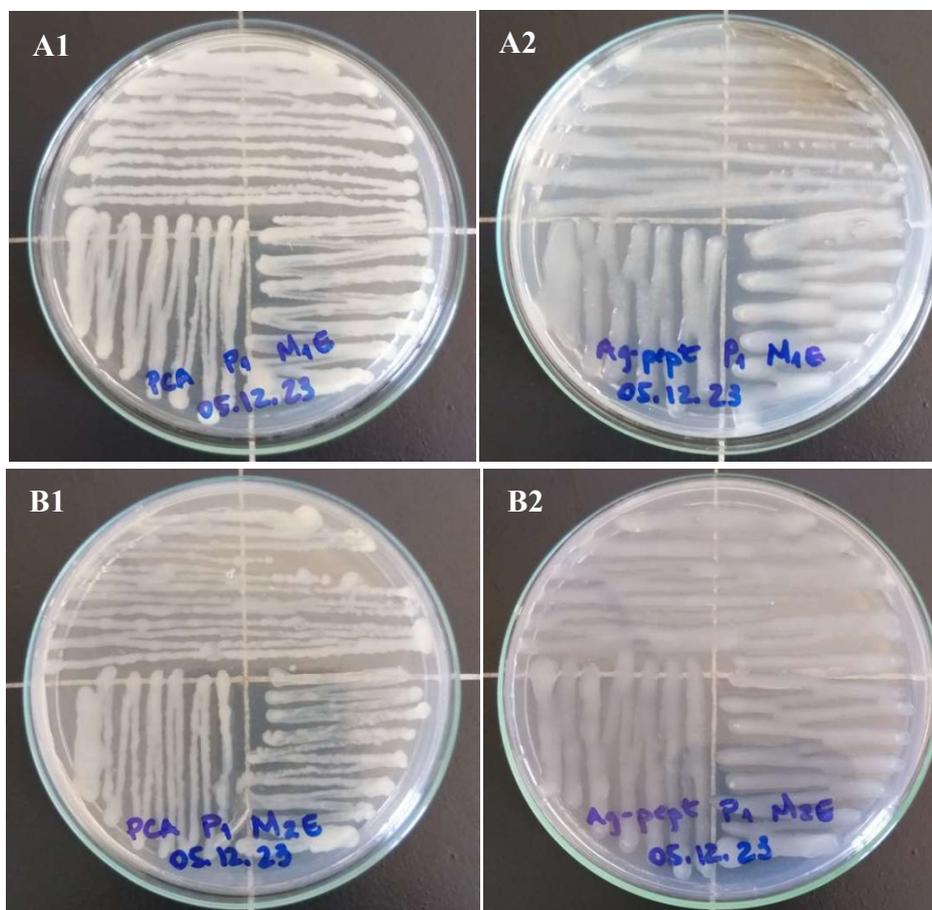


Figura 13 – Descongelamento de amostras dos meios de congelamento. (A) - M1 e (B) - M2 de *C. violaceum*, após 60 dias de criopreservação (-20 °C). Semeaduras por espalhamento nos meios de cultura PCA (**A1; B1**) e Ágar-peptona (**A2; B2**), após 72 h em cultivo a 35 °C. (**Fonte:** elaborado pelo autor, 2024).

A viabilidade bacteriana consiste na capacidade de reprodução e crescimento das culturas (Abreu; Tutunji, 2004) e o resultado experimental obtido foi positivo para as amostras descongeladas dos dois meios de congelamento propostos, M1 e M2, após

72 h em cultivo a 35 °C não havendo diferenças significativas quanto à viabilidade das colônias de *C. violaceum*, apesar da não expressão significativa visualmente detectada do pigmento violaceína. As duas concentrações de glicerol 10% e 20% utilizadas nos meios de congelamento deste estudo foram capazes de preservar e favorecer a manutenção da viabilidade celular pela minimização da crioinjúria. Esse resultado foi observado pela recuperação e crescimento de colônias bacterianas de aspecto cremoso liso, porém esbranquiçada devido a não visualmente significativa produção de violaceína que confere coloração violeta as colônias, característica marcante dessa cepa bacteriana (**Figuras 13 - A e B**).

Na literatura, Antunes (2010) relata a possibilidade de existência de linhagens ou variantes que não produzam o pigmento violaceína e, também linhagens não-pigmentadas que representam apenas 9% do total existente no meio ambiente sendo, portanto, raras.

Na avaliação do descongelamento dos isolados preservados a -20 °C em meio de cultura sólido não foi detectada visualmente a expressão significativa da pigmentação violeta típica da *C. violaceum*, possivelmente, em função de alguma mudança fisiológica ocasionada por interferência durante o processo de criopreservação, da temperatura de retomada do cultivo e/ou choque de temperatura inerente ao próprio processo, entre outros. Oliveira (2005) relata em seu estudo que a *C. violaceum* produz o pigmento violaceína sob condições de aerobiose quando a temperatura do meio estiver em torno de 30 °C e na presença de açúcares simples e glicerol como fontes de carbono que favorecem a produção de metabólitos secundários em bactérias, bem como no estudo de Pitlovancic *et al.* (2008). Assim, a aplicação da temperatura de 35 °C no presente estudo, após o processo de congelamento e descongelamento, também pode ser um fator dentro da faixa ideal considerada pela literatura para o crescimento da *C. violaceum* e na expressão/produção do pigmento violaceína. Apesar disso, os estudos na literatura não apresentam um consenso acerca da faixa ou da temperatura mais favorável à produção de violaceína após criopreservação de linhagens selvagens de *C. violaceum*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da atual problemática de contaminação do meio ambiente com metais pesados e suas implicações na saúde dos seres vivos, a biorremediação utilizando a bactéria *Chromobacterium violaceum* tem-se tornado mais evidente por suas características fenotípicas de resistência e adaptabilidade frente a esses elementos químicos, possibilitando diversas aplicações biotecnológicas.

Os resultados observados nesse estudo mostram-se promissores, quanto ao isolamento de uma cepa primária selvagem de *C. violaceum* a partir de amostra de água bruta em nascente no município de Jacarei (SP) conferindo, assim, a possibilidade de novas amostragens, além do cultivo em meio comercialmente disponível, da manutenção por criopreservação e da viabilidade bacteriana pós-descongelamento, sumarizadas a seguir:

- O crescimento e isolamento de colônia individual de coloração violácea no meio de cultura PCA foi mais favorável na amostragem realizada no período chuvoso;
- Os meios de culturas sólidos PCA e Ágar-peptona demonstraram-se funcionais para o crescimento e manutenção da *C. violaceum*;
- A manutenção de colônias de *C. violaceum* a curto prazo por meio de requipes contínuos mostrou-se um método viável e mantenedor das principais características bacterianas;
- Os meios de congelamento M1 e M2 não mostraram diferenças significativas, sendo eficientes na manutenção da viabilidade da cepa primária selvagem de *C. violaceum*;
- O método de descongelamento apresentou-se satisfatório quanto à recuperação da viabilidade bacteriana, contudo não houve a expressão visualmente detectável do pigmento violaceína durante o período de cultura estabelecido neste estudo e nos meios de cultura sólidos utilizados.

Considerando-se a relevância e potencial deste estudo, futuras propostas experimentais podem vir a dar continuidade à padronização do processo de

criopreservação da *C. violaceum*, de tal monta a favorecer a expressão e produção do pigmento violaceína pós-descongelamento.

E, por fim, que as amostras criopreservadas da cepa selvagem de *C. violaceum* constituam um banco de material bacteriano disponível para a Faculdade de Tecnologia de Jacareí – Prof. Francisco de Moura, vindo a contribuir para o desenvolvimento de projetos tecnológicos na área de biorremediação de metais pesados tóxicos ao meio ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.M.V; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 236-51, 2004. DOI: 10.5102/ucs.v2i2.535. Disponível em: <https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/view/535>. Acesso em: 30 out. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil); COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Guia Nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília, DF: ANA; São Paulo: CETESB, 2011. 327p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/publicacoes/guia-nacional-coleta-2012.pdf>. Acesso em: 10 out. 2023.
- ALENCAR, Felipe Lacerda Souza. **Bioprospecção da *Chromobacterium violaceum* para a biorremediação do chumbo: aplicações em biotecnologia e educação em saúde**. 2020. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Associação Plena em Rede, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.
- ALENCAR, Felipe Lacerda Souza. **Atividade biorremediadora de *Chromobacterium violaceum* a metais pesados em ambientes aquáticos no semiárido brasileiro: ações para vigilância ambiental e educação em saúde**. 2016. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.
- ALENCAR, F. L. S.; NASCIMENTO, E. D.; CORSO, G.; ARAÚJO, M. F. F. Water quality in the Brazilian semi-arid: bioprospecting of *Chromobacterium violaceum* for metal bioremediation. **Gaia Scientia**, [s.l.], v. 13, n. 4, 2019. DOI: 10.22478/ufpb.1981-1268.2019v13n4.41420. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/view/41420>. Acesso em: 15 out. 2023.
- ALENCAR, F.L.S.; NAVONI, J.A.; AMARAL, V.S. The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, [s.l.], v.24, p. 16545-559, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-9129-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9129-8>. Acesso em: 15 set. 2023.
- ANTUNES, Adriana Almeida. ***Chromobacterium violaceum*: caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato - PHA**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- ANTUNES, Adriana Almeida. **Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios de alternativos**

de baixo custo. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

AYANGBENRO, A.S.; BABALOLA, O.O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v.14, n.94, p. 1-16, 2017. DOI: 10.3390/ijerph14010094. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/14/1/94>. Acesso em: 12 março 2024.

BHATTACHARYA, A.; NAIK, S.N.; KHARE, S.K. Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB 19 for remediation of heavy metal cadmium (II). **Journal of Environmental Management**, [s.], v.215, p. 143-52, 2014. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.03.055. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479718302822>. Acesso em: 09 set. 2023.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências - Alterada pelas Resoluções CONAMA nº 393/2007, nº 397/2008, nº 410/2009 e nº 430/2011. Brasília: DF, 2005. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Acesso em: 18 out. 2023.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Brasília: DF, 2011. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=114770>. Acesso em: 18 out. 2023.

BURAK, D.L.; FONTES, M.P.F.; SANTOS, N.T.; MONTEIRO, L.V.S.; MARTINS, E.S.; BECQUER, T. Geochemistry and spatial distribution of heavy metals in Oxisols in a mineralized region of the Brazilian Central Plateau. **Geoderma**, [s.], v.160, p. 131-42, 2010. DOI: 10.1016/j.geoderma.2010.08.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016706110002521>. Acesso em: 09 set. 2023.

BRUMANO, L.P.; ÂNGELO, F.F.; AMARAL, L.H.; PINTO, C.L.O.; ALMEIDA, J.A.; PINTO, M.A.O. Estirpes bacterianas-padrão, formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratórios de ensino e pesquisa. **Geoderma**, [s.], v.3, n. único, p. 21-26, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/riee/article/view/23984>. Acesso em: 02 abr. 2024.

CASAGRANDE, Camila. **Padronização da quantificação de violaceína produzida por *Chromobacterium violaceum* através de métodos colorimétricos.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2022.

CASTRO, H.C.; CHAGAS, E.F.; LIBERAL, M.H.T.; CARDOSO, C.V.; BARBOSA, E.V.; MAGALHÃES, H. Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, [s.l.], v.3, n.1, p.143-56, 2020.

Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/7018>. Acesso em: 6 março 2024.

CAREPO, M.S.P.; AZEVEDO, J.S.N.; PORTO, J.I.R.; BENTES-SOUSA, A.R.; BATISTA, J.S.; SILVA, A.L.C.; SCHNEIDER, M.P.C. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. **Genet. Mol. Res.**, [s.l.], v.3, n.1, p.181-94, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100998/>. Acesso em: 08 out. 2023.

CHEN, Y.; ZHU, Q.; DONG, X.; HUANG, W.; DU, C.; LU, D. How *Serratia marcescens* HB-4 absorbs cadmium and its implication on phytoremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v.185, p. 109723, 2019. DOI:

10.1016/j.ecoenv.2019.109723. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319310541>. Acesso em: 09 set. 2023.

CRISTIANI, M.; NACCARI, C.; NOSTRO, A.; PIZZIMENTI, A.; TROMBETTA, D.; PIZZIMENTI, F. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). **Environ. Sci. Pollut. Res.**, [s.l.], v.19, p. 161-8, 2012. DOI: 10.1007/s11356-011-0539-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-011-0539-8>. Acesso em: 09 set. 2023.

DALL'AGNOL, L.T.; MARTINS, R.N.; VALLINOTO, A.C.R.; RIBEIRO, K.T.S. Diversity of *Chromobacterium violaceum* isolates from aquatic environments of state of Pará, Brazilian Amazon. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 103, n. 7, p. 678-82, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/LJ38dp6vczx8FZmzGCZNkbh/>. Acesso em: 14 out. 2023.

DIMITROVA, P.D.; DAMYANOVA, T.; PAUNOVA-KRASTEVA, T. *Chromobacterium violaceum*: a model for evaluating the anti-quorum sensing activities of plant substances. **Sci. Pharm.**, [s.l.], v.91, n.33, p. 1-20, 2023. DOI: 10.3390/scipharma91030033. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-0532/91/3/33>. Acesso em: 22 jan. 2024

DIXIT, R.; WASIULLAH; MALAVIYA, D.; PANDIYAN, K.; SINGH, U.B.; SAHU, A.; SHUKLA, R.; SINGH, B.P.; RAI, J.P.; SHARMA, P.K.; LADE, H.; PAUL, D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability**, [s.l.], v.7, n.2, p. 2189-2212, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/su7022189>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/7/2/2189>. Acesso em: 10 out. 2023.

DUFFUS, J.H. “Heavy metals” – a meaningless term? **Pure Appl. Chem.**, [s.l.], v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002. Disponível em:

<https://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0793.pdf>. Acesso em 18 abr. 2024.

GAAD, G.M. Metal, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation.

Microbiology, [s.l.], v. 156, p. 609-43, 2010. DOI: 10.1099/mic.0.037143-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20019082/>. Acesso em: 14 out. 2023.

GAAD, G.M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v.11, p. 271-9, 2000. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00095-1). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166900000951>. Acesso em: 15 out. 2023.

GRANGEIRO, T.B.; JORGE, D.M.M.; BEZERRA, W.M.; VASCONCELOS, A.T.R.; SIMPSON A.J.G. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genet. Mol. Res.**, [s.l.], v.3, n.1, p.117-33, 2004. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100993/>. Acesso em: 18 out. 2023.

HASSAAN, M.A.; NEMR, A.E.; MADKOUR, F.F. Environmental Assessment of Heavy Metal Pollution and Human Health Risk. **American Journal of Water Science and Engineering**, [s.l.], v. 2, n.3, p.14-9, 2016. DOI: 10.11648/j.ajwse.20160203.11.

Disponível em:

<https://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=369&doi=10.11648/j.ajwse.20160203.11>. Acesso em: 08 out. 2023.

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M.F.; GUIMARÃES, C.T.; JARDIM, S.N.; GOMES, E.A.; VASCONCELOS, A.T.R. Tolerance to stress and environmental adaptability of

Chromobacterium violaceum. **Genet. Mol. Res.**, [s.l.], v.3, n.1, p.102-116, 2004.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100992/>. Acesso em: 18 out. 2023.

KUMAR, S. Effect of isoflavones as antibacterial and anti-quorum sensing agents against *Chromobacterium violaceum*. **J. Adv. Sci. Res.**, [s.l.], v.13, n.2, p. 54-9, 2022.

DOI: 10.55218/JASR.202213208. Disponível em: <https://sciensage.info>. Acesso em: 02 março 2024.

LACERDA, F.S.A.; DUARTE, E.N.; FERNANDE, M.F.A. Microbiology for environmental conservation: a systematic review of bioremediation of heavy metals by

Chromobacterium violaceum. **Gaia Scientia**, [s.l.], v.10, n.4, p. 408-23, 2016. DOI:

<http://dx.doi.org/10.21707/gaia.v10.n04a32>. Disponível em:

<https://periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/download/29306/17687/>. Acesso em: 22 set. 2023.

LIMA-BITTENCOURT, C.I.; ASTOLFI-FILHO, S.; CHARTONE-SOUZA, E.; SANTOS, F.R.; NASCIMENTO, A.M.A. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from

different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiology**, [s.l.], v.7, p. 1-9, 2007. DOI:

10.1186/1471-2180-7-58. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-7-58>. Acesso em: 14 out. 2023.

MUDGAL, V.; MADAAN, N.; MUDGAL, A.; SINGH, R.B.; MISHRA, S. Effect of toxic metals on human health. **The Open Nutraceuticals Journal**, [s.l.], v.3, p. 94-9, 2010. Disponível em: <https://benthamopen.com/contents/pdf/TONUTRAJ/TRONUTAJ-3-94.pdf>. Acesso em: 09 out. 2023.

NOGUEIRA, J.M.R.; MIGUEL, L.F.S. **Bacteriologia**. Cap. 3. *In: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. p. 221-397. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/15170/cap3.pdf?sequence=2>. Acesso em: 20 out. 2023.

OLIVEIRA, Cristiana Gomes. **Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum***. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, L.S.; LOPES, M.S.M.; PENATTI, M.P.A.; RÖDER, D.V.D.B.; MENEZES, R.P. Avaliação da viabilidade de bactérias estocadas em caldo BHI- glicerol a -20 °C há quatro anos. **RECIMA 21**, [s.l.], v. 4, n. 9, p. e493900, 2023. DOI: 10.47820/recima21.v4i9.3900. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/3900>. Acesso em: 28 out. 2023.

PRABHAKARAN, D.C.; KRISHNAN, S.; RAMAMURTHY, P.C.; SIVRY, Y.; QUANTIN, C.; SUBRAMANIAN, S. Utility of *Chromobacterium violaceum* SUK1a, an indigenous bacterial isolate for the bioremediation of Cr(VI). **Psysicochem. Probl. Miner. Process.**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 1266-81, 2018. DOI: 10.5277/ppmp18185. Disponível em: <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-ef16210c-b41c-40ee-b3bf-c293cfa113f7>. Acesso em: 17 maio 2024.

PITLOVANCIV, A.K.; CARIS, M.E.; PORTO, L.M.; PEDROSA, R.C.; ANTÔNIO. R.V. Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*. **Biotemas**, [s.l.], v.19, n.1, p.13-8, 2008. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21239>. Acesso em: 16 out. 2023.

SHARMA, P.; PANDEY, A.K.; KIM, S-H.; SINGH, S.P.; CHATUVERDI, P.; VARJANI, S. Critical review on microbial community during *in-situ* bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. **Environmental Technology & Innovation**, [s.l.], v. 24, p. 101826, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352186421004740>. Acesso em: 20 dez. 2023.

SINGH, R.; SINGH, D.P.; KUMAR, N.; BHARGAVA, S.K. BARMAN, S.C. Accumulation and translocation of heavy metals in soil and plants from fly ash contaminated area.

Journal of Environmental Biology, [s.l.], v.31, p. 421-30, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/D-P-Singh-3/publication/49710240_Accumulation_and_translocation_of_heavy_metals_in_soil_and_plants_from_fly_ash_contaminated_area/links/00b7d518f54fd01234000000/Accumulati on-and-translocation-of-heavy-metals-in-soil-and-plants-from-fly-ash-contaminated-area.pdf. Acesso em: 14 out. 2023.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; MINAFRA E REZENDE, C.S. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, [s.l.], v.8, n.14, p. 1938-1418, 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>. Acesso em: 21 out. 2023.

SREEDEVI, P.R.; SURESH, K.; JIANG, G. Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: a review of process and applications. **J. Water Proces. Engineering**, [s.l.], v. 48, p. 102884, 2022. DOI: 10.1016/j.jwpe.2022.102884. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214714422003282>. Acesso em: 15 nov. 2023.

SUMAMPOUW, O.F.; RISJANI, Y. Bacteria as Indicators of Environmental Pollution: Review. **International Journal of Ecosystem**, [s.l.], v.4, n.6, p. 251-8, 2014. DOI: 10.5923/j.ije.20140406.03. Disponível em: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ije.20140406.03.html>. Acesso em: 08 set. 2023.

THORNHILL, S.G.; KUMAR, M.; VEJA, L.M.; McLEAN, R.J.C. Cadmium íon inhibition of quorum signalling in *Chromobacterium violaceum*. **Microbiology**, [s.l.], v. 163, p. 1429-35, 2017. DOI: 10.1099/mic.0.000531. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000531#tab2>. Acesso em: 18 jan. 2024.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

YU, G.; WANG, G.; LI, J.; CHI, T.; WANG, S.; PENG, H.; CHEN, H.; DU, C.; JIANG, C.; LIU, Y.; ZHOU, L.; WU, H. Enhanced Cd²⁺ and Zn²⁺ removal from heavy metal wastewater in constructed wetlands with resistant microorganisms. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 316, p. 123898, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123898. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852420311706>. Acesso em: 08 abr. 2024.