



**GUSTAVO MAGNO DOS REIS FERREIRA**

**POTENTIAL USE OF *Serratia marcescens* CCMA 1010 IN  
BIOSORPTION OF TOXIC METALS**

**LAVRAS - MG**

**2018**

**GUSTAVO MAGNO DOS REIS FERREIRA**

**POTENTIAL USE OF *Serratia marcescens* CCMA 1010 IN BIOSORPTION OF  
TOXIC METALS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ferreira, Gustavo Magno dos Reis.

Potential use of *Serratia marcescens* CCMA 1010 in  
biosorption of toxic metals / Gustavo Magno dos Reis Ferreira -  
2018.

91 p. : il.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. Biorremediação. 2. Bioissorção. 3. Metais pesados. 4.  
Bactéria I. Batista, Cristina Ferreira Silva. II. Título.

**GUSTAVO MAGNO DOS REIS FERREIRA**

**POTENTIAL USE OF *Serratia marcescens* CCMA 1010 IN BIOSORPTION OF TOXIC METALS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

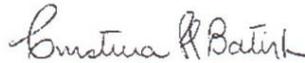
APROVADA em 22 de março de 2018.

Dra. Maria Clara Costa – UALG/CCMAR

Dr. Jorge Daniel Dias Carlier - CCMAR

Dra. Rosane Freitas Schwan - UFLA

Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedroso Miguel - UFLA



Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2018**

Aos meus pais Carlos Magno e Maria Goreti, minha família e meus cachorros Iron e Vick.

Dedico.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À professora Cristina Ferreira Silva e Batista, pela orientação.

À professora Maria Clara Costa, pela orientação durante o período de doutorado Sanduíche.

Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos meus colegas da pós-graduação.

Aos meus pais e minha família, por sempre me apoiarem e acreditarem nas minhas escolhas.

A Deus, por iluminar meus pensamentos.

*“O Segredo da vida é o solo, porque do solo dependem as plantas, a água o clima e nossa vida. Tudo esta interligado. Não existe ser humano sadio se o solo não for sadio.”*

Ana Primavesi

## Resumo

Microrganismos são importantes ferramentas biotecnológicas para descontaminação de resíduos com metais pesados, pois apresentam alta eficiência e baixo custo. Dentre os processos de tratamento há estratégias de bioaumentação utilizando a biomassa microbiana um biosorvente de metais pesados. O presente estudo teve objetivo de identificar entre bactérias isoladas da água residuária do processamento do café aqueles resistentes a altas concentrações de  $Pb^{2+}$  e de  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , desde o impacto destes metais na fisiologia até a expressão de genes de resistência a fim de inferir sobre a capacidade de remoção destes metais em ambientes multicontaminados. *S. marcescens* CCMA 1010 se destacou pelo crescimento em até 4,0 mM de  $Pb^{2+}$ , apresentando taxa de crescimento e tempo de geração similar ao controle (sem chumbo). No entanto a atividade biológica diminuiu nos primeiros 180 minutos de exposição ao  $Pb^{2+}$  estabilizando-se após esse período. Somente o gene *ZntR* foi detectado inferindo que há um mecanismo de regulação da presença de  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  no interior da célula. Nos ensaios de remoção em água com  $Pb^{2+}$  detectou-se 100% de remoção do  $Pb^{2+}$ . Entretanto, do meio de cultura LB observou-se baixa taxa de eficiência de remoção do íon metálico ( $\cong 30\%$ ), utilizando a biomassa ativa ou inativa. O gene *ZntR* não apresentou uma maior expressão quando na presença dos metais, sugerindo assim, que o metal não foi absorvido pelas células bacterianas. *S. marcescens* CCMA 1010 mostrou-se resistente ao  $Zn^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+}$ . A maior remoção de  $Pb^{2+}$  (31,8%) e  $Cd^{2+}$  (32,8%) foi observada em pH 5,0 e concentração inicial de 590 mg L<sup>-1</sup> para o  $Pb^{2+}$  e 470 mg L<sup>-1</sup> para o  $Cd^{2+}$ . A presença dos metais refletiu na variação no grupamento amina, grupo carboxyl, hidroxyl e ligação com o oxigênio ou nitrogênio, sugerindo assim, mecanismos de adsorção dos metais na superfície da parede celular. A biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 apresentou potencial de utilização em sistemas de tratamento de águas residuais contaminadas com metais tóxicos além de baixa exigência nutricional para produção da biomassa.

**Palavras-chave:** Biorremediação, Biossorção, Metais Pesados, Bactéria.

## Abstract

Microorganisms are important biotechnologies tools for decontaminations of wastes with heavy metals, because they present high efficiency and low cost. Among the process of treatment have the strategies of bioaugmentation utilizing the microbial biomass with biosorbent of heavy metals. The present study had objectives of identify among bacterias isolated of wastewater of coffee process those resistant at high concentrations of  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , since the impact of these metals in physiology until the expression of resistance genes, in order to infer about the capacity of removal these metals in multi-contaminated environments. *S. marcescens* CCMA 1010 stood out by growth in until 4.0 mM of  $Pb^{2+}$ , showing growth rate and generation time similar the control (without lead). However, the biological activity decreased in first 180 minutes of  $Pb^{2+}$  exposition stabilizing after this time. Only *zntR* gene was detected inferring with exist a regulation mechanism of Zn, Cd and Pb presence in side of cell. In experiments of  $Pb^{2+}$  removal in water was detected 100% of removal of  $Pb^{2+}$ . However, in culture medium LB was observed low efficiency of metal ion removal ( $\cong 30\%$ ), utilizing the biomass active or inactive. The *zntR* gene don't presented the high expression in the lead presence, thus suggesting, with the metal don't was absorbed by bacterial cell. *S. marcescens* CCMA 1010 showed resistant at the  $Zn^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+}$ . The major removal rate of  $Pb^{2+}$  (31.8%) and  $Cd^{2+}$  (32.8%) was observed in pH 5.0 and initial concentration of 590 mg L<sup>-1</sup> for the  $Pb^{2+}$  and 470 mg L<sup>-1</sup> for the  $Cd^{2+}$ . The presence of metals reflected in variation of amine group, carboxyl, hydroxyl group and ligation of oxygen and nitrogen, thus suggesting, adsorption mechanisms of heavy metals in superficies of wall cell. The biomass of *S. marcescens* CCMA 1010 showed potential use in systems of treatment of wastewater contaminated of toxic metals beyond low nutritional exigency for biomass production.

**Keywords:** Biorremediation, biosorption, heavy metals, Bacteria.

## SUMÁRIO

1	CAPITULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1	Introdução.....	11
1.2	Fundamentação Teórica.....	13
1.2.1	Biorremediação.....	13
1.2.2	Métodos <i>ex-situ</i> .....	15
1.2.3	Métodos <i>in situ</i> .....	16
1.2.4	Aplicação de microrganismos para descontaminação de ambientes .....	17
1.2.5	Resistência a metais pesados por bactérias .....	20
1.2.6	Influência dos metais no crescimento celular.....	20
1.2.7	Biossorção de elementos traço por bactérias .....	26
1.2.8	Utilização de <i>Serratia marcescens</i> em processos de biorremediação .....	30
1.2.9	Diversidade microbiana em ambientes contaminados.....	31
1.3	Considerações finais.....	33
	Referências .....	34
	SEGUNDA PARTE: ARTIGOS .....	42
	Artigo 1: Impact of Pb <sup>2+</sup> in growth and biologic activity of <i>Serratia marcescens</i> CCMA 1010 inoculant selected for wastewater treatment .....	43
	Artigo 2: Avaliação da remoção de Pb <sup>2+</sup> por <i>Serratia marcescens</i> CCMA 1010 e expressão do gene <i>ZntR</i> , regulador da bomba de efluxo <i>ZntA</i> .....	59
	Artigo 3: Eficiência de <i>Serratia marcescens</i> CCMA 1010 na biossorção de metais em sistemas multicontaminados .....	77

## 1. CAPITULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Introdução

Os processos de biorremediação envolvem principalmente a utilização de plantas, microrganismos ou a interação de ambos nos processos de descontaminação de ambientes. As contaminações mais comuns podem ser causadas por metais pesados, compostos orgânicos ou hidrocarbonetos, a partir de processos naturais ou antropogênicos (ADHOLEYA, 2012; FADIGAS et al., 2002).

No Brasil, a resolução 420/2009 do CONAMA dispõe sobre os critérios de contaminação do solo quanto à presença de substâncias químicas em decorrência de atividades antrópicas (CONAMA, 2009).

Em relação a dinâmica dos xenobióticos no solo, os contaminantes orgânicos podem ser mineralizados por microrganismos alóctones ou autóctones ou serem utilizados como fonte de carbono. Opostamente, os metais contaminam o ambiente e não são degradados. Nesses casos, diversos mecanismos são apresentados pelos microrganismos como alternativa a contaminação por esses elementos. Como por exemplo, em locais contaminados com metais pesados, algas, bactérias, leveduras, fungos filamentosos e micorrízicos tolerantes, representam um importante papel nos ciclos biogeoquímicos atuando direta ou indiretamente nos processos de mineralização, oxidação/redução, solubilização, precipitação e volatilização de alguns metais pesados como Fe, Mn, Zn, Mg, Cr, Cd e Hg (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Além da aplicação em solos contaminados, há a possibilidade de utilização dos produtos metabólitos gerados pelos microrganismos, bem como a utilização da biomassa microbiana como biossorbentes dos íons metálicos (YANG et al., 2016; HUANG; LIO, 2013).

Processos de resistência e remoção dos metais também podem ser regulados por um grupo de proteínas, denominados metalotioneínas, sendo esses compostos capazes de se ligarem aos metais pesados presentes no solo, diminuindo a mobilidade desses metais e impedindo que atinjam o interior das células, causando danos aos organismos (ARYAL; KYRIAKIDES, 2015). No processo de redução do Cr (VI), as enzimas cromato redutases são responsáveis por catalisar a reação de redução do Cr (VI) para Cr (III), que é uma forma menos tóxica do elemento (THATOI et al., 2014).

Outros elementos presentes nas células microbianas, como a melanina, glomalina e sideróforos, são agentes quelantes ou complexantes dos metais presentes no ambiente, sendo que a capacidade de biossorção está relacionada ao mecanismo utilizado pelos microrganismos para remoção dos metais em questão. *Bacillus subtilis* (Gram-positivos) utilizam o grupo COO- do ácido glutâmico do peptídeo glicano como agente primário para ligação com os metais, apresentando afinidade principalmente ao Zn e Mg, já algumas espécies de *Penicillium* sp. utilizam como principal polímero ligante a quitina-quitosana, apresentando afinidade com Zn e Cu (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos removem de forma eficiente os íons metálicos. Entretanto, vários fatores podem interferir nesse processo, sendo necessárias pesquisas, a fim de, conhecer a dose máxima tolerada pelo microrganismo, concentração dos metais no ambiente, pH, composição e concentração da biomassa, idade das células e presença de cátions e ânions ou outros elementos químicos (QUINTELAS, 2000). Sendo assim, os microrganismos apresentam potencial para serem utilizados como ferramentas biotecnológicas, abrangendo diversas possibilidades de estudos em biorremediação, fornecendo resultados significativos e economicamente viáveis, além de completar o ciclo biogeoquímico natural de cada elemento (CHEUNG; GU, 2006; ABOU-SHANAB, 2011; EKMEKYAPAR, et al., 2013, REIS et al., 2014; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As atividades mineradoras, industriais, agrícolas e também as atividades urbanas causam diversos impactos ambientais. Um deles é a liberação de elementos traço no ambiente, que proporciona um grande potencial de contaminação, causando danos principalmente ao próprio ser humano, devido ao alto poder carcinogênico de alguns elementos.

Diante das conseqüentes contaminações do ambiente por diferentes metais, diversos métodos têm sido desenvolvidos para remediar esse problema. Dentre as técnicas convencionais para remoção dos metais, há os métodos físico-químicos. Entretanto, algumas dessas técnicas podem não ser funcionais ou não serem economicamente viáveis, gerando assim, a necessidade de tratamentos alternativos, como por exemplo, a utilização da biomassa de microrganismos, que se destaca como uma técnica natural, economicamente viável e com baixo impacto ambiental.

Esse trabalho justifica-se pela necessidade de otimizar os processos de biorremediação, visando identificar os melhores microrganismos para serem utilizados nesses processos nas diferentes condições ambientais. Desta forma o trabalho tem como objetivo identificar entre os microrganismos isolados da água residuária do processamento do café aqueles resistentes a maior concentração de chumbo e otimizar a remoção do  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e

Zn<sup>2+</sup> em meio líquido utilizando a biomassa de *Serratia marcescens* CCMA 1010, identificando possíveis mecanismos de resistência e estratégia de remoção.

## 1.2 Fundamentação Teórica

### 1.2.1 Biorremediação

Devido aos rápidos processos de industrialização há uma grande produção de resíduos industriais, que podem conter grandes quantidades de elementos traço. Resíduos de minas, indústrias de refinação de metais, lodo de esgoto além de usinas de incineração, liberam grandes quantidades de Pb, Hg e Cd no ambiente, podendo assim, trazer prejuízos ambientais, sendo necessário sua remoção do meio ambiente, ou mesmo sua transformação em uma forma menos tóxica (NAIK; DUBEY, 2013).

Os processos de biorremediação são aqueles em que se utilizam organismos para recuperar determinada área que sofreu algum impacto, como derramamento de óleo, resíduos contaminados com metais pesados, contaminação por matéria orgânica, pesticidas, etc. Nesse contexto, podem ser utilizadas técnicas de fitorremediação que utilizam plantas, bem como, técnicas que utilizam microrganismos, em alguns casos, podem ser utilizadas técnicas que combinem a utilização da inserção de microrganismos juntamente com espécies vegetais, normalmente são utilizados microrganismos endofíticos ou simbióticos, que além de estimularem o crescimento vegetativo, também auxiliam na biodegradação dos compostos, biossorção ou mesmo pela alteração na mobilidade dos metais no solo (ROMERO et al., 2005).

Nos processos que utilizam microrganismos, pode haver uma bioestimulação dos microrganismos autóctones que naturalmente estão presentes no ambiente ou pode haver uma inserção de algum microrganismo alóctone no local contaminado, técnica essa denominada de bioaugmentação (ABOU-SHANAB, 2011). Nesses processos, pode-se utilizar tanto biomassa de microrganismos vivos quanto mortos, essas técnicas são consideradas eficientes, economicamente viáveis e ambientalmente corretas quando comparados a outras técnicas convencionais (HUANG et al., 2013; BAZ et al., 2014).

A contaminação dos solos com poluentes orgânicos e metais pesados apresentam sérios riscos para a saúde humana e para a estabilização dos ecossistemas naturais, atraindo assim, grande atenção nos últimos anos. Diante dessa necessidade, há o desafio de desenvolvimento de técnicas alternativas de biorremediação (CHEN et al., 2015). Nesse sentido, a utilização de microrganismos apresenta promessas na remediação de solos contaminados com compostos

orgânicos, derivados de petróleo, defensivos agrícolas e também elementos traço (ADHOLEYA, 2012).

Para aumentar a eficiência no tratamento de ambientes contaminados, é indicado a combinação de técnicas de adsorção dos metais, com técnicas de recuperação, e em seguida, disponibilizá-los para a reutilização na indústria, uma vez que o processo de recuperação dos metais utilizando microrganismos, consiste em utilizar a biomassa das células para adsorção. Assim, posteriormente o metal pode ser separado da biomassa através de um processo de dessorção, podendo haver a recuperação do íon metálico (BUTTER et al., 1998) e segundo Quintelas (2000), esse método permite obter elementos com razoável grau de pureza.

Os metais pesados são o principal grupo de compostos inorgânicos que contaminam grandes áreas devido às atividades de mineração, indústria e agricultura por estarem presentes em diversos defensivos agrícolas (ADHOLEYA, 2012; BANKAR et al, 2012).

Normalmente metais pesados são continuamente despejados em sistemas aquáticos devido aos processos industriais. O chumbo, mercúrio e cádmio são considerados os três metais mais tóxicos (BANKAR et al., 2012). Outros metais como o cobre, cromo, zinco, níquel e cobalto, são íons metálicos essenciais ao metabolismo celular. Entretanto, em altas concentrações são tóxicos para as células (BISHNOI; GARINA, 2005).

A legislação brasileira que dispõe sobre os critérios de contaminação do solo em relação à presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos em decorrência da atividade antrópica é a resolução 420/2009 do CONAMA. Dispondo valores de referencia calculados em base com os riscos para a saúde humana, apresentando em seu anexo I e II, os valores de prevenção para os contaminantes, que é um valor limite da presença da substancia no solo. Entretanto, a resolução do CONAMA determina que os valores de referencia de qualidade dos solos devem ser estabelecidos pelos órgãos ambientais competentes de cada estado.

O Conselho estadual de política ambiental (COPAM) no estado de Minas Gerais estabelece os valores de referencia para qualidade do solo, sendo apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Lista de valores de orientadores para contaminação do solo por substâncias inorgânicas no Estado de Minas Gerais

Substancia	Solo mg Kg <sup>-1</sup> de peso seco	
	Valor de referencia	Valor de prevenção
Arsênio	8	15
Cádmio	< 0,4	1,3
Chumbo	19,5	72
Cobre	49	60
Cromo	75	75
Ferro	-	-
Manganês	-	-
Mercúrio	0,05	0,5
Níquel	21,5	30
Zinco	46,5	300

Fonte: Adaptado de COPAM (2011)

Os processos de biorremediação podem ser aplicados tanto com técnicas *ex-situ* ou *in-situ*. Nas técnicas *ex-situ* o solo contaminado é escavado ou a água subterrânea é extraída antes do tratamento, enquanto a remediação *in-situ* não requer esse processo de escavação ou extração, o solo ou a água são tratados no mesmo local (ABOU-SHANAB, 2011). A escolha da técnica a ser aplicada deve levar em consideração os poluentes, tipos de contaminação, custo dos processos e a concentração final do contaminante, que se deve apresentar de uma forma aceitável no final do tratamento (OLIVEIRA et al., 2008).

### 1.2.2 Métodos *ex-situ*

As técnicas *ex-situ* são utilizadas principalmente para a remoção de contaminantes inorgânicos, tais como metais pesados, radionucleídeos, ânions tóxicos e outros, mas em muitos casos, podem ser aplicados em contaminações orgânicas. Métodos físicos e químicos tradicionais para a limpeza de poluentes são muitas vezes caros. Essas técnicas podem ser limitadas, pela necessidade de um grande espaço disponível para a deposição dos poluentes e além dos elevados custo de reagentes e energia e nem sempre é assegurada a descontaminação completa dos contaminantes (ADHOLEYA, 2012).

Os principais métodos aplicados na biorremediação *ex-situ* são os tratamento em uma fase semi-sólida denominada de “*slurry-phase*” e em uma fase sólida. Na *slurry-phase* o solo contaminado é combinado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outros aditivos em um bioreator. A lama resultante é misturada constantemente para manter o contato dos microrganismos com os contaminantes. Ao término do tratamento, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é removido do produto final, o material tratado é disposto a outros tratamentos caso ainda se encontre contaminado (ABOU-SHANAB, 2011).

Com o tratamento na fase sólida, os solos são remediados em áreas de tratamento acima do solo, equipados com sistemas de captação do chorume. *Land farming*, compostagem e biopilhas são três tipos de tratamento em fase sólida.

O *Land farming* consiste em espalhar o solo contaminado sobre uma superfície de terra ou espuma, acoplado a um sistema de coleta do chorume. É adicionada uma camada fina sobre o solo estimulando a atividade microbiana aeróbica do solo, através da aeração e/ou adição de minerais, nutrientes e aumento da umidade (ADHOLEYA, 2012). Entretanto, em muitos casos a *land farming*, reduz a concentração de contaminantes no solo, devido principalmente, a volatilização, lixiviação ou diluição através da mistura com solo não contaminado mais do que através da degradação real pelos microrganismos (ABOU-SHANAB, 2011).

A compostagem tem o intuito de degradar compostos orgânicos tóxicos ou diminuir sua toxicidade. Devido ao aumento da atividade metabólica, ocorre uma liberação de ácidos e aumento da temperatura resultando numa maior solubilidade e mineralização dos compostos orgânicos (ADHOLEYA, 2012). Entretanto, o desempenho da compostagem pode ser afetado principalmente pela natureza do contaminante, condições e procedimentos da compostagem, comunidades microbianas presentes e o tempo (BARKER; BRYSON, 2002).

Biopilhas é uma forma de tratamento do solo contaminado que consiste na utilização das técnicas de *land farming* e compostagem. O solo contaminado é misturado com um não contaminado, através de um processo de aeração há um estímulo da microbiota desse solo, iniciando assim um processo de descontaminação. Os contaminantes são convertidos em CO<sub>2</sub> e água. As pilhas podem contar até 20 metros, e devem ser cobertas com plástico, a fim de, evitar o escoamento, evaporação e volatilização, promovendo também um aquecimento pela energia solar. Essa técnica favorece os microrganismos indígenas aeróbicos e anaeróbicos do solo (ADHOLEYA, 2012).

### **1.2.3 Métodos *in situ***

Adholeya (2012) define as técnicas *in-situ* como sendo aquelas aplicadas no solo ou águas causando um mínimo de perturbação do ambiente. Essas técnicas são geralmente as mais desejadas, devido ao menor custo e baixo impacto, uma vez que, forneçam o tratamento no local, evitando escavações e transporte do solo ou água. Entretanto, essa técnica pode ser limitada pela profundidade do solo, não promovendo uma completa descontaminação.

Nas técnicas *in situ* podem ser utilizados métodos de bioestimulação ou bioaugmentação. A bioestimulação estimula a degradação do contaminante pelos microrganismos indígenas,

melhorando as condições do meio, fornecendo condições adequadas para o desenvolvimento microbiano, aumentando assim a eficiência dos microrganismos em utilizar os compostos que estão disponíveis (OKAFOR, 2011).

Para promover a bioestimulação, são utilizados recursos como a bioventilação, que envolve uma suplementação de ar e nutrientes no solo, estimulando os microrganismos; Biodegradação *in situ* que utiliza a inserção de oxigênio e nutrientes através de uma solução aquosa, estimulando a degradação de contaminantes orgânicos pelos microrganismos; *Biosparging* que envolve a injeção de ar sob pressão, aumentando as concentrações de oxigênio nas águas subterrâneas, aumentando a taxa de degradação biológica dos contaminantes por bactérias indígenas, aumentando a superfície de contato entre os microrganismos e os contaminantes (VIDALI, 2001).

Já os processos de bioaugmentação utilizam a inserção de microrganismos alóctones, com reconhecida capacidade de degradação/remoção do contaminante.

Em contaminação do solo a inserção de microrganismos alóctones, podem apresentar alguns fatores limitantes como a competição com as culturas indígenas no ambiente que dificultam o desenvolvimento e a manutenção da população inoculada em condições viáveis para os processos de biorremediação. Normalmente essa técnica é utilizada nas fases iniciais de contaminação (OKAFOR, 2011) uma vez que a maioria dos solos que apresentam exposição em longo prazo a contaminantes podem apresentar microrganismos resistentes aos compostos, bem como, possível capacidade de degradação dos mesmos (VIDALI, 2001).

#### **1.2.4 Aplicação de microrganismos para descontaminação de ambientes**

Os métodos convencionais utilizados para remover os elementos traço são os métodos físico-químicos que utilizam oxidação e redução dos metais, precipitação química, filtração, tratamentos eletroquímicos, evaporação, trocas iônicas e osmose reversa. Entretanto, esses métodos apresentam certa limitação e muitas vezes não são economicamente viáveis (COLIN et al., 2012). Nesse sentido, a biossorção pelos microrganismos é um tratamento alternativo aos métodos tradicionais, além de serem ambientalmente corretas (BANKAR et al, 2002), se apresenta como uma opção econômica e sustentável para o desenvolvimento do tratamento da remoção e recuperação dos íons metálicos (BISHNOI; GARINA, 2005).

Devido à significância ambiental e econômica dos metais, é apresentado um interesse em avaliar o comportamento microbiológico em áreas contaminadas, avaliando seu potencial de biorremediação (GADD, 2002).

Os microrganismos apresentam importante papel nos ciclos biogeoquímicos, apresentando mecanismos de mobilidade dos metais no solo, bem como para outros elementos, como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, com importantes aplicações para a produtividade agrícola, bem como, para a saúde humana (GADD, 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Deste modo, bactérias, leveduras, algas e fungos são amplamente utilizados como ferramentas biotecnológicas para descontaminação de ambientes contaminados com metais pesados, abrangendo novas possibilidades de estudo de biorremediação nesses locais (HLIHOR et al., 2013; ZHENG et al., 2014; TABARAKI et al., 2014; WANG et al., 2015).

A capacidade dos microrganismos em transformar os metais, esta ligada aos processos de mobilização e imobilização, influenciando o balanço dos mesmos entre suas fases solúveis e insolúveis (GADD, 2004). Esses processos podem estar ligados a mecanismos microbianos, tais como, oxidação/redução, mineralização, solubilização, precipitação e volatilização dos elementos, sendo diversos microrganismos envolvidos nesses processos como algas, bactérias, leveduras, fungos filamentos e micorrízicos tolerantes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dentre esses processos destaca-se a biossorção dos metais, que pode ser definida como a adsorção ou absorção microbiana dos elementos, tanto solúveis quanto insolúveis, por meio de mecanismos físicoquímicos, sendo que a biossorção pode fornecer locais de nucleação para a formação de minerais estáveis (MCLEAN et al., 2002; GADD, 2004).

Os metais podem ser mobilizados pelo metabolismo de microrganismos autotróficos e heterótrofos, pela lixiviação, quelação pela biomassa, metabólitos e sideróforos microbianos, bem como por processos de metilação. Tais processos podem levar a dissolução de compostos insolúveis de metal e minerais, incluindo fosfatos, óxidos, sulfetos e minérios mais complexos e desorção de espécie metálicas a partir de sítios de troca, como argila ou matéria orgânica do solo (GADD, 2004). Segundo o mesmo autor, o processo de imobilização dos metais pode reduzir a quantidade de metais livres no ambiente, podendo promover uma solubilização em determinadas circunstâncias, liberando assim mais metal na solução.

Sahin e Ozturk (2004) apresentam o potencial de biossorção do Cr (VI) por *Bacillus thuringiensis*, demonstrando uma possível utilização desses microrganismos nos processos de biorremediação. Ressaltando que o tempo de contato entre o adsorbato e o adsorvente é de grande importância no processo de adsorção, dependendo do sistema de remoção dos metais a serem utilizados. Sistemas de adsorção dos metais na parede celular de células mortas necessitam de um menor tempo de contato, devido a não utilização do metabolismo celular nesse processo.

Em processos de rizoremediação, bactérias isoladas do solo rizosférico foram capazes de remover em média mais de 20% do íon metálico ( $Pb^{2+}$ ) em um meio líquido. Entretanto alguns isolados foram capazes de remover cerca de 50% do íon (BOECHAT, 2014).

Leveduras também podem ser utilizadas em processos de biorremediação, Machado et al. (2008) demonstraram que as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de reduzir cerca de 90% da concentração de  $Ni^{2+}$  em meio sintético, sugerindo que a utilização da biomassa de *S. cerevisiae* é uma alternativa promissora nos processos de biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados. As cepas de *S. cerevisiae* também são capazes de remover com sucesso o Cromo. Entretanto, os processos de absorção e de redução do Cr(VI) são altamente dependentes do pH, apresentando uma completa remoção em pH de 1-2 em 5-12 dias de incubação.

A biomassa de *S. cerevisiae* é uma alternativa eficiente para serem utilizadas como biorremediadores especialmente porque representam um subproduto da indústria de fermentação, sendo produzidos em grandes quantidades (HLIHOR et al., 2013).

Com a biossorção é possível aplicar técnicas de recuperação do metal, sendo possível também a reutilização do biossorvente (QUINTELAS, 2000). Bshnoi e Garima (2005) demonstram que a utilização de fungos filamentosos é de grande importância nesse contexto, uma vez que, a biomassa dos fungos apresenta uma remoção tão eficiente quanto as dos tratamentos convencionais, apresentando também uma fácil regeneração, podendo ser reutilizada em outros processos.

A contaminação de solos com elementos traço pode trazer consequências para as comunidades bacterianas, fundamentais para manter a qualidade do solo. Estudos de isolamento de microrganismos em áreas contaminadas indicam possíveis mecanismos de resistência aos poluentes, fluxo de energia e ciclagem desses elementos no solo (ZHANG et al., 2015). Assim, há um potencial de utilizarem microrganismos em solos contaminados, afim de, diminuir a biodisponibilidade de metais pesados para vegetais e também, diminuir o impacto nos microrganismos do solo e conseqüentemente em seus processos (WANG et al., 2014).

A concentração de elementos traço no solo podem interferir em outros mecanismos de degradação de pesticidas, devido principalmente pela inibição de enzimas e do metabolismo das bactérias, sendo assim, Tiwary e Dubey (2015), utilizando o *Bacillus* sp. AKD1, demonstram que os altos valores de concentração mínima inibitória apresentado pela bactéria, apresenta potencial para utilização em processos de biorremediação de solos contaminados com cipermetrina, não diferindo nos valores de degradação dos pesticidas quando na presença

dos íons metálicos  $V^{5+}$ ,  $Li^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ , sugerindo que a cepa AKD1 apresenta potencial para utilização em solos contaminados com elementos traço e cipermetrina.

Biosurfactantes produzidos por microrganismos apresentam capacidade de formação de um complexo com os elementos traço presente no solo. Nesse sentido, Yang et al. (2016), confirmaram a produção de glicolipídeos por *Burkholderia* sp. Z90, o qual apresentou eficiência na remoção de Pb, Cu, As, Mn, Cd e Zn em solos contaminados, determinando a possibilidade de utilização dessa bactéria em processos de biorremediação.

### **1.2.5 Resistência a metais pesados por bactérias**

Os mecanismos de resistência dos microrganismos aos metais podem ser resultado de uma contaminação do ambiente. Pesquisas demonstraram que uma população de microrganismos após uma contaminação sistemática por efluentes industriais contendo elementos traço, apresentou um aumento na resistência aos contaminantes mantendo suas características fisiológicas, proporcionando a manutenção das células e sobrevivência nos ambientes contaminados (ANSARI; MALIKI, 2007).

Há nos microrganismos diversos mecanismos de resistência para minimizar os impactos dos elementos traço devido às características químicas e toxicidade de cada elemento, bem como, sua concentração (HUANG, et al., 2014).

Um fator determinante para essa tolerância é a transferência de plasmídeos por conjugação, contribuindo assim para manter as características de resistência na comunidade microbiana, desempenhando um papel importante na adaptação desses microrganismos a ambientes contaminados (JORQUERA et al., 2010).

A contaminação do solo, seja por defensivos agrícolas ou mesmo por metais pesados, pode gerar uma pressão seletiva nos microrganismos, causando uma disseminação dos plasmídeos de resistência (ANJUM et al., 2011). Como os mecanismos de resistência a elementos traço estão ligados a resistência a antibióticos (CASTRO et al., 2015) a inserção de microrganismos resistência a elementos traço no ambiente para processos de biorremediação deve ser levado em consideração, devido ao risco de uma transferência horizontal desses genes, conferindo resistência a antibióticos a outras bactérias (DREWNIAK et al., 2015).

### **1.2.6 Influência dos metais no crescimento celular**

Para a aplicação dos microrganismos na remoção de elementos traço no ambiente, testes em escalas laboratoriais são necessário para conhecer a resistência dos microrganismos aos elementos contaminantes, concentração desses metais no meio, bem como, as condições ideais de remoção, variando-se os valores de pH, concentração celular do inóculo, temperatura e tempo de contato dos microrganismos com os metais.

A influencia dos elementos traço no crescimento celular pode ser avaliada utilizando-se uma curva de crescimento dos microrganismos em meios de cultura contendo concentrações dos metais. Kinoshita et al. (2013), avaliaram a influencia dos metais  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{As}^{+2}$  e  $\text{Hg}^{+2}$ , no crescimento de *Weissella viridescenses* MYU 205, *Lactobacillus sakey* MYU 210 e *Lactobacillus mucosae* MYU 224, durante um período de 48 horas, comparando o crescimento a um tratamento controle, com ausência dos metais. O  $\text{Hg}^{+2}$  foi o elemento que apresentou maior influencia negativa sobre o crescimento dos microrganismos estudados, apresentando um atraso no crescimento das bactérias *L. sakey* e *L. mucosae* e a inibição do crescimento após 48 h de contato com *W. viridescenses*. Sugerindo que a toxicidade do  $\text{Hg}^{+2}$  é maior, quando comparada aos outros elementos traço, possivelmente, pelo  $\text{Hg}^{+2}$  ter sido transportado para o interior da célula, reduzindo ou inibindo o crescimento bacteriano, uma vez que, o  $\text{Hg}^{+2}$  pode inibir a produção de enzimas como a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, essencial para o metabolismo celular.

Huang et al. (2014), estudando a dinâmica de crescimento de *Bacillus cereus* sobre a presença de  $\text{Cd}^{+2}$  demonstraram um aumento da fase lag influenciado diretamente pela concentração do metal no meio de cultura, concentrações de 50, 100 e 150  $\text{mg L}^{-1}$  apresentam uma fase lag de 4, 6 e 10 h respectivamente. Concentrações inferiores de  $\text{Cd}^{+2}$ , como a de 20  $\text{mg L}^{-1}$ , apresentou crescimento similar ao tratamento controle. Resultados semelhantes encontrados por Guo et al. (2010), para *Bacillus* sp. na presença de  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cr}^{+2}$ , onde a dosagem de 100  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{+2}$  apresentou um aumento da fase lag de aproximadamente 23,86% em relação ao controle.

Estudos da dinâmica de crescimento dos microrganismos na presença dos elementos traço são importantes, pois o processo de remoção microbiana dos metais, está relacionado com a fase de crescimento dos microrganismos, sendo apresentado por Huang et al. (2014), que o *B. cereus* apresentou um máximo de remoção na fase exponencial quando em baixas concentrações de  $\text{Cd}^{+2}$ . Entretanto, em altas concentrações do metal, apresentou maior taxa de remoção na fase estacionária, demonstrando uma variação dos mecanismos de resistência em resposta a diferentes concentrações de  $\text{Cd}^{+2}$ .

A concentração mínima inibitória (CMI) é considerada a menor concentração do metal em que o crescimento do microrganismo é afetado. Sendo possível demonstrar, que os mecanismos de resistência estão ligados não só aos elementos, mas também a concentração dos mesmos. Avaliar a resistência dos microrganismos a variação na concentração dos elementos traço é de extrema importância, pois alguns metais como o zinco, pode ser considerado um elemento necessário para as células. Entretanto, em determinada concentração, apresenta-se como um produto tóxico, sendo a característica de toxicidade dos metais variável para cada microrganismo (MUNOZ et al., 2012).

Nesse sentido são utilizadas diversas concentrações dos elementos traço diluídos em meios de cultura contendo ágar. Castro et al. (2015) utilizaram meio ágar nutriente enriquecido com concentrações de  $\text{Cd}^{+2}$  (0; 0,1; 0,5; 1 e 2 mM), Cu (0; 0,1; 0,5; 1 e 2 mM) e Zn (1; 2,5; 5; 10; 15 e 25 mM). Ansari e Malik (2007) para os metais  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  e  $\text{Hg}^{+2}$ , utilizaram concentrações variadas de 3,12 a 3200 ug/ml, analisando ao final, a resistência aos elementos traço pelos microrganismos.

Estudos de concentração mínima inibitória são importantes, pois são capazes de comparar a resistência de novos microrganismos isolados com os que já apresentam conhecida ação de resistência aos metais (CHEN et al., 2008). A tabela 2 apresenta valores de concentração mínima inibitória para diferentes metais e bactérias encontrados na literatura.

Tabela 2. Valores de concentração mínima inibitória (CMI) para diferentes metais e microrganismos (Continua)

Metal	Microrganismo	CMI	Referencia
Ag	<i>Klebsiella sp. 3S3</i>	0,1 – 0,3 (mM)	Munoz et al. (2012)
	<i>Enterobacter sp. 2E4</i>	0,1 – 0,3 (mM)	Munoz et al. (2012)
As	<i>T.paurometabola A157</i>	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>P. aeruginosa B239</i>	2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>C. taiwanensis E326</i>	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>B. cereus ATCC11780</i>	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>E. coli ATCC25924</i>	2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
Cd	<i>Cupriavidus pauculus</i>	0,5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Burkholderia anthina</i>	2 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	0,5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>T.paurometabola A156</i>	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>P. aeruginosa B238</i>	8 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>C. taiwanensis E325</i>	5 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>B. cereus ATCC11779</i>	1 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>E. coli ATCC25923</i>	1 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>Cupriavidus taiwanensis TJ210</i>	2,5 (mM)	Chen et al. (2008)
	<i>Bacillus sp.</i>	2 (mM)	Guo et al. (2010)
	Co	<i>T.paurometabola A158</i>	1 (mM)
<i>P. aeruginosa B240</i>		1 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
<i>C. taiwanensis E327</i>		2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
<i>B. cereus ATCC11781</i>		2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
<i>E. coli ATCC25925</i>		3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
<i>Cupriavidus taiwanensis TJ212</i>		5 (mM)	Chen et al. (2008)
<i>Bacillus sp.</i>		200 mg L	Ren et al. (2015)
Cr	<i>Bacillus sp.</i>	12 (mM)	Guo et al. (2010)
Cu	<i>Cupriavidus pauculus</i>	1 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	1 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	1 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Burkholderia anthina</i>	0,5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	0,5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Cupriavidus taiwanensis TJ209</i>	5 (mM)	Chen et al. (2008)

	<i>Bacillus</i> sp.	800 mg L	Ren et al. (2015)
	<i>Bacillus</i> sp.	10 (mM)	Guo et al. (2010)
Hg	<i>T.paurometabola</i> A159	0,2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>P. aeruginosa</i> B241	0,2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>C. taiwanensis</i> E328	0,7 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>B. cereus</i> ATCC11782	0,2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>E. coli</i> ATCC25926	0,1 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>Citrobacter intermedius</i>	25,6 (mM)	Keramati et al. (2011)
	<i>Pseudomonas mallei</i>	6,4 (mM)	Keramati et al. (2011)
	<i>Proteus mirabilis</i>	12,8 (mM)	Keramati et al. (2011)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,8 (mM)	Keramati et al. (2011)
	<i>Bacillus megaterium</i>	25,6 (mM)	Keramati et al. (2011)
	<i>Corynebacterium xerosis</i>	6,4 (mM)	Keramati et al. (2011)
Ni	<i>T.paurometabola</i> A160	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>P. aeruginosa</i> B242	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>C. taiwanensis</i> E329	4 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>B. cereus</i> ATCC11783	3 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>E. coli</i> ATCC25927	4 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> TJ213	1,5 (mM)	Chen et al. (2008)
	<i>Bacillus</i> sp.	400 mg L	Ren et al. (2015)
Pb	<i>Klebsiella</i> sp. 3S1	4 – 4,5 (mM)	Munoz et al. (2012)
	<i>Enterobacter</i> sp. 2E2	5 – 6 (mM)	Munoz et al. (2012)
	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> TJ208	15 (mM)	Chen et al. (2008)
	<i>Bacillus</i> sp.	2000 mg L	Ren et al. (2015)
	<i>Bacillus</i> sp.	4 (mM)	Guo et al. (2010)
Zn	<i>Cupriavidus pauculus</i>	5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	5 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	15 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Burkholderia anthina</i>	25 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	25 (mM)	Castro et al. (2015)
	<i>Klebsiella</i> sp. 3S2	28-32 (mM)	Munoz et al. (2012)
	<i>Enterobacter</i> sp. 2E3	19 - 21 (mM)	Munoz et al. (2012)
	<i>T.paurometabola</i> A155	22 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>P. aeruginosa</i> B237	19 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
	<i>C. taiwanensis</i> E324	19 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)

<i>B. cereus</i> ATCC11778	2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
<i>E. coli</i> ATCC25922	2 (mM)	Limcharoensuk et al. (2015)
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> TJ211	7,5 (mM)	Chen et al. (2008)
<i>Bacillus</i> sp.	1500 mg L	Ren et al. (2015)
<i>Bacillus</i> sp.	5 (mM)	Guo et al. (2010)

---

(Conclusão)

A resistência aos elementos traço pelos microrganismos esta ligada a diferentes mecanismos, a tabela 2, demonstra um perfil de resistência a diferentes elementos por diferentes bactérias. De acordo com os dados apresentados, a escala de toxicidade apresenta-se da seguinte forma Ag>Cd>Co>As>Cu>Ni>Pb>Hg>Cr>Zn.

Experimentos com testes de concentração mínima inibitória dos elementos traço em microrganismos isolados de ambientes contaminados são capazes de demonstrar a resposta dos isolados a diferentes metais e concentrações dos mesmos. Geralmente, microrganismos isolados de áreas contaminadas são considerados resistentes (BAZ et al., 2014). Entretanto, Munoz et al. (2012), demonstraram uma heterogeneidade nesses resultados, apresentando alguns isolados altamente tolerantes, e outros sensíveis mesmo em concentrações baixas dos elementos.

### **1.2.7 Bioissorção de elementos traço por bactérias**

A bioissorção é considerada a propriedade da biomassa em agregar e concentrar íons ou outras moléculas de uma solução, através de processos de adsorção na superfície na parede celular devido a afinidade entre as moléculas ou absorção utilizando transporte ativo de metabólitos (VOLESKY, 2007).

Os microrganismos de uma forma geral apresentam importante papel em ecossistemas contaminados com elementos-traço, devido seus mecanismos de transformação dos elementos em suas diversas fases de solubilidade e insolubilidade (GADD, 2004). O isolamento e identificação de microrganismos presentes em áreas contaminadas são importantes, pois apresentam um maior potencial de serem utilizados como ferramentas biotecnológicas (LU et al., 2008).

Há nesse sentido diversas estratégias adotadas pelos microrganismos em ambientes contaminados, incluindo mecanismos de volatilização, exclusão e precipitação extracelular, bioissorção extracelular em sítios específicos além de complexação dos metais no interior das células, (ANSARI E MALIK, 2006; HUANG et al., 2014; FLYNN et al., 2014; REN et al., 2015). As condições do meio, como concentração dos metais, pH, concentração das células entre outros fatores, podem interferir nos processos de bioissorção ou bioacumulação (SAHIN; ÖZTÜRK, 2005).

O termo bioissorção é comumente utilizado na literatura, generalizando diversos processos realizados pelos microrganismos. Na figura 1 é apresentado um modelo de interação entre os microrganismos e os elementos traço, adaptado de Vullo et al. (2008).

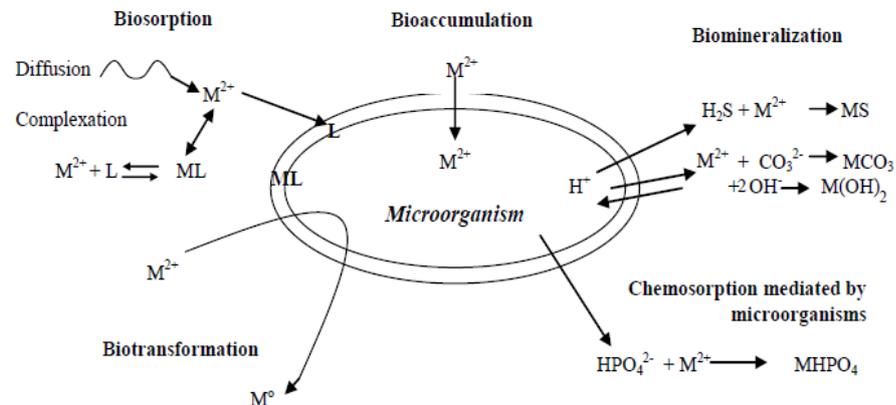


Figura 1. Modelo das interações entre os microrganismos e os elementos traço. Adaptado de Vullo et al. (2008).

O modelo demonstra a capacidade de imobilizar os metais pelos microrganismos, estando essa capacidade relacionada aos diferentes tipos de microrganismos, composição química dos compostos além dos processos físicos-químicos do ambiente. Observam-se os mecanismos de biosorção do metal na parede celular do microrganismo; Processos de bioacumulação no interior da célula; Biomineralização dos elementos através de substâncias produzidas pelos microrganismos; Biotransformação dos elementos, através da redução atômica dos elementos. Outra vantagem da utilização de microrganismos nos processos de biosorção relaciona-se com a possibilidade de modificações genéticas, promovendo uma maior capacidade de absorção dos metais (VULLO et al., 2008).

Biondo et al. (2012) estudando os processos de biosorção de elementos traço na biomassa de *Cupriavidus metallidurans* CH34, apresentaram um aumento na absorção dos íons metálicos na parede celular da bactérias após a inserção de um gene denominado *phytochelation* EC20sp. no plasmídeo bacteriano, podendo ser observado na figura 2 imagens de microscopia eletrônica de transmissão, observando a presença do  $Pb^{+2}$  na superfície da célula.

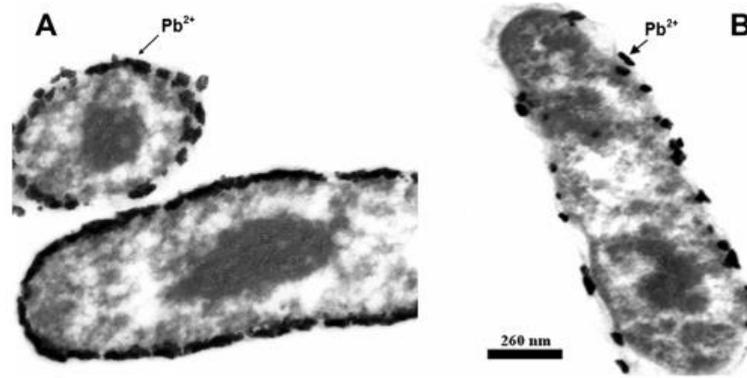


Figura 2. Imagem de MET da bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34 após tratamento com 1 mM de  $Pb^{+2}$ . Adaptado de Biondo et al. (2012).

Observa-se na figura 2A maior acúmulo do  $Pb^{+2}$  na parede celular de *C. metallidurans* CH34 após inserção do gene, em comparação com a célula selvagem na figura 2 B.

Os processos de bioabsorção apresentam-se com uma boa relação custo-benefício através de sua eficiência na remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de ambientes contaminados, quando comparados a técnicas de fitorremediação ou atenuação natural dos poluentes (AGNELO et al., 2016; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010). Os processos de bioabsorção que utilizam biomassa morta para acumular elementos traço, podem ser considerados um método mais competitivo e economicamente viável, uma vez que é difícil manter a biomassa viva e metabolicamente ativa (VELASQUEZ; DUSSAN, 2009).

Diversas bactérias podem ser utilizadas como agentes biorremediadores. Sendo demonstrado por Lu et al. (2008) o potencial de bioabsorção de metais por *Enterobacter* sp. indígenas, com uma afinidade aos elementos  $Pb^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  e  $Cd^{+2}$ . Proporcionando assim a utilização desses microrganismos como uma ferramenta biotecnológica, para descontaminação de locais multi-contaminados por elementos traço.

Reis et al. (2014), estudando três isolados identificados do solo e de alimentos fermentados (*Bacillus simplex* - CCMA 0006, *Bacillus subtilis* - CCMA 0054 e *Acetobacter tropicalis* - UFLADR 6.12) demonstram que os isolados podem ser utilizados em processos de bioabsorção de solos contaminados com  $Fe^{+3}$ . Entretanto, o *Bacillus subtilis* apresentou uma maior eficiência, com cerca de 99,22% de remoção do  $Fe^{+3}$  quando na concentração de 0,75 g/L do  $Fe^{+3}$  em 7 dias de cultivo, no pH 3,5, apresentando uma promessa alternativa aos métodos convencionais de tratamento de solos contaminados.

Wang et al. (2015) demonstraram que a bactéria *Pannonibacter phragmitetus* pode ser utilizada em processos de recuperação de solos contaminados com Cr, mesmo em locais com contaminação de multi-metals. Esse microrganismo demonstra vantagens competitivas em processos de biorremediação em solos contaminados, uma vez que, a população de *P. phragmitetus* apresenta um aumento rápido de sua população depois que o Cr(VI) é completamente reduzido.

Fatores como pH, concentração do elemento e a temperatura influenciam diretamente nos processos de biorremediação. Entretanto, para remoção de  $\text{Cd}^{+2}$  por *Bacillus licheniformis* o aumento da temperatura não afetou a remoção, mas para a remoção do Cr (VI) o aumento da temperatura apresentou um efeito negativo (ZOUBOULIS et al., 2004).

Em processos de sorção dos metais na biomassa inativada, Zouboulis et al. (2004) demonstraram uma diferenciação dos níveis de remoção comparando a biomassa de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus laterosporus*, apresentando uma remoção de 142,7 e 159,5  $\text{mg/L}^{-1}$  respectivamente para o  $\text{Cd}^{+2}$  e uma remoção de 62 e 72,6  $\text{g/L}^{-1}$  para o Cr (VI)

Baz et al. (2014) demonstraram que microrganismos isolados de áreas de mineração, apresentam considerável resistência a elementos traço, bem como, capacidade para remoção. Entretanto, o nível de tolerância dos microrganismos aos elementos, não está necessariamente relacionada com sua capacidade de utilização dos metais em seu metabolismo, ou mesmo na capacidade de quelar ou alterar sua solubilidade no meio, em condições experimentais. Neste trabalho a estirpe de *Streptomyces* sp. BN2 apresentou resistência a uma maior dosagem de  $\text{Pb}^{+2}$  quando comparada a estirpe de *Streptomyces* sp. BN48. No entanto, a estirpe BN48, apresentou maior capacidade de acumulação do metal, sugerindo uma não correlação entre resistência dos metais e capacidade de acumulação pelos microrganismos testados.

O Pb é um elemento altamente tóxico para os organismos, apresenta persistência no ambiente e acumula-se nos organismos, sendo transportados através de redes tróficas (BARKIDERE et al., 2016). Processos de biorremediação utilizando microrganismos para a remoção do Pb recebeu atenção nas últimas décadas (NAIK; DUBEY, 2013).

Avaliando os mecanismos de imobilização do Pb por *Bacillus subtilis*, Bai et al. (2014) observaram uma diminuição da biodisponibilidade do Pb através de processos de biossorção, bioacumulação e conversão do metal em formas mais estáveis. Os mecanismos utilizados para esse processo é o de complexação do Pb na parede celular, formação de precipitados na forma de  $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ,  $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$  e  $\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e acumulação do metal no interior das células. Huang e Liu (2013) demonstraram que a adsorção dos metais como o  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  por

*Pseudomonas* sp. estão relacionados aos grupos aminas, carboxil e hidroxil presentes na superfície da parede celular.

O  $\text{Cr}^{+6}$  que se apresenta em estado móvel, é considerado um elemento contaminante de alta toxicidade, apesar de ser utilizado em várias indústrias, possui características carcinogênicas e mutagênicas, devendo ser reduzido a sua forma trivalente  $\text{Cr}^{+3}$  que é uma forma menos tóxica e insolúvel (CHEUNG; GU, 2007; THATOI et al., 2014). São encontradas em algumas bactérias as enzimas cromato redutases, que são responsáveis por catalisar a redução de  $\text{Cr}^{+6}$  para  $\text{Cr}^{+3}$ . Essas enzimas têm recebido uma atenção especial, devido ao seu potencial de utilização em processos de biorremediação. Wang et al. (2015) demonstraram que a bactéria *Pannonibacter phragmitetus* pode ser utilizada em processos de recuperação de solos contaminados com Cr, mesmo em locais com contaminação de multi-metals. Esse microrganismo demonstra vantagens competitivas em processos de biorremediação em solos contaminados, uma vez que, a população de *P. phragmitetus* apresenta um aumento rápido de sua população depois que o Cr é completamente reduzido.

Huang et al. (2014) demonstraram que os mecanismos de bioacumulação de Cd são dependentes das concentrações do elemento, baixas concentrações favorecem mecanismos de acúmulo no interior das células, enquanto altas concentrações favorecem mecanismos de acúmulo no exterior, devido principalmente aos danos causados pelo metal, levando a exclusão dos mecanismos de complexação no interior das células.

Além da concentração dos elementos serem fatores fundamentais para os processos de bioacumulação, uma multi-contaminação também pode interferir nesses processos, devido principalmente pela competição por sítios de ligação na superfície celular, apresentando efeitos antagônicos da remoção dos metais, quando comparados a processos de bioacumulação de elementos de forma separada (ANSARI; MALIK, 2007).

Assim, os processos de bioacumulação pelos microrganismos estão em função de diversas condições ambientais, como: pH, concentração do inóculo, fase de vida dos microrganismos, concentração inicial dos íons e temperatura (MALIK, 2004; EKMEKYAPAR et al., 2011; REIS et al., 2014).

### **1.2.8 Utilização de *Serratia marcescens* em processos de biorremediação**

*Serratia marcescens* é uma bactéria gram negativa anaeróbica facultativa, apresenta morfologia de coco bacilos e pode ser encontrada em diversos ambientes, como, solo, água,

ar, plantas, alimentos, etc. Apesar de estarem relacionadas com infecções hospitalares, existem diversos estudos de aplicação biotecnológicas, como na biossorção de elementos traço (CRISTANI et al., 2012), e na biodegradação de biodiesel (SOUZA et al., 2016) e pesticidas (CYCON et al., 2013).

Esses microrganismos podem apresentar como metabólito secundário, uma pigmentação denominada de prodigiosina, que é um pigmento vermelho com características antifúngicas, antiprotozoárias e antibacteriana. Entretanto, a produção da prodigiosina pode estar relacionada com nutrientes do meio, como carbono, nitrogênio, temperatura, íons metálicos, entre outros (CRISTANI et al., 2012; KIMYON et al., 2016).

Estudos realizados por Cristani et al. (2012) demonstraram eficiência da utilização de *S. marcescens* na remoção de elementos traço, principalmente o  $Pb^{+2}$ . Entretanto, a produção de prodigiosina foi afetada pela presença dos íons metálicos, caracterizando a produção do pigmento pela bactéria como um bioindicador de toxicidade das células.

Cepas de *Serratia* sp. isoladas de áreas contaminadas com Radio apresentaram alto desempenho na remoção do elemento com valores de 75 a 80% de remoção, sendo indicados em aplicações biotecnológicas de separação e recuperação do íon (ZAKERI et al., 2010).

Além da possível aplicação de *S. marcescens* em processos de remoção de elementos traço, há também a possibilidade de degradação de compostos derivados do petróleo. LI et al., 2008, demonstraram que testes de crescimento de microrganismos em meios contaminados, podem indicar os melhores isolados para atuarem em processos de biorremediação de áreas contaminadas.

Em trabalho realizado por Souza et al. (2016), *S. marcescens* 110 UFRGS demonstrou crescimento em meios de cultivo contendo diesel, ocorrendo uma biodegradação do produto, utilizando os hidrocarbonetos presentes no diesel como fonte de energia, o que pode ser deduzido pela presença de um gene *alkB* na bactéria.

### **1.2.9 Diversidade microbiana em ambientes contaminados**

A diversidade microbiana está ligada principalmente a capacidade de fungos e bactérias em utilizar uma grande quantidade de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. O conhecimento dessa diversidade é de grande importância, pois é economicamente e ambientalmente relevante. As mesmas bactérias que se apresentam de uma forma indesejável como, por exemplo, a *Rodhococcus erythropolis* que podem causar doenças em humanos e

outros animais, é amplamente distribuída no solo e é capaz de substituir átomos de enxofre por átomos de oxigênio no petróleo (TORTÓRA, 2012).

Os metais pesados acumulam-se no ambiente e principalmente em locais de mineração podem causar impactos negativos a microbiota do solo (OBBARD; JONES, 1993), bem como aos demais organismos que estão presentes no ambiente, tanto procarióticos quanto eucarióticos (ZIRNSTEIN et al., 2012).

As populações e atividades microbianas em ambientes contaminados são fortemente influenciadas pelas condições ambientais, tais como teores de nutrientes no solo e temperatura. Em meses de menor temperatura em solos com teores elevados de chumbo, a população e atividade microbiana são afetadas negativamente. Sendo assim, é possível utilizar parâmetros microbiológicos como a atividade de fungos e bactérias como indicadores da qualidade de solos impactados (BARROS et al., 2010).

Com o impacto negativo das atividades mineradoras na saúde pública e ambiental, através principalmente da degradação do ecossistema aquático causando a diminuição do pH e liberação de níveis elevados de metais pesados, surge a necessidade de desenvolvimento de tecnologias ambientais sustentáveis para remediação desses ambientes. Para controlar ou diminuir os impactos no meio ambiente, é necessário se conhecer a diversidade e composição da comunidade microbiana das regiões afetadas, pois os parâmetros físicos e químicos do ambiente estão ligados diretamente a processos bióticos (MAHOPATRA et al., 2011; LEE, 1994).

As abordagens moleculares têm sido desenvolvidas até o momento para analisar a diversidade, filogenia, ecologia e estrutura microbiana nos ambientes. Com o surgimento de metodologias que produzem dados de sequência de DNA e RNA em grandes quantidades, ferramentas de bioinformática e uma padronização e automatização dos métodos moleculares como a metagenômica e metaproteômica, facilita na elucidação dos papéis ecofisiológicos dos microrganismos nos ambientes contaminados, promovendo o desenvolvimento de estratégias para gerenciar os impactos ambientais causados pelas indústrias mineradoras, e possível utilização desses microrganismos em processos industriais de baixo custo para a descontaminação de locais contaminados principalmente com elementos traços (MAHOPATRA et al., 2011).

Zirnstein et al. (2012) estudando os biofilmes formados em uma mina de urânio na Alemanha, demonstram a presença não só de archaea e bactérias como a de organismos eucarióticos (fungos, protozoários e alguns invertebrados), mesmo que em baixa diversidade,

indicando resistência e influencia desses organismos nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, bem como na mobilização e imobilização dos metais nesses ambientes.

Analisando a diversidade microbiana Qu et al. (2011) demonstraram que a população microbiana foi bastante reduzida na presença de chumbo e zinco, quando nas concentrações de 1500 e 995 mg/Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As atividades de uréase, fosfatase e desidrogenase do solo também foram negativamente correlacionadas com as concentrações de chumbo e zinco. Assim, se analisar os padrões de PCR-DGGE combinados com as análises de atividades enzimáticas do solo, pode-se gerar índices para avaliação da qualidade do solo por contaminação com metais pesados.

A resistência a metais pesados esta ligada a genes de resistência. Um estudo com uma comunidade microbiana do estuário do Sena na França, demonstra que para bactérias dos grupos *Staphylococcus* e *Micrococcus* a presença do plasmídeo contendo o gene *cadA* flanqueadas por sequências de inserção IS257 poderia ser responsável pela disseminação deste gene de resistência ao cádmio nesse ambiente aquático (OGER et al., 2003).

### 1.3 Considerações finais

Os microrganismos apresentam papel importante nos processos de biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados. Entretanto, mesmo com diversos trabalhos de pesquisa utilizando os microrganismos em diferentes condições, há ainda uma grande carência de estudos e aplicações dos microrganismos como biorremediadores.

O presente trabalho tem o objetivo consolidar conhecimento em relação a utilização de microrganismos na remoção dos metais pesados, possibilitando aplicações futuras desses microrganismos em sistemas de tratamento, biofiltros ou mesmo em aplicações *in situ*.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I. Bioremediation: New approaches and trends. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; GOEL, R.; MUSARRAT, J. **Biomanagement of Metal-Contaminated Soils**. Springer Science and Business Media. 2011, 459 p.
- ADHOLEYA, M. D. A. Role of microorganisms in remediation of contaminated soil. In: SATYANARAYANA, T; JOHRI, B. N.; PRAKASH, A. **Microorganisms in environmental management: microbes and environment**. Springer Science and Business Media. 2012, 818p.
- AGNELO, A. C.; BAGARD, M. HULLEBUSCH, E. D. V.; ESPOSITO, G.; HUGUENOT, D. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. **Science of the environmental**, v. 563, p. 693-703, 2016.
- ANDERSON, J.P.E. Soil respiration. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. & KEENEY, D.R., eds. **Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties**. 2. ed. Madison, Soil Science Society of America/American Society of Agronomy, 1982. Part 2. p. 831-845.
- ANDERSON, T.H. & DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biological Biochemistry**, v.25, p.393-395, 1993.
- ANJUM, R.; GROHMANN, E.; MALIK, A. Molecular characterization of conjugative plasmids in pesticide tolerant and multi-resistant bacterial isolates from contaminated alluvial soil. **Chemosphere**, v. 84, p. 175-181, 2011.
- ANSARI, M. I.; MALIK, A. N. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. **Bioresources technology**, v. 98, p. 3149-3153, 2007.
- ARYAL, M.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. **Environmental monitoring assessment**, v. 187, p. 1-26, 2015.
- BAI, J.; YANG, X.; DU, R.; CHEN, Y. ; WANG, S. ; QIU, R. Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by *Bacillus subtilis* DBM in a multi-metal-contaminated soil. **Journal of environmental sciences**, v. 26, p. 2056-2064, 2014.
- BANKAR, A. V.; ZINJARDE, S. S.; KAPADNIN, B. P. Management of heavy metal pollution by using yeast biomass. In: SATYANARAYANA, T; JOHRI, B. N.; PRAKASH, A. **Microorganisms in environmental management: microbes and environment**. Springer Science and Business Media. 2012, 818p.
- BARKER, A. V.; BRYSON, G. M. Bioremediation of heavy metals and organic toxicants by composting. **Science word journal**. v. 2, p. 407-420, 2002.

BARKIRDERE, S.; BOLUCEK, C.; YAMAN, M. Determination of contamination levels of Pb, Cd, Cu Ni and Mn caused by former lead mining gallery. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, p. 1-7, 2016.

BARROS, Y. J.; MELO, V. F.; DIONISIO, J. A.; OLIVEIRA, E. B.; CARON, L. KUMMER, L.; AZEVEDO, J. C. R.; ZOUA, L. C. P. Indicadores de qualidade de solos em áreas de mineração e metalurgia de chumbo. I- Microrganismos. **Revista brasileira de ciência do solo**. v.34, p. 1397-1411, 2010.

BAZ, A. E.; BAZ, M.; BARAKATE, M.; HASSANI, L.; GHARMALI, A. E.; IMZILN. Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. **The scientific world journal**, v. 2015, p.1-14, 2014.

BELLATO, C. M.; GARCIA, A. K. M.; MESTRINELLI, F.; TSAI, S. M.; MACHADO, M. A.; MEINHARDT, L. W. The induction of differentially expressed proteins of *Xylella fastidiosa* with citrus extract. **Brasilian journal of microbiology**, v. 35, p. 235-242, 2004.

BIONDO, R.; SILVA, F. A.; VICENTE, E. J.; SARKIS, J. E. S.; SCHENBERG, C. G. Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH-34 for enhanced metals bioremediation. **Environmental science technology**, v.46, p.8325-8332, 2012.

BISHNOI, N. R.; GARIMA. Fungos-An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review. **Journal of scientific and industrial research**. v.64, p. 93-100, 2005.

BOECHAT, C. L. Biorremediação de solos contaminados por metais pesados em áreas de beneficiamento de minério de ouro. 2014. 105f. **Tese** (doutorado em ciência do solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pelotas – RS. 2014.

BUTTER, T. J.; EVISON, L. M.; HANCOCK, I. C.; HOLLAND, F. S.; MATIS, K. A.; PHILIPSON, A.; SHEIKH, A. I.; ZOUBOULIS, A. I. The removal and recovery of Cadmium from dilute aqueous solutions by biosorption and electrolysis at laboratory scale. **Water research**. v.32, p.400-406, 1998.

CASTRO, C. B.; MACHADO, R. A.; MOREIRA, I. V.; MANAIA, C. M. Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. **Science of the total environment**, v. 530, p. 367-372, 2015.

CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. **Biotechnology advances**, v. 33, p. 745-755, 2015.

CHEN, W. M.; WU, C. H.; JAMES, E. K.; CHANG, J. S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of hazardous material**, v. 151, p. 364-371, 2008.

CHEUNG, K. H.; GU, J. D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. **International biodeterioration and biodegradation**. v.59, p. 8-15, 2007.

CHEUNG, K. H.; GUM J. D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. **International biodeterioration and biodegradation**, v. 59, p. 8-15, 2007.

COLIN, V. L.; VILLEGAS, L. B.; ABATE, C. M. Indigenous microorganisms as potential bioremediators for environments contaminated with heavy metals. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v.69, p. 28-37, 2012.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 420/2009. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm.htm>> Acesso em 04 de março de 2015.

CRISTANI, M. T.; NACCARI, C.; NOSTRO, A.; PIZZIMENTI, A.; TROMBETTA, D.; PIZZIMENTI, F. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). **Environmental science pollution research**, v. 19, p. 61-168, 2012.

CYCON, M.; ZMIJOWSKA, A.; WOJCIK, M.; POOTROWSKA-SEGET, Z. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. **Journal of environmental management**, v. 117, p. 7-16, 2013.

DREWNIAK L.; CIEZKOWSKA, M.; RADLINSKA, M.; SKLODOWSKA, A.; Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. **Journal of biotechnology**, v. 196, p. 42-41, 2015.

EKMEKYAPAR, F.; ASLAN, A.; BAYHAN, Y. K.; ÇAKIKI, A. Biosorption of Pb(II) by nonliving lichen biomass of *Cladonia rangiformis* Hoffm. **International journal environmental research**. v.6, p.417-424, 2012.

FADIGAS, F. S.; AMARA-SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia**, V. 61, p. 151-159. 2002.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O. & VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista brasileira de ciência do solo**, v23, p.991-996, 1999.

FLYNN, S. L.; SZYMANOWSKI, J. E. S.; FEIN, J. B. Modeling bacterial metal toxicity using a surface complexation approach. **Chemical geology**, v. 374, p. 110-116, 2014.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**. v.122, p. 109-119, 2004.

- GADD, G. M. Microbial interactions with metals/radionuclides: the basis of bioremediation. In: KEITH-ROACH, M. J.; LIVENS, F. R. **Interactions of microorganisms with radionuclides**. Elsevier Science. 2002, 400p.
- GUO, H.; LUO, S.; CHEN, L.; XIA, X.; XI, Q.; WEI, W.; ZENG, G.; LIU, C.; WAN, Y.; CHEN, J.; HE, Y. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. **Bioresource technology**, v. 101, p. 8599-8605, 2010.
- HILIHOR, R. M.; DIACONU, M. FERTU, D.; CHELARU, C.; SANDU, I.; TAVARES, T.; GAVRILESCU, M. Bioremediation of Cr (VI) polluted wastewaters by sorption on heat inactivated *Saccharomyces cerevisiae* Biomass. **International journal environmental research**. v. 7, p. 581-594, 2013.
- HUANG, F.; DANG, Z.; GUO, C. L.; LI, G.N.; GU, R. R.; LIU, H. J.; ZHANG, H. Biosorption od CD(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. **Colloids and surfaces**, v. 107, p. 11-18, 2013.
- HUANG, F.; GUO, C. L.; LI, G. N.; YI, X. Y.; ZHU, L. D.; DANG, Z. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism??. **Chemosphere**, v. 109, p. 134-142, 2014.
- HUANG, W.; LIU, Z. M. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactante-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristics and mechanism studies. **Colloid and surfaces**, v. 105, p. 113-119, 2013.
- JAFARZADE, M.; MOHAMAD, S.; USUP, G.; AHMAD, A. Heavy-metal tolerance and antibiotic susceptibility of red pigmented bacteria isolated from marine environment. **Natural resources**, v. 3, p. 171-174, 2012.
- JORQUERA, M. A.; HERNANDEZ, M.; MARTINEZ, O.; MARSCHNER, P.; MORA, M. L. L. Detection of aluminium tolerance plasmids and microbial diversity in the rhizosphere of plants grown in acidic volcanic soil. **European Journal**, v. 46, p. 255-263, 2010.
- KAVAMURA, V. N.; ESPOSITOO, E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 61-69, 2010.
- KERAMATI, P.; HOODAJI, M.; TAHMOURESPOUR, A.; Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. **African journal of microbiology research**, v. 5, p. 831-837, 2011.
- KIMYON, O.; DAS, T.; IBUGO, A.; KUTTY, A. K.; HO, K. K.; TEBBEN, J.; KUMAR, N.; MANEFIELD, M. *Serratia* secondary metabolite prodigiosin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development by producing reactive oxygen species that damage biological molecules. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1-15, 2016.
- KINOSHITA, H.; SOHMA, Y.; OHTAKE, F.; ISHIDA, M.; KAWAI, Y.; KITAZAWA, H.; SAITO, T.; KIMURA, K. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and

identification of mercury binding protein. **Research in microbiology**, v. 164, p. 701-709, 2013.

LEE, K. E. The functional significance of biodiversity in soils. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15. **Anais...** Acapulco: International Society Science, 1994. p. 168-182.

LI, M. T.; HAO, L. L.; SHENG, L. X.; XU, J. B. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. **Bioresource technology**, v. 99, p. 6878-6884, 2008.

LIMCHAROENSUK, T.; SOOKSAWAT, N.; SUMARNROTE, A.; AWUTPET, T.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; AUESUKAREE, C. Bioaccumulation and biosorption of  $Cd^{+2}$  and  $Zn^{+2}$  by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 322-330, 2015.

LU, W. B.; KAO, W. C.; SHI, J. J.; CHANG, J. S. Exploring multi-metal biosorption by indigenous metal-hyperresistant *Enterobacter* sp. J1 using experimental design methodologies. **Journal hazardous materials**. v. 153, p. 372-381, 2008.

MACHADO, M. D.; SANTOS, M. S. F.; GOUVEIA, C.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: The flocculation as a separation process. **Bioresource technology**. v.99, p. 2107-2115, 2008.

MAHOPATRA, B. R.; GOULD, W. D.; DINARDO, O.; KOREN, D. W. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: A review of molecular methods. **Mineral engineering**. v.24, p.709-718, 2011.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environmental international**. v.30, p. 261-278, 2004.

MCLEAN, J. S.; LEE, J. U.; BERIDGE, T. J. Interactions of bacteria and environmental metals, fine-grained mineral development, and bioremediation strategies. In: HUAND, P.M.; BOLLAG, J. M.; SENESI, N. **Interactions Between Soil Particles and Microorganisms**. IUPAC. 2002, 261p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal Lavras, 2006. 729p.

MUNOZ, A. J.; RUIZ, E.; ABRIOUEL, H.; GALVEZ, A.; EZZOUHRI, L.; LAIRINI, K.; ESPÍNOLA, F. Heavy metals tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. **Chemical engineering journal**, v. 210, p. 325-332, 2012.

NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 98, p. 1-7, 2013.

OBBARD, J. P.; JONES, K. C. The effect of heavy metals on dinitrogen fixation by *Rhizobium*-White clover in a range of long-term sewage sludge amender and metal-contaminated soils. **Environmental pollution**. v.79, p. 105-112, 1993.

OGER, C.; MAHILLON, J.; PETIT, F. Distribution and diversity of a cadmium resistance (*cadA*) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in Staphylococcal bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). **FEMS microbiology ecology**. v. 43, p. 173-183, 2003.

OKAFOR, N. **Environmental microbiology of aquatic and waste system**. Springer Science and Business Media. 2011, 307p.

OLIVEIRA, A. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A. LEITE, S. G. F. **Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da arte**. CETEM/MCT, 2008, 67p.

PRADHAN, S.; RAI, L. C. Biotechnological potential of *Mycrocystis* sp. in Cu, Zn and Cd biosorption from single and multimetallic system. **Biometals**, v. 14, p. 67-74, 2001.

QU, J.; REN, G.; CHEN, B.; FAN, J.; YOUNG, E. Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community diversity and enzyme activities of vicinal cropland. **Environmental Monitoring Assessment**. v. 182, p. 597-606, 2011.

QUINTELAS, C. Recuperação e reutilização de metais pesados. **Dissertação** (Mestrado em biotecnologia e bioengenharia). 2000. Universidade do Minho, Braga, Portugal. 2000.

REIS, K. C.; SILVA, C. F.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Bioaccumulation of Fe<sup>3+</sup> by bacteria isolated from soil and fermented foods for use in bioremediation process. **African journal of microbiology research**. v.8, p. 2513-2521, 2014.

REN, G.; JIN, Y.; ZHANG, C.; GU, H.; QU, J. Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb (II). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 117, p. 141-148, 2015.

ROMERO, E.; BENÍTEZ, E.; NOGALES, R. Suitability of wastes from olive-oil industry for initial reclamation of a Pb/Zn mine tailing. **Water, air, and soil pollution**, v. 165, p. 153-165, 2005.

SAHIN, Y.; ÖZTÜRK, A. Biosorption of chromium (VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Process biochemistry**. v.40, p.1895-1901, 2005.

SOUZA, M. M.; COLA, T. S.; BUCKER, F.; FERRÃO, M. F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. **International biodeterioration and biodegradation**, v. 110, p. 141-146, 2016.

TABARAKI, R.; NATEGHI, A.; AHMADY-ASBCHIN, S. Biosorption of lead (II) ions on *Sargassum ilicifolium*: Application of response surface methodology. **International biodeterioration and biodegradation**. v.93, p. 145-152, 2014.

THATOI, H.; DAS, S.; MISHRA, J.; RATH, B. P. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme of bioremediation of hexavalent chromium: A review. **Journal of environmental management**, v.146, p.383-399, 2014.

TIWARY, M.; DUBEY, A. K. Cypermethrin bioremediation in presence of heavy metals by a novel heavy metal tolerant strain, *Bacillus* sp. AKD1. **International biodeterioration and biodegradation**, v. 108, p.42-47, 2016.

TORTÓRA, G. J.; FUNK, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Artmed. 2012, 934p.

VELASQUEZ, L.; DUSSAN, J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. **Journal of hazardous materials**, v. 167, p.713-716, 2009.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and applied chemistry**. v.73, p. 1163-1172, 2001.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water research**. v. 41, p. 4017-4029. 2007.

VULLO, D. L.; CERETTI, H. M.; RAMIREZ, S. A. M.; ZALTS, A. Heavy metals and microorganisms in the environment: Taking advantages of reciprocal interaction. In: KIM, M. B. **Progress in environmental microbiology**, New York, Nova Science Publishers, Inc. CAP. 3, p. 111-151, 2008. 260p.

WANG, T.; SUN, H.; MAO, H.; ZHANG, Y.; WANG, C.; ZHANG, Z.; WANG, B. SUN, L. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of UV-mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by NovoGro biostimulation and changes of soil microbial community. **Journal of hazardous materials**, v. 278, p. 483-490, 2014.

WANG, Y.; PENG, B.; TANG, Z.; CHAI, L.; LIAO, Q.; ZHANG, Z.; LI, C. Bacterial community dynamics during bioremediation of Cr (VI)-contaminated soil. **Applied soil ecology**, v. 85, p. 50-55, 2015.

WANG, Y.; PENG, B.; YANG, Z.; CHAI, L.; LIAO, Q.; ZHANG, Z.; LI, C. Bacterial community dynamics during bioremediation of Cr (VI) – contaminated soil. **Applied soil ecology**. v.85, p. 50-55, 2015.

YANG, Z.; ZHANG, Z.; CHAI, L.; WANG, Y.; LIU, Y.; XIAO, R. Bioleaching remediation of heavy metal-contaminated soils using *Burkholderia* sp. Z-90. **Journal of hazardous materials**, v. 301, p. 145-152, 2016.

ZAKERI, F.; NOGHABI, K. A.; SADEGHIZADEH, M.; KARDAN, M. R.; MASSOMI, F.; FASHIDPOUR, M. R.; ATARILAR, A. *Serratia* sp. ZF03: an efficient radium biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. **Bioresource technology**, v. 101, p. 9163-9170, 2010.

ZHANG, J.; WANH, L.H.; YANG, J. C.; LIU, H.; DAI, J.L. Health risk to residents and stimulation to inherent bacteria of various heavy metals in soil. **Science of the environment**, v. 308, p. 29-36, 2015.

ZHENG, S.; HUANG, H.; ZHANG, R.; CAO, L. Removal of Cr (VI) from aqueous solutions by fruiting bodies of the jelly fungus (*Auricularia polytricha*). **Applied microbiology biotechnology**. v.98, p.8729-8736, 2014.

ZIRNSTEIN, I.; ARNOLD, T.; KRAWCZYK-BARSCH, E.; JENK, U.; BERNHARD, G.; ROSKE, I. Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine. **Microbiology open**. v.1, p. 83-94, 2012.

ZOUBOULIS, A. I.; LOUKIDOU, M. X.; MATIS, K. A. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. **Process biochemistry**. v.39, p. 909-916, 2004.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### Artigo 1

Impact of  $Pb^{2+}$  in growth and biologic activity of *Serratia marcescens* CCMA 1010 inoculant selected for wastewater treatment.

Elaborado de acordo com as normas do periódico Bioresource Technology.

### Artigo 2

Avaliação da remoção de  $Pb^{2+}$  por *Serratia marcescens* CCMA 1010 e expressão do *gene zntR*, regulador da bomba de efluxo *ZntA*.

Elaborado de acordo com as normas do periódico Journal of environmental management.

### Artigo 3

Eficiência de *Serratia marcescens* CCMA 1010 na bioissorção de metais em sistemas multicontaminados.

Elaborado de acordo com as normas do periódico Science of the Total Environment

## Artigo 1: Impact of Pb<sup>2+</sup> in growth and biologic activity of *Serratia marcescens* CCMA 1010 inoculant selected for wastewater treatment

### Abstract

Microorganisms isolated of contaminated areas showing important role in biorremediation process and heavy metal removal of environment, through of ions adsorption in surface of wall cell, accumulation inside of the cell or by production of reducing, complexing or precipitating substance in environment. Microorganisms are indicated in bioremediation process, because their high efficiency, low cost and low environment impact. Thus, the present study had the objective of select bacteria resistant at the Pb<sup>2+</sup> and evaluate the growth rate, biologic activity, influence about the functional groups of microbial cell wall and the presence of resistant genes. The bacteria were isolated of wastewater of coffee production and identified with: *Acetobacter indonesiensis* CCMA 1012; *Serratia marcescens* CCMA 1010; *Bacillus cereus* CCMA 985; *Acetobacter indonesiensis* CCMA 1009; *Serratia marcescens* CCMA 1013 and *Corynebacterium flavescens* CCMA 1046. *S. marcescens* CCMA 1010 had growth at 4.0 mM of Pb<sup>2+</sup>, showing growth rate and generation time similar at the control (without lead). However, the biologic activity decreased in first 180 minutes of Pb<sup>2+</sup> exposition stabilizing after this period. The spectrometry analysis of Fourier transform infrared (FTIR) showed the effect in functional groups of cell wall surface after the exposition at the Pb<sup>2+</sup>, with variation in amine and carboxyl group and ligation with oxygen, suggesting a possible mechanism of ions adsorption in cell wall surface. Among the genes *zntR*, *zntA* and *pbrA* only the *zntR* gene was detected, this gene is related at the mechanism of regulation of Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> inside the cell. *S. marcescens* CCMA 1010 was the isolate that presented potential of use in bioremediation process because the resistance in high Pb<sup>2+</sup> concentration, for staying stable during the exposition at the metal and have resistance genes.

**Key-words:** Lead; Bacteria; Biorremediation; *ZntR* genes

## 1 Introduction

The concentration of trace elements essential or not in environment has been increased by the industrial, agro industrial and mining activities. In these activities have the liberation of liquid or solid waste with high contents of Pb, Hg, Cd, Cr, Cu, Ni e Zn (Naik; Dubey, 2013; Mehrotra et al., 2016). Especially in wastewater of agricultural the presence of heavy metals is related in agricultural inputs, causing point pollution or being able to be dispersive in water table and bodies water (WHO, 2006).

Whereas that in many countries in development the economy is based in agro-industries, become necessary the caution with the disposition of wastewaters that, beside the trace elements non essentials, may contain too high concentrations of organics pollutants, doing with that autoctones microorganisms of these areas are resistant at the pollution and passable of used in bioremediation process (Pires, et al., 2017).

The lead, among heavy metal is a contaminant that even in low concentrations have been a problem because of your persistence in different trophic levels reaching the human population through of water supply or by contaminated foods (Benmassaoud et al., 2016; Bakirdere et al., 2016; WHO, 2006).

In face of the serious problem of the metals accumulate in environment, have been suggest strategies of bioremediation *in situ* or *ex situ*. The microorganisms presenting strategies against the concentrations of metals, since the adsorption by chemical bonds, efflux bomb and transformation of metals in a less toxic form. For the bioremediation process, clarify the strategies are be important because the microorganism beyond should be resistant, must unavailable the metal for environment, decreasing your toxicity (Chen et al., 2016; Ahemad and Malik, 2011; Newsome et al., 2015; Vijayaraghavan and Yun, 2008; Sheoran and Sheoran, 2006).

According studies of proteomic and transcriptomic combined with functional tests by mutagenese, the resistance at  $Pb^{2+}$  ions by microorganisms is related principally with the plasmidic *pbrUTRABCD* operon, that have the peculiarity of match functions of capitation, efflux and accumulation, but too with the *pbrR<sub>2</sub> cadA pbrC<sub>2</sub> and zntA* operon, both chromosomal and with just function of efflux, being that *pbrA* (one of the genes of *pbrUTRABCD* operon) encodes one ATPase (PbrA) of membrane transport of  $Pb^{2+}$  phylogenetically near of ATPases CadA and ZntA (Taghavi et al., 2009; Helmann, et al., 2007).

The CadA and ZntA are proteins homologous initially associated to membrane transport of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , but alright are proved have an important role in efflux of  $\text{Pb}^{2+}$  (Rensing et al. 1997; Binet e Poole 2000).

The *zntR* gene codify the regulator protein ZntR responsible by regulation of *zntA* gene, that produces the trans-membrane protein ZntA (Resing et al., 1997; Brocklehurst et al., 1999; Outten et al., 1999; Singh et al., 1999; Helmann, et al., 2007; Permina et al., 2006). Binet e Poole (2000) demonstrated that transcricional regulation of the *zntA* gene when induced by  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$  is too mediated by ZntR, unlike of the previous statements that referred the specificity that's regulators proteins for  $\text{Zn}^{2+}$ .

The resistance mechanisms are important for keep the homeostasis of metals in cell and are relationship to the type and concentration of element in the medium, due the level of toxicity of each element, because some metals like  $\text{Zn}^{2+}$ , despite being considered a micro-nutrient, in high concentration can be considered toxic (Limcharoensuk et al., 2015).

Thus, the present studies has the objective selected bacterias resistant at  $\text{Pb}^{2+}$  and propose possible mechanisms of resistance at the metals that can infer in efficiency of bioremediation influenced by growth rate, biologic activity, influence about the functional groups of microbial cell wall and presence of resistant genes.

## 2 Material and methods

### 2.1 Bacterial growth in diferents concentrations of $\text{Pb}^{2+}$

The microorganisms tested was isolated of wastewater of coffee processing and belong at the Culture Collections of Agricultural Microbiology (CCMA/UFLA, Brazil) and presented characteristics of resistance at process of treatment of wastewater (Pires et al., 2017), being: *Acetobacter indonesiensis* CCMA 1012; *Serratia marcescens* CCMA 1010; *Serratia marcescens* CCMA 1013; *Bacillus cereus* CCMA 985; *Acetobacter indonesiensis* CCMA 1009 and *Corynebacterium flavescens* CCMA 1046.

The microorganisms was reactivated in nutrient agar (NA: 3% of yeast extract, 5% of peptone and 15% of agar), in 28°C/24 h. After this period was transferred utilizing simple streak for plates with NA added of lead nitrate ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) (0 a 6 mM). The growth of isolates was evaluated after 24h, being observed by one period up to 7 days. The appearance of colonies was considered with positive growth (Castro et al., 2015). The medium without of lead nitrate solution was considered with positive control of growth. The tests was realized in triplicate.

## 2.2 Effect of $Pb^{2+}$ in growth kinetic of *S. marcescens* CCMA 1010

Among the isolated tested *S. marcescens* CCMA 1010 was the presented higher growth, being then selected for realization of the growth kinetic. The microorganisms was reactivated in medium nutrient broth (NB) (3% of yeast extract and 5% of peptone) in rotation of 150 rpm at 28°C in shaker until reach the population of  $10^9$  CFU ml<sup>-1</sup>. The NB medium containing 4 mM of  $Pb^{2+}$  was inoculated in 1:1000 (v.v) proportion in shaker at 150 rpm at 28°C. The bacterial growth was monitored by direct plating every 4 h by one period of 24h. Every experiment was realized in triplicate. The positive control consisted in cultivate in same conditions without de presence of  $Pb^{2+}$ .

The generation time (g) was calculated utilizing the equations (1) and (2):

$$g = \frac{t}{n} \quad (1)$$

$$n = 3,3 \times (\log N - \log N_0) \quad (2)$$

g= generation time

t= time interval for reach the estationary phase

log N = number of CFU in log of the end of exponential phase

log  $N_0$ = number of CFU in log of the start of inoculation.

n= number of generations formated in time intervale.

## 2.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The possible mechanism of interaction between *S. marcescens* CCMA 1010 biomass and  $Pb^{2+}$  was evaluate utilizing the spectroscopy analyses in infrared region with Fourier transform (FTIR). The bacterial biomass was exposed at  $Pb^{2+}$  (4.0 mM) during one period of 24h. The biomass, before and after exposition was dry in kiln and added KBr, utilizing 1% (p/p) of sample. The spectral band utilized was 400-4000 cm<sup>-1</sup>, with 32 numbers of scans and resolution of 4 cm<sup>-2</sup>, utilizing the spectrometer FTS FTS 3000 Excalibur Digilab with Fourier transform.

## 2.4 Impact of Pb<sup>2+</sup> presence in bacterial activity

The impact of Pb<sup>2+</sup> (4.0 mM) on the biologic activity of bacterial cell was evaluate by biospeackle laser technique. For this, the cell was cultivated in 10 ml of NB until reach one population of 10<sup>9</sup> CFU/ml, with agitation of 150 rpm/28°C by 24h. After this period, the biomass was centrifuged at 7155.2 g/ 10 min. The biomass was resuspended in 1 ml of peptone water 0,1% (p/v), and inoculated in water artificial contaminated with Pb<sup>2+</sup> (4.0 mM) and evaluate the biological activity by one period of 6 h, in times of 0, 60, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes. The positive control constituted in bacterial growth in absence of Pb<sup>2+</sup> and the control of technique consisted of reading of steril distillated water.

The reading was realized in stereomicroscope coupled with digital camera. One aliquot of 0.1 ml of sample was deposited in glass plate, utilizing for lighting one extern laser emitter of 635<sub>nm</sub>, pointing directly for samples conform methodology utilizing by Viana et al. (2017).

For images obtain, was utilized the software MATLAB<sup>®</sup>. In total, was obtained 128 images with one gap of 3 seconds by replic, utilizing 3 repetitions. The experiment was realized in completely randomized design. For the numeric values generated by software, it was one variance analyses and media test for different treatments, and regression analyses for different times, utilizing the statistic software Sisvar (Ferreira et al., 2008).

## 2.5 Identification of resistan genes

### 2.5.1 Identification of *pbrA*, *zntR* and *zntA* genes

The primers for *pbrA*, *zntR* and *zntA* genes (table 1) was design in conservated regions in according with the sequences obtained in database of National Center of Biotechnology Information (NCBI) utilizing with model the date of complete sequencing the genome of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* Db11 (GenBank assembly accession: GCA\_000513215.1) (Iguchi et al., 2014). These genes are involved in regulation (*zntR*) and efflux (*pbrA* and *zntA*) of ions for extracellular medium.

Table 1. Primers (forward and reverse) for genes amplification (*ZntR*, *PbrA* and *ZntA*) of *S. marcescens* CCMA 1010

Primers	Sequence (5' - 3')	TM °C
ZntR forward	ACGCCTGATACCGTGCGTTACTA	59,5
ZntR reverse	GTATGGGCAGTGCCACAGCA	59,4
PbrA forward	CGATACGTTACTACGAACAGCAGGG	59,4
PbrA reverse	ACGCACCGGCCTGTTTTTCATT	59,8
ZntA forward	CCGGACGAGGAAAGCGACAG	60
ZntA reverse	GGTGATCAGGAAGACCCCTTTCA	57,8

### 2.5.2 Sequencing of *zntR* gene

Because the amplification of *zntR* gene with described above was design one pair of primers for flank the gene. Thus allowing sequencing of its the totality for comparisons futures and functional studies. The sequence of primers was: ZntR-complet-Forward: GGAACATCGATTGCGTCAGG (TM: 59,35 °C) and ZntR-complet-Reverse: ATGGCGTTATCTTGAATCTGGC (TM: 59,12 °C), with goals of amplifier one product of 649 bp. The product of PCR was sequencing utilizing the Sanger methods and the nucleotide sequences analyses in software Bioedit version 7.2.5, comparing later with the sequence of gene deposited in database of NCBI.

### 2.5.3 PCR conditions

The genomic DNA of *S. marcescens* CCMA 1010 was extracted utilizing one kit of commercial extraction for soil Norgen<sup>®</sup>.

For PCR reactions was utilized 5 µL of buffer containing MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,2 µL GoTaq<sup>®</sup> DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 2 µL of each primer (10 pmol/ µL ), 2 µL of DNA (8.5 ng/ µL) and 37 µL of Mili-Q water sterile. The amplification occurred in termocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) with programation at 94°C by 3 minutes followed of 57°C by 30 seconds and 72 °C by 2 minutes, and one final cycle of 5 minutes at 72°C.

The PCR products was subject at eletrophoresis in gel with 1% of agarose and the bands visualize by ultraviolet illumination.

### 3 Results

#### 3.1 Evaluation of bacterial growth of strains isolated in contact with Pb<sup>2+</sup>

The 6 strains tested showing growth, being that major growth in up to 0.5 mM of Pb<sup>2+</sup>, with exception of *S. marcescens* CCMA 1010 that stood out by growth in up to 4.0 mM (882 mg L<sup>-1</sup> of Pb<sup>2+</sup>) (table 2). Therefore these isolated was considered with lead-resistant. The resistance to Pb<sup>2+</sup> by microorganisms showed strain dependence, one time with *S. marcescens* CCMA 1013 not showed growth in concentrations upward of 0.5 mM.

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of different strains isolated of wastewater of coffe processing in medium NA under different lead concentrations.

Strains	mM of Pb <sup>2+</sup>													
	0	0.1	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6
<i>A. indonesiensis</i> CCMA 1012	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i> CCMA 1010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> group CCMA 985	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. indonesiensis</i> CCMA 1009	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i> CCMA 1013	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. flavescens</i> CCMA 1046	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positive growth in culture medium; -: negative growth in culture medium.

#### 3.2 Evaluate of Pb<sup>2+</sup> influence in celular growth of *S. marcescens* CCMA 1010

*S. marcescens* CCMA 1010 showed growth even in medium containing 4.0 mM of Pb<sup>2+</sup>, being possible to observe one population of proximally 9.5 CFU/ml in the end of 24h, value near to control (9.7 CFU/ml). The cell generation time (g) exposed to Pb<sup>2+</sup> was lightly larger (1.44/h) than in control (1.28/h), presented stabilization of growth in about 12 h of cultivation (figure 1).

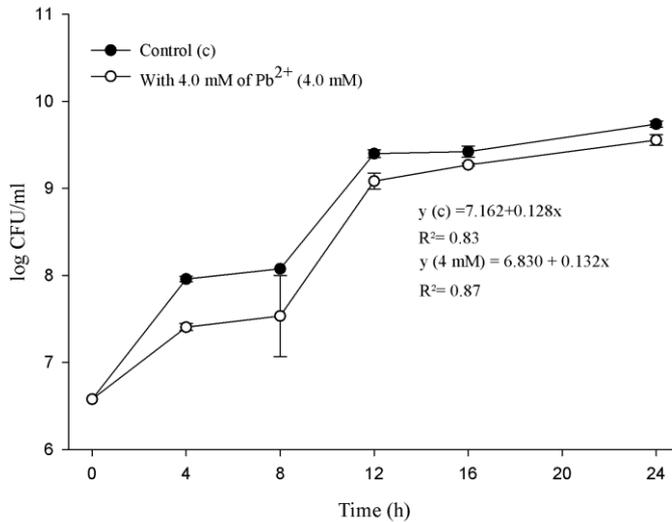


Figure 1. *S. marcescens* CCMA 1010 growth in presence of Pb<sup>2+</sup> (4.0 mM) in artificial media contaminated comparing with control growth (without lead).

### 3.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The difference observed between FTIR spectrum of bacterial cell, after and before exposition to Pb<sup>2+</sup>, allows infer about the interactions of metal with functional groups presents in surface of cell wall (figure 2). The reactivity occurred in peak related at C-O group (1000 cm<sup>-1</sup>) and asymmetric variation in areas below of 700 cm<sup>-1</sup> that can indicate  $\delta(M-O)$  e  $\delta(O-M-O)$  (M=Metal) bounds with oxygen or metal bound with nitrogen.

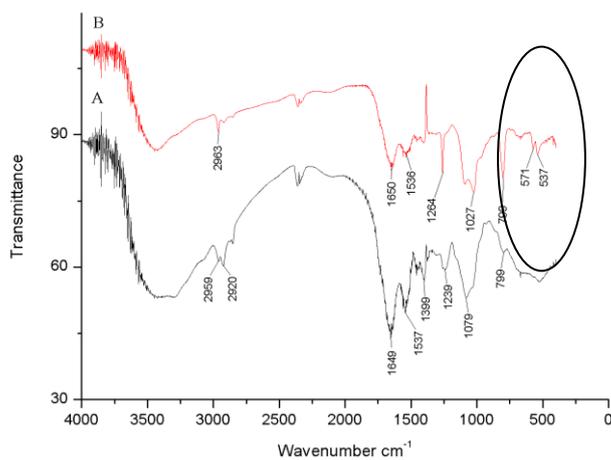


Figure 2. FTIR spectrum of *S. marcescens* CCMA 1010 cell A) control (without Pb<sup>2+</sup>) and B) after exposition of biomass in 4.0 mM of Pb<sup>2+</sup>.

### 3.4 Biologic activity utilizing biospeckle laser technique

The results of biologic activity was obtained of images analyses converted in numeric values (table 3). The presence of 4.0 mM of  $Pb^{2+}$  affected the biologic activity immediately after the contact of  $Pb^{2+}$ , presented one decrease of 34.8% of activity in cell exposed to  $Pb^{2+}$  (5.34) in relation to biomass activity in control treatment (8.19), keeping the difference of activity in until 180 minutes of exposition (table 3).

Table 3. Evaluate of biologic activity of *S. marcescens* CCMA 1010 biomass exposed to  $Pb^{2+}$  utilizing the biospeckle laser technique

Treatments	Minutes						
	0	60	120	180	240	300	360
Control	8.19 a	6.78 a	4.89 a	5.67 a	4.06 a	4.12 a	3.64 a
With lead	5.34 b	4.97 b	3.33 b	3.47 b	3.2 a	3.12 a	3.2 a
Water control	2.26 c	1.94 c	2.21 c	2.44 c	2.17 b	1.91 b	1.95 b

VC (%) 16.22

Avarege followed of same leter, in column, not difference each other by Scott-Knott teste, considering 5% of statistic significance. VC (%) – Variation coefficient.

In relation of exposition time was observed one decrease of biologic activity in until 180 minutes (proximally 40%), remaining stable until 360 minutes (figure 3).

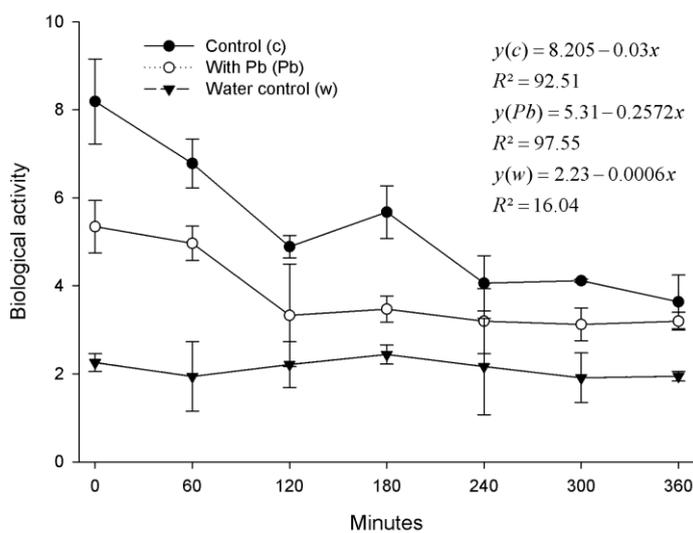


Figure 3. Biologic activity of *S. marcescens* CCMA 1010 cell during the exposition to  $Pb^{2+}$ , control and water control with destilated water, analyse by biospeckle laser technique.

### 3.5 Analyse of resistant genes presence and complet sequencing of *zntR* gene

The PCR product utilizing the primers for *zntR*, *zntA* and *pbrA* genes (table 1) has been observed in figure 4, where was obtained only the amplification of *zntR* gene, with amplification of one fragment with proximally 320 bp. The primers for the complet sequencing of *zntR* gene amplified one fragment with proximally 649 bp, with after the sequencing showed homology at sequence deposited in database of NCBI.

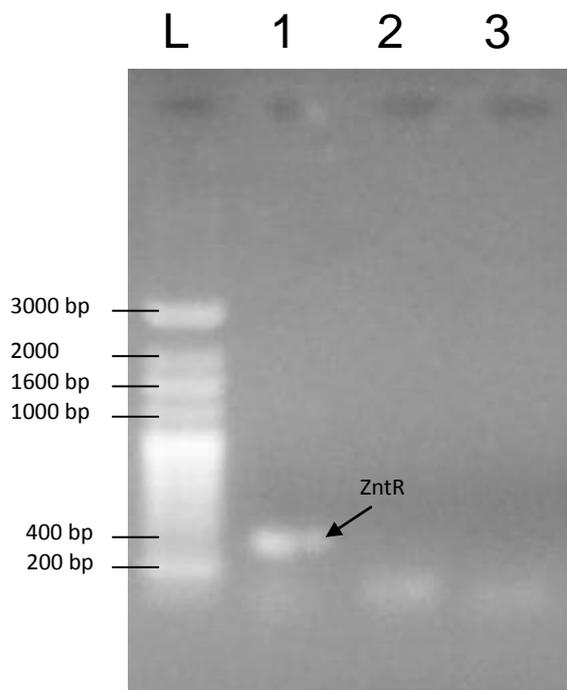


Figure 4. Visualization of agarose gel (1%) with PCR products for *zntR* (1), *zntA* (2) and *pbrA* (3) genes and DNA ladder (L).

## 4 Discussion

The experiment realized evaluates the resistance and the interaction between microbial biomass, in special *S. marcescens* CCMA 1010 and the  $Pb^{2+}$  ions. The growth of all strain isolated evaluated, even in low concentration of  $Pb^{2+}$ , can be attributed, among others factor, at origin these bacteria with many pollutants, that favors the maintenance of resistance systems in microbial populations (Limcharoensuk et al., 2015). Pires et al. (2017) observed that *S. marcescens* CCMA 1010 persisted during the wastewater treatment of coffee

production, suggesting its participation in organics compounds degradations beyond presented resistance to high concentrations of  $\text{Cd}^{2+}$  (proximally to  $130 \text{ mg L}^{-1}$ ) found in the waste, thus showing, potential use with inoculants in treatment of wastewater of coffee production.

Bacteria of *Serratia* genus already was related previously with resistant to heavy metals like lead, molybdenum, uranium, nickel, cadmium and zinc. The efficiency that species in bioremediation it's due to biosorption process by biomass or even in metal precipitation process in phosphate form generated because the metabolic activity, or yet to oxidation-reduction process as the case of Mo(VI) ion reduction by strain of *Serratia* sp. (Cristani et al., 2012; Rahman et al., 2009; Kumar et al., 2011; Nwagwu et al., 2017).

*S. marcescens* CCMA 1010 and CCMA 1013 presented differences in growth when exposit to  $\text{Pb}^{2+}$ . The literature report that some strategies of metal removal can be related to genic control by plasmids, evidencing that microorganisms of same species, but different strains can showed differentiated resistance to metals (Naik and Dubey 2013; Drewniak, et al., 2015; Nies 2003; Jorquera et al. 2010).

Genes of *Mer* family initially identified with Hg resistance genes regulator also are responsible by regulation of resistance mechanisms to  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{1+}$ , doing part these family, the genes *merR*, *pbrR*, *zntR*, *cadR* and *cueR* which presented function of transport regulation and resistance at metals by cell (Helmann, et al., 2007). The presence of these genes regulators in microorganisms provides mechanisms of environmental adaptability, due the lower of oxidative stress caused in cell (Wang et al., 2017).

The *zntR* gene regulate the transcription of *zntA* gene, which produced the protein ATPase trans-membrane ZntA that have function of  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  efflux (Binet et al., 2000). Thus, the identification of *zntR* gene in *S. marcescens* CCMA 1010 suggest that efflux bomb ZntA have one important role in persistence that's bacteria in wastewater with high concentration of  $\text{Cd}^{2+}$ , like observed by Pires et al. (2017) and too in resistance in high concentration of  $\text{Pb}^{2+}$  like observed in this work.

Lu et al. (2016) demonstrated the function of the *zntA* gene in *Sinorhizobium meliloti*, which present essential function in transport of  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ , assisting in  $\text{Zn}^{2+}$  homeostasis process and detoxification of cell by  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ .

In *S. marcescens* RSC-14 sequencing was identified the *czcD* gene which codified one protein of resistance to  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , responsible by one efflux system of these ions for extracellular medium, besides present others genes, that code proteins of resistance also to arsenic, forming one efflux system of these metal, and resistance mechanism to oxidative

process of  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{1+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  through codification of dismutase superoxide (Khan et al., 2017).

In *S. marcescens* sequencing realized by Igushi et al. (2014), utilized with reference in present work, was possible identify the *pbrA*, *zntA* and *zntR* genes, which presenting function of regulation and transport to  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ . However, don't have work of identification of these genes in others strains of *S. marcescens* nor related at expression of these gene in different concentration of metal in this specie.

The exposition to  $Pb^{2+}$  caused little vibrational changes in functional groups of *S. marcescens* CCMA 1010, showing changes in group carboxyl region and in region below to  $700\text{ cm}^{-1}$ , that present characteristics of asymmetric elongation vibrational. This is characteristics of one bound of  $Pb^{2+}$  ion with oxygen or with nitrogen present in surface of cell wall (Kazy et al., 2009; Munoz et al., 2009), making possible the transformation of metal in one form less soluble (Martins et al., 2010; Munoz et al., 2012).

Same *S. marcescens* CCMA 1010 presenting resistance to  $Pb^{2+}$  is possible observe effect of metal in biomass both by higher of generation time as decrease of biologic activity (Viana et al., 2017; Braga et al., 2005).

Both in test with  $Pb^{2+}$  as in control without  $Pb^{2+}$  the biologic activity star high and decrease until stabilized from 120 minutes until 360 minutes (figure 3). This is probably are related with bacterial growth in cultures: both in  $Pb^{2+}$  presence as without  $Pb^{2+}$  observed that in first hours have one growth, after have one stationary phase until 8 hours and after that have a new growth phase until 12 hours and posteriorly new stationary phase (figure 3). The stabilization of biologic activity from 120 minutes seems to be related with first stationary phase in bacteria growth profile in figure 3, independent of presence or absence of  $Pb^{2+}$ .

In other hand, the greater biologic activity initial in culture without  $Pb^{2+}$  in comparison with culture with  $Pb^{2+}$  (table 3 and figure 3) also justifies the decrease more accentuated of growth curve of control without  $Pb^{2+}$  than in the test with  $Pb^{2+}$  observed at start, in first phase of growth (figure 3). The fact of have every less biologic activity and initial growth in presence of  $Pb^{2+}$  can be related with activation of one serial of genes related to mechanisms that regulate the homeostasis equilibrium of this ions and the resistance of the same, because the contact with metal induce the expression of genes related with its absorption, storage and efflux of the intracellular medium (Helmann, et al., 2007). The presence of heavy metals can affect directly the growth, changes in the cellular morphology and cause changes in the cellular growth phases, like the increase in the lag phase (Huang et al., 2014; Guo et al., 2010; Naik and Dubey 2013).

## Conclusion

The isolate of *S. marcescens* CCMA 1010, presented resistance to  $Pb^{2+}$  until 4.0 mM, can possible identify the *zntR* gene, responsible by regulation of  $Pb^{2+}$  transport that confer one possible mechanism of resistance by bacteria. However, in this concentrations was demonstrated effect in cellular growth and in biologic activity. The experiment of FTIR demonstrated changes in functional groups of surface of wall cell caused by  $Pb^{2+}$  exposition, principally in carboxyl group and ligation of oxygen or nitrogen, suggesting one possible mechanisms of ion adsorption in the surface of bacterial wall cell, strategy that's can utilized by microorganisms for  $Pb^{2+}$  biosorption in bioremediation process.

## Acknowledgements

The authors thank to CAPES, CNPq, FAPEMIG, CCMAR (through the project UID/Multi/04326/2013) and project BIOMETAL DEMO (European Union's Seventh Framework Programme, FP7/2007-2013, under grant agreement n° 619101) for financial support.

## References

- Ahemad, M., Malik, M., 2011. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriology journal*, 1, 1-10.
- Bakirdere, S., Bolucek, C., Yaman, M., 2016. Determination of contamination levels of pb, cd, cu, ni and mn caused by former lead mining gallery. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-7.
- Benmessaoud, I. R., Mahul-mellier, A. L., Horváth, E., Maco, B., Spina, M., Lashuel, H. A., Forro, L., 2016. Health hazards of methylammonium lead iodide based perovskites: cytotoxicity studies. *Toxicology research*, 5, 407-419.
- Binet, M. R. R., Poole, R. K., 2000. Cd(ii), Pb(ii) and Zn(ii) ions regulate expression of the metal-transporting p-type atpase znta in *escherichia coli*. *Febs letters*, 473, 67-70.
- Braga, R. A., Rabela, G. F., Granato, L. R., Santos, E. F., Machado, J. C., Arizaga, J., Rabal, H. J., Trivi, M. R., 2005. Detection off fungi in beans by laser biospeckle technique. *Journal of agricultural engineering research*, 91, 465-469.

- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L., Morby, A. P., 1999. Znr is a zn(ii)-responsive mer-like transcriptional regulator of znta in escherichia coli. *Molecular microbiology*, 31, 893–902.
- Castro, A. B., Machado, R. A., Moreira, I. V., Manaia, C. M., 2015. Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Science of the total environment*, 520, 367-372.
- Chen, Z., Pan, X., Chen, H., Guan, X., Lin, Z., 2016. Biomineralization of Pb(ii) into pb-hydroxyapatite induced by *Bacillus cereus* 12-2 isolated from lead-zinc mine tailings. *Journal of hazardous material*, 301, 531-537.
- Cristani, M. T., Naccari, C., Nostro, A., Pizzimenti, A., Trombetta, D., Pizzimenti, A., 2012. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). *Environmental science pollution research*, 19, 161-168.
- Drewniak, L., Ciezkowska, M., Radlinska, M., Skolodowska, A., 2015. Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *Journal of biotechnology*, 196, 42-51.
- Ferreira, D. F., 2008. Sisvar: um programa para análise e ensino de estatística. *symposium*. 6, 36-41.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X.; Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J., He, Y., 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *bacillus* sp. 114. *Bioresource technology*, 101, 8599-8605.
- Helmann, J. D., Soonsanga, S., Gabriel, S., 2007. Metalloregulators: arbiters of metal sufficiency. in: nies, d. s. *molecular microbiology of heavy metals*, 446 p.
- Huang, F., Guo, C. L., Lu, G. N., Yi, X. Y., Zhu, L. D., Dang, Z., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *bacillus cereus* rc-1 and its mechanism. *Chemosphere*, 109, 134-142.
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Korokawa, K., Oshima, K., Hattori, M., Parkhill, J., Sebahia, M., Coulthurst, S. J., Gotoh, N., Thomson, N. R. Ewbank, J. J., Hayashi, T., 2014. Genome evolution and plasticity of *serratia marcescens*, na important multidrug-resistant nosocomial pethogen. *Genome biology evolution*, 6, 2096-2110.
- Jorquera, M. A., Hernández, M., Matínez, O., Marschner, P., Mora, M. L., 2010. Detection of aluminium tolerance plasmids and microbial diversity in the rhisosphere of plants grown in acidic volcanic soil. *European journal of soil biology*, 46, 255-263.

- Kazy, S. K., Das, S. K., Sar, P., 2006. Lanthanum biosorption by a *pseudomonas* sp.: equilibrium studies and chemical characterization. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 33, 773-783.
- Kazy, S. K., Souza, S. F., Sar, P., 2009. Uranium And Thorium Sequestration By A *Pseudomonas* Sp.: Mechanism And Chemical Characterization. *Journal of hazardous materials*, 163, 65-72.
- Khan, A. R., Park, G. S., Asaf, S., Hong, S. J., Jung, B. K., Hin, J. H., 2017. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* rsc-14: a plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *plos one*, 12, 1-17.
- Kumar, R., Achatya, C., Joshi, A. R., 2011. Isolation and analyses of uranium tolerant *Serratia marcescens* strains and their utilization for aerobic uranium U(VI) bioadsorption. *The journal of microbiology*, 49, 568-574.
- Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C., 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 322-330.
- Lu, M., Li, Z., Liang, J., Wei, Y., Rensing, C., Wei, G., 2016. Zinc resistance mechanisms of p<sub>18</sub>-type atpase in *Sinorhizobium meliloti* ccnwsx 0020. *Nature*, 1,1-12.
- Martins, M., Faleiro, M. L., Costa, A. M. R., Chaves, S., Tenreiro, R., Matos, A. P., Costa, M. C. 2016. Mechanism of uranium (VI) removal by two anaerobic bacterial communities. *Journal of hazardous materials*, 184, 98-96.
- Mehrota, A., Kundu, K., Sreekrishnan, T. R., 2016. Decontamination of heavy metal laden sewage sludge with simultaneous solids reduction using thermophilic sulfur and ferrous oxidizing species. *journal of environmental management*, 167, 228-235.
- Munoz, A. J., Ruiz, E., Abriouel, H., Galvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K., Espíndola, F. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: identification and evaluation of its potential for biosorption. *chemical engineering journal*, v. 210, p. 325-332, 2012.
- Naik, M. M., Dubey, S. K., 2013. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 1-7.
- Newsome, L., Morris, K., Lloyd, J., 2015. Uranium biominerals precipitated by and environmental isolate of *Serratia* under anaerobic conditions. *Plos one*, 10, 1-14.
- Nies, d. h., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *Fems microbiology reviews*, 27, 313-339.

- Nwagwu, E. C., Yilwa, V. M., Egbe, N. E., Onwumere, G. B., 2017. Isolation and characterization of heavy metal tolerant bacteria from panteka stream, Kaduna, Nigeria and their potential for bioremediation. *African journal of biotechnology*, 16, 32-40.
- Outten, C. E., Outten, F. W., O'halloran, T., 1999. DNA distortion mechanism for transcriptional activation by zntR, a Zn(ii)-responsive merR homologue in *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry*. 274, 37517–37524.
- Permina, E. A., Kazakov, A. E., Kalinina, O. V., Gelfand, M. S., 2006. Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in eubacteria. *BMC microbiology*, 6, 1-11.
- Pires, J. F., Cardoso, L. S., Schwan, R. F., Silva, C. F., 2017. Diversity of microbiota found in coffee processing wastewater treatment plant. *World journal and biotechnology*, 33, 1-14.
- Rahman, M. F. A., Shukor, M. Y., Suhali, Z., Mustafa, S., Shamaan, N. A., Syed, M. A., 2009. Reduction of Mo (VI) by the bacterium *Serratia* sp. strain dry5. *Journal of environmental biology*, 30, 65-72.
- Rensing, C., Mitra, B., Rosen, B. P., 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(ii)-translocating p-type atpase. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 94, 14326–14331.
- Sheoran, A. S., Sheoran, V., 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. *Minerals engineering*, 19, 105-116.
- Taghavi, S., Lesaulnier, C., Monchy, S., Wattiez, R., Mergeay, M.; Lelie, D. V. D., 2009. Lead (ii) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: Interplay between plasmid and chromosomally-located function. *Antonie van leeuwenhoek*, 96, 171-182.
- Viana, D. C.; Pires, J. F.; Braga, R. A., 2017. Biospeckle laser technique applied for estimating disinfection accomplishment of wastewaters subjected to chlorination. *Process safety and environmental protection*, 109, 670-676.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y. S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26, 266-291.
- Wang, T., Chen, K., Gao, F., Kang, Y., Chaudhry, M. T., Wang, Z., Wang, Y., Shen, X., 2017. *ZntR* positively regulates *t6ss4* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of microbiology*, 55, 448-456.
- World Health Organization, guidelines for drinking-water quality. 2006, 595 p.

## **Artigo 2: Avaliação da remoção de $Pb^{2+}$ por *Serratia marcescens* CCMA 1010 e expressão do gene *ZntR*, regulador da bomba de efluxo *ZntA***

### **Resumo**

Microrganismos são importantes ferramentas biotecnológicas para descontaminação de águas residuais com metais pesados, pois apresentam alta eficiência, baixo custo e baixo impacto ambiental. Entretanto, mesmo sendo consolidado o conhecimento das aplicações biotecnológicas dos microrganismos nos processos de biorremediação, ainda é necessário otimizar as condições de remoção, avaliar os processos de interação dos metais com a biomassa microbiana, bem como os efeitos abióticos que podem interferir na mobilidade dos metais no meio. Nesse sentido, o presente trabalho estudou a capacidade de remoção do chumbo em meio de cultura LB e em água utilizando *Serratia marcescens* CCMA 1010, e a expressão do gene *ZntR* em resposta ao aumento da concentração dos íons de  $Pb^{2+}$ . Nos ensaios de remoção na solução de água e  $Pb^{2+}$  detectou-se 100% de remoção do  $Pb^{2+}$ . Entretanto, do meio de cultura LB observou-se baixa taxa de eficiência de remoção do íon metálico ( $\cong 30\%$ ), utilizando a biomassa ativa ou inativa. O gene *ZntR* foi mais expresso com o aumento da concentração dos íons de  $Pb^{2+}$  no meio LB. Assim, a biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 apresentou potencial de utilização em sistemas de tratamento de águas residuais contaminadas com  $Pb^{2+}$  devido a eficiência de remoção pela biomassa, baixa exigência nutricional e resistência a altas concentrações de  $Pb^{2+}$ .

**Palavras-chave:** Chumbo, *ZntR*, bactéria, biorremediação.

## 1. Introdução

O controle de poluições ambientes principalmente relacionados a metais pesados é um grande desafio para as industriais, devido ao comprometimento da qualidade ambiental de áreas impactadas e do entorno. Assim, considerando que há um aumento da preocupação com a preservação e manutenção do ambiente, devem ser propostas alternativas viáveis e de baixo custo para tratamento desses resíduos, evitando que estes dejetos se acumulem no meio ambiente de forma inadequada (Gavrilescu et al., 2015). Nesse sentido, a utilização de microrganismos para a biorremediação é uma alternativa viável aos métodos físicos e químicos, que normalmente podem apresentar um alto custo ou baixa eficiência (Fu and Wang, 2011).

A biomassa microbiana pode apresentar tanto mecanismos de bioacumulação dos metais no interior das células ou na região periplasmática, como pode permitir a precipitação e volatilização de compostos metálicos, ou mesmo adsorção dos metais na superfície da parede celular, podendo nesse caso, ser utilizada tanto a biomassa viva quanto morta (Huang et al., 2013; Ahemad and Kibret, 2013). Nos processos que utilizam microrganismos vivos, diversos genes podem estar correlacionados com os mecanismos de biossorção dos metais pelas células, conferindo tanto resistência ao microrganismo, bem como auxiliando nos processos de remoção do metal, possibilitando assim, a aplicação desses microrganismos no tratamento de resíduos contaminados (Giovanella et al., 2017).

*Serratia marcescens* já foram utilizadas em pesquisas para biorremediação de metais pesados, e apresentam potencial de aplicação para a remoção de diversos ions metálicos como Pb, Zn, Cd, Cr e Ni (Cristani et al., 2012; Nwagwu et al., 2017). Em relação à resistência de *S. marcescens* aos metais, já foram identificados diversos genes como o *zntR*, *zntA*, *cadR* e *czcD* que controlam as concentrações do Cd, Pb e Zn, além de outros genes de resistência ao  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{1+}$  e  $Fe^{2+}$  (Khan et al., 2017; Igushi et al., 2014). O gene *zntR* apesar de inicialmente ser relacionado ao controle do  $Zn^{2+}$  nas células, há também relação com o controle do  $Pb^{2+}$  e do  $Cd^{2+}$  (Helmann et al., 2017).

Segundo estudos de proteômica e transcriptômica combinados com testes funcionais por mutagenese, a resistência a ions  $Pb^{2+}$  pelos microrganismos está principalmente relacionada com o operão plamídico *pbrUTRABCD*, que tem a peculiaridade de combinar funções de captação, efluxo e acumulação, mas também com o operão *pbrR2 cadA pbrC2* e o operão *zntA*, ambos cromossômicos e com função apenas de efluxo; sendo que o *pbrA* (um

dos genes do operão *pbrUTRABCD*) codifica uma ATPase (PbrA) de transporte membranar de  $Pb^{2+}$  filogeneticamente próxima das ATPases CadA e ZntA (Taghavi et al., 2009; Helmann, et al., 2007). A CadA e a ZntA são proteínas homologas inicialmente associadas ao transporte membranar de  $Cd^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , mas também já indicadas como tendo um papel importante no efluxo de  $Pb^{2+}$  (Rensing et al. 1998a,b ; Binet e Poole, 2000).

O gene *zntR* codifica a proteína reguladora ZntR tipo MerR responsável pela regulação do gene *zntA*, o qual produz a proteína ATPase transmembranar ZntA (Resing et al., 1997; Brocklehurst et al., 1999; Outten et al., 1999; Singh et al., 1999 ; Helmann, et al., 2007; Permina et al., 2006). Também o gene *ZntR*, apesar de inicialmente ser relacionado apenas ao controle do  $Zn^{2+}$  nas células, está relacionado com o controle do  $Pb^{2+}$ . Binet e Poole (2000) confirmaram que a regulação transcricional do gene *zntA* quando induzido por  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou  $Pb^{2+}$  é também mediada pela proteína reguladora ZntR.

Recentemente, a proteína reguladora ZntR foi também indicada como reguladora da expressão de genes do sistema de secreção tipo VI (T6SS) em *Yersinia pseudotuberculosis* (Wang e Shen, 2017). O sistema T6SS está provavelmente envolvido em diferentes funções no ciclo de vida das bactérias e é regulado por vários reguladores (Bingle et al., 2008; Boyer et al., 2009). Em *Y. pseudotuberculosis*, foi descoberto que o T6SS4 importa iões  $Zn^{2+}$  do ambiente para as células bacterianas, o que alivia a acumulação de radicais hidroxilo induzidos por múltiplos fatores de stress (Wang et al., 2015). Microrganismos que possuem esse gene podem apresentar viabilidade na aplicação no tratamento de resíduos contaminados, devido à proteção contra o estresse oxidativo causado pelos metais (Wang et al., 2017).

O chumbo é um elemento altamente contaminante mesmo em baixas concentrações, sendo encontrado em tintas, gasolina, sistema de distribuição de água e alimentos contaminados pelos resíduos das atividades industriais ou agroindustriais (Chakraborty et al., 2017). Normalmente, a remoção desse metal em resíduos está relacionada à métodos de precipitação química, floculação e coagulação, flutuação, troca iônica e membranas para filtração (Fu and Wang, 2011). Entretanto, estudos vêm demonstrando o potencial da biossorção utilizando fungos, bactérias ou algas (Bahadir et al., 2007; Ilhan et al., 2004; Tabaraki et al., 2014). Os preços para a utilização de biossorbentes para remoção de metais podem variar de \$ 0.2 a \$ 5.0 por Kg, enquanto a utilização de resinas para troca iônica pode variar entre \$ 10.0 a \$ 40.0 por Kg (Chen et al., 2012).

Os sistemas de remoção de metais utilizando biomassa microbiana é um processo que se mostra eficiente no tratamento de águas contaminadas (Sengupta et al., 2017). Entretanto, existe uma complexa relação entre os compostos dos meios e os microrganismos, o que pode

afetar diretamente a eficiência desse processo (Fu and Wang, 2011; Naik and Dubey, 2011), tornando-se necessários estudos que abordem as diversas condições que podem ser encontradas nos diferentes resíduos, bem como, o perfil de resistência dos microrganismos e a capacidade de remoção.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a remoção do  $Pb^{2+}$  por *Serratia marcescens* CCMA 1010 em meio de cultura Lauria-Bertani (LB) analisando a expressão do gene *zntR* e em solução aquosa utilizando a biomassa microbiana como adsorvente.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Cultivo do microrganismo**

*S. marcescens* CCMA 1010 resistentes ao  $Pb^{2+}$  pertencentes à Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA/UFLA) foi reativada em meio de cultura caldo nutriente (NB) (5 % de peptona e 3% de extrato de levedura) em agitação de 150 rpm por 24h a 28°C até atingir a população de  $10^9$  UFC/ml.

### **2.2. Remoção do $Pb^{2+}$ em meio de cultura**

#### **2.2.1. Utilização da biomassa ativa**

Para avaliar a capacidade de remoção do  $Pb^{2+}$  em meio de cultura, uma alíquota de 1 ml do meio de reativação de *S. marcescens* CCMA 1010 foi inoculado em 100 ml de meio de cultura LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl) modificado pela presença de nitrato de chumbo ( $Pb(NO_3)_2$ ) nas concentrações de 15; 40; 60; 120; 220 e 300  $mg L^{-1}$ . O mesmo meio de cultura sem o  $Pb^{2+}$  foi preparado como tratamento controle (controle positivo). Foram retiradas amostras nos tempos 0, 24h, 48h e 7 dias após a inoculação. As amostras foram centrifugadas a 7155.2 xg por 10 minutos, acidificadas com ácido nítrico e o sobrenadante avaliado quanto à concentração de  $Pb^{2+}$  em espectrômetro de absorção atômica. Os experimentos foram realizados em triplicata. A taxa de remoção foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração final do  $Pb^{2+}$  no meio de cultura.

### 2.2.2. Utilização da biomassa inativa

A cepa de *S. marcescens* CCMA 1010 foi cultivada em meio de cultura LB em shaker com rotação de 150 rpm a 28°C até atingir uma população de 10<sup>9</sup> UFC/ml. Após o crescimento microbiano, as células foram inativadas em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após a inativação a biomassa microbiana foi inoculada em meio de cultura LB contendo as concentrações iniciais de 15; 40; 60; 120; 220 e 300 mg L<sup>-1</sup> de Pb<sup>2+</sup>. A concentração final do Pb<sup>2+</sup> foi avaliado após 24 h sob agitação a 150 rpm e 28°C. Todo o experimento foi realizado em triplicata. A taxa de remoção foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração final do Pb<sup>2+</sup> no meio de cultura.

### 2.2.3. Remoção do Pb<sup>2+</sup> de água contaminada sintética por *S. marcescens*

Para a remoção do Pb<sup>2+</sup> em água destilada sinteticamente contaminada utilizando a biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 foi realizado um experimento utilizando o delineamento central composto rotacional (DCCR). A tabela 2 apresenta a matriz gerada pelo software designer expert 7.0 o qual define os valores das concentrações iniciais de Pb<sup>2+</sup> e pH para otimização da remoção do Pb<sup>2+</sup>.

*Serratia marcescens* CCMA 1010 foi cultivada em meio NB até a fase log a 28°C sob agitação a 150 rpm. Em seguida, uma alíquota 10 ml foi centrifugado a 4°C a 7155.2 xg por 10 min. A biomassa foi ressuspensa em 1 ml de água peptonada a 0,1%.

Os experimentos de remoção dos metais foram realizados em tubos falcon de 50 ml contendo 9 ml da solução com Pb<sup>2+</sup> e 1 ml da suspensão da biomassa bacteriana. Os tubos foram incubados a 28°C sob agitação a 150 rpm/24 h. Para avaliar a remoção do Pb<sup>2+</sup> pela biomassa microbiana foi utilizado a equação 1, utilizando espectrometria de absorção atômica com chama, para quantificar os metais residuais na solução. As análises estatísticas e predição do modelo de otimização da remoção foram realizados no software designer expert 7.0.

$$q = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{M} \quad (1)$$

Onde:

*q*: quantidade de íon metálico capturado pela biomassa (mg g<sup>-1</sup>);

*Co*: concentração inicial do íon metálico (mg L<sup>-1</sup>);

Ce: concentração final do íon metálico ( $\text{mg L}^{-1}$ );

V: volume da solução (L);

M: massa do bioissorvente (g).

## 2.3. Análise da expressão de gene de resistência

### 2.3.1. Extração do RNA e síntese de cDNA

*S. marcescens* CCMA 1010 foi cultivada em meio LB por um período de 12 horas nas concentrações de 0 (controle); 15, 60 e 120  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$ . Após esse período foi extraído o RNA das células utilizando o kit comercial *NZY Total RNA Isolation* da Nzytech<sup>®</sup>. Após a extração do RNA foi realizado o protocolo de síntese de cDNA utilizando o Kit comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis* da Nzytech<sup>®</sup> conforme instruções do fabricante.

### 2.3.2. Desenho dos primers

Os primers para os genes *ZntR* e 16S para *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* Db11 foram desenhados (GenBank assembly accession: GCA\_000513215.1) (Iguchi et al., 2014). No desenho dos primers de qPCR: (1) utilizou-se a aplicação online “The mfold Web Server” para identificar e utilizar regiões onde não há *folding* nos possíveis arranjos do produto de DNA a amplificar, (2) utilizou-se a aplicação “Primer-BLAST” do NCBI com o genoma de *S. marcescens* subsp. *marcescens* Db11 como referência para identificar e evitar a possibilidade de amplificar multiprodutos de PCR e (3) evitou-se gerar produtos maiores que 200 bp.

Os primers utilizados para amplificação em qPCR do gene 16S foram: 16s-f: GTTTGATCATGGCTCAGATTGAAC (TM: 58°C) e 16s-r: CATCAGGCAGTTTCCCAGA (TM: 57°C). Para o gene *ZntR* foram: *ZntR*-f: CTCTTGGCAGGTATGATGCTC (TM: 58°C) e *ZntR*-r: AGGGCATGATGGATCACAATG (TM: 58°C).

### 2.3.3. Condições para a qPCR

Para a qPCR foi utilizado o Kit comercial *NZY qPCR Green Master Mix (2x)* da Nzytech<sup>®</sup>. A reação consistiu de 5  $\mu\text{L}$  da Master Mix; 0,4  $\mu\text{L}$  dos primers forward e reverse

(soluções de 10  $\mu\text{M}$ ); 4.0  $\mu\text{L}$  do cDNA e 0.2  $\mu\text{L}$  de água miliQ. A amplificação ocorreu em termociclador para qPCR da Bio-Rad<sup>®</sup> com programação de 1 ciclo a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Antes de realizar a qPCR foi utilizado o kit *PCR decontamination* da ArcticZymes<sup>®</sup> para descontaminação de eventual material genético na Master Mix segundo instruções do fabricante.

### 2.3.4. Cálculo para expressão dos genes

A expressão do gene *ZntR* foi avaliada utilizando o método  $\Delta\text{C}_t$  comparativo utilizando o gene 16s como referencia. As equações 2, 3, 4 e 5 foram utilizadas para determinar a relação entre a expressão do gene alvo (*ZntR*) com o gene de referencia (16S) conforme proposto por Livak e Schmittgen (2001).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{alvo}) - \text{Ct}(\text{referencia}) \quad (2)$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{amostra}) - \Delta\text{Ct}(\text{controle}) \quad (3)$$

$$\text{Número de cópias do gene} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (4)$$

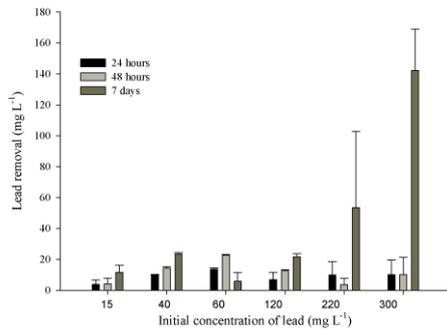
$$\text{Quantificação da expressão do gene} : -1/2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (5)$$

## 3. Resultados

### 3.1. Remoção do $\text{Pb}^{2+}$ em meio de cultura LB por biomassa ativa e inativa

O potencial de remoção do  $\text{Pb}^{2+}$  por *S. marcescens* CCMA 1010 em meio de cultura líquido LB estão apresentados na figura 1, demonstrando a relação entre a concentração de metal removido e a concentração do íon metálico presente no meio (figura 1-A) e a porcentagem da remoção (figura 1-B). A maior taxa de remoção na concentração de 300  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  foi observada após 7 dias de crescimento da biomassa no meio de cultura. Entretanto, a maior porcentagem de remoção foi observada na menor concentração (15  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$ ) onde observou-se cerca de 90% de remoção do  $\text{Pb}^{2+}$  ao fim de sete dias de ensaio.

A)



B)

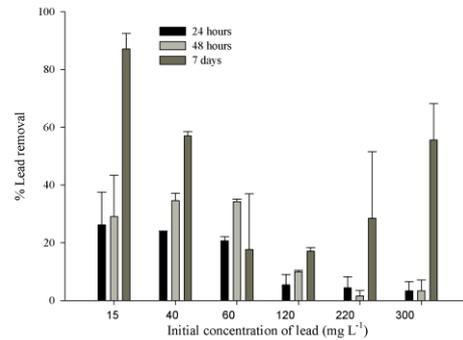
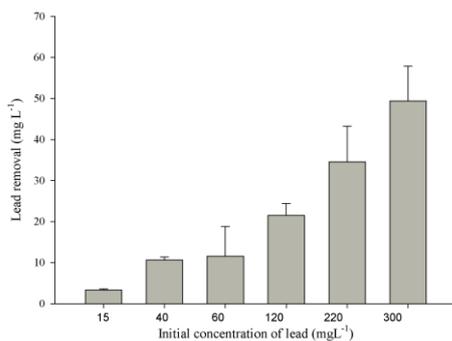


Figura 1 Taxa de remoção (A) e porcentagem de remoção (B) do ion  $Pb^{2+}$  em meio de cultura LB após inoculação com *S. marcescens* CCMA 1010.

Quando foi utilizada a biomassa inativa no meio de cultura, observou-se uma maior remoção com o aumento da concentração inicial do íon. Na concentração de  $300\text{ mg L}^{-1}$  foi obtido uma remoção de  $50\text{ mg L}^{-1}$  (Figura 2-A) o que representa 25% de eficiência na remoção do  $Pb^{2+}$  no meio (Figura 2-B).

A)



B)

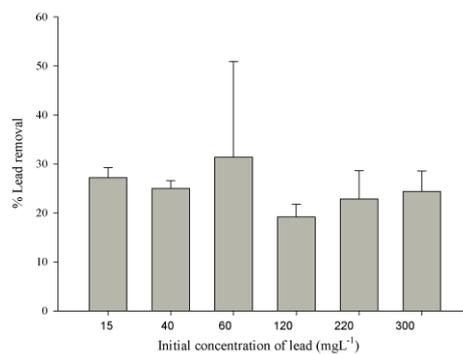


Figura 2. Taxa de remoção (A) e porcentagem de remoção (B) do chumbo em meio de cultura LB utilizando a biomassa morta de *S. marcescens* CCMA 1010 ao fim de 24 h.

Pode-se inferir, portanto, que houve um processo metabólico para a remoção do  $Pb^{2+}$  no meio LB após 7 dias de incubação, principalmente nas concentrações mais altas de 220 e  $300\text{ mg L}^{-1}$ . Ao utilizar a biomassa inativa, a porcentagem de remoção mantém-se constante

próximo de 30%. Entretanto, os resultados demonstraram baixa eficiência na remoção do  $Pb^{2+}$  no meio LB, tanto na utilização da biomassa ativa quanto inativa.

### 3.2. Remoção microbiana de $Pb^{2+}$ em água sintética

Com os dados obtidos no experimento de otimização da remoção do  $Pb^{2+}$  pela biomassa, foi possível obter significância estatística ( $p < 0,05$ ) para o modelo e para as variáveis pH e concentração inicial do íon (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela de análise de variância para a otimização da remoção de  $Pb^{2+}$  em água sintética utilizando biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010

Fontes de variação	Variáveis resposta
Modelo	0.0006**
pH	0.0089**
Concentração de $Pb^{2+}$	0.0001**
CV (%)	10.53
R <sup>2</sup>	93.04%

CV (%) – Coeficiente de variação

A tabela 2 apresenta as condições experimentais, bem como os valores obtidos de remoção e a porcentagem de remoção do metal pela biomassa microbiana na solução de água com o chumbo. A máxima porcentagem de remoção (90%) foi obtida em pH 6,0 na concentração inicial de  $59.0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Pb^{2+}$ , com capacidade de remoção ( $q$ ) de cerca de  $133.85 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa. A máxima capacidade de remoção do Pb ( $292.55 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa) foi obtida em pH 4.5 e concentração inicial de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

Tabela 2. Matriz do designer experimental do DCCR para remoção ( $q$ )  $\text{mg g}^{-1}$  do  $\text{Pb}^{2+}$  utilizando biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010.

Run	Fontes de variação		Respostas	
	pH	$\text{Pb}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$q$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	% removal
1	5	100	155,30	87,96
2	6	200	262,67	82,21
3	6	200	263,63	81,63
4	6	200	267,31	82,37
5	6	59	133,85	90,04
6	6	200	286,39	84,82
7	6	341	277,50	48,23
8	4,5	200	292,55	84,07
9	6	200	288,14	86,74
10	7,5	200	170,25	82,23
11	7	100	82,23	66,23
12	5	300	275,94	55,80
13	7	300	272,11	79,34

O modelo para remoção do  $\text{Pb}^{2+}$  pela biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 esta representado na equação 6 e Figura 3. De acordo com o modelo de otimização os valores preditos para máxima a remoção seria de pH 6.11 e concentração inicial de  $\text{Pb}^{2+}$  de aproximadamente  $263 \text{ mg L}^{-1}$ , com valor predito de remoção de  $232.0 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, ou seja, 88% de remoção. Ao ser realizado a validação experimental nas condições preditas foi obtido remoção de 100% do  $\text{Pb}^{2+}$  com uma capacidade de remoção por unidade de biomassa de  $366.66 \text{ mg g}^{-1}$ .

$$q = 273.20 - 31.7 \times A + 63.21 \times B + 17.50 \times A \times B - 26.6 \times A^2 - 39.60 \times B^2 \quad (6)$$

Onde:

A: pH

B: Concentração inicial do  $\text{Pb}^{2+}$

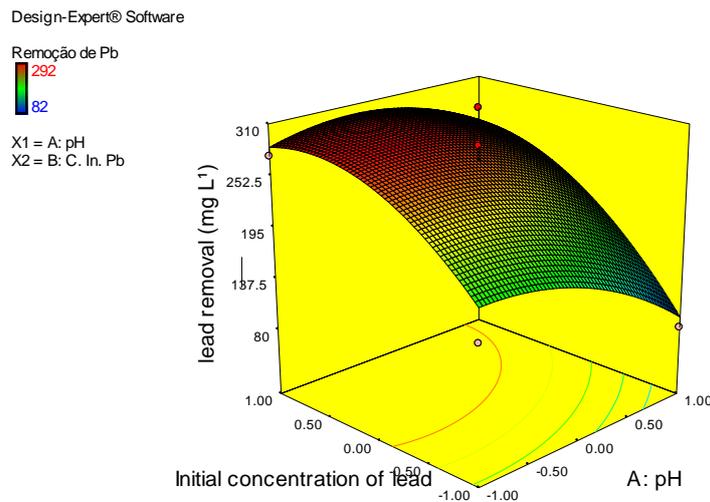


Figura 3. Modelo de superfície de resposta para otimização da biossorção ( $q$ ) do  $\text{Pb}^{2+}$  pela biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 em relação a variação do pH e concentração inicial do  $\text{Pb}^{2+}$ .

### 3.3. Expressão do gene *ZntR*

O gene *zntR* responsável pela regulação do gene *zntA* produtor da ATPase ZntA de transporte de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  para fora das células bacterianas foi testado em relação à sua expressão frente ao aumento da concentração de  $\text{Pb}^{2+}$  no meio de cultura. Os resultados demonstraram que para 15, 60 e 120  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  no meio de cultura há diminuições de 14, 100 e 2 vezes na expressão do gene *ZntR* em relação ao controle sem  $\text{Pb}^{2+}$  (tabela 3).

Tabela 3. Estimativa da quantidade de expressão do gene *zntR* (normalizada ao gene 16s) nas diferentes concentrações de  $\text{Pb}^{2+}$  em comparação ao controle sem  $\text{Pb}^{2+}$ , calculada por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

$\text{Pb}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Alvo ( <i>ZntR</i> ) $C_t$	Referencia 16s $C_t$	$\Delta C_t$	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	$-1/2^{-\Delta\Delta C_t}$
0	23.54	17.20	6.34	-	-	-
15	28.72	18.52	10.21	3.86	0.07	-14.29
60	28.49	15.67	12.82	6.48	0.01	-100.00
120	24.00	16.59	7.41	1.07	0.48	-2.08

#### 4. Discussão

É crescente a necessidade de isolamento e identificação de novos microrganismos com capacidade de utilização em processos de biorremediação. Nesse sentido microrganismos indígenas isolados de áreas contaminadas apresentam importante potencial de utilização em processos de biorremediação (Afzal et al., 2017).

Há uma necessidade da otimização do processo de utilização da biomassa microbiana para bioissorção de metais pesados, devido as variações naturalmente encontrada nos resíduos contaminados, possibilitando assim uma aplicação em sistema real de tratamento (Migahed et al., 2017). Além da resistência aos metais pesados, *S. marcescens* CCMA 1010 apresentou persistência no processo de tratamento da água residual do processamento do café (Pires et al., 2017), a qual apresenta altas concentrações de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $130 \text{ mg L}^{-1}$ ), o que pode ter proporcionado uma capacidade adaptativa evidenciada principalmente pela presença de genes de resistência (Iguchi et al., 2014; Khan et al., 2017).

No presente estudo, o facto de haver remoção de  $\text{Pb}^{2+}$  tanto com biomassa ativa como com biomassa inativada nos testes efetuados em meio de cultura indica que processos de adsorção têm um papel importante nessa remoção. Por outro lado, no teste com biomassa ativa a remoção após 24 horas de uma quantidade relativamente constante de  $\text{Pb}^{2+}$ , independentemente do aumento da sua quantidade inicial no meio de cultura (Figura 1-A), indica que há mecanismos biológicos (provavelmente mecanismos de efluxo relacionados com a resistência a  $\text{Pb}^{2+}$  acionados com a entrada destes íons nas células) que limitam a quantidade destes íons que podem ficar retidos em bactérias *S. marcescens*. Ao contrário do que acontece no teste com a biomassa inativa, em que a quantidade removida aumenta gradualmente com o aumento da concentração inicial de  $\text{Pb}^{2+}$  (Figura 2-A), sugerindo que o não funcionamento desses mecanismos biológicos permite que a remoção dependa apenas da menor ou maior probabilidade de choques entre estes íons e as células.

A eficiência dos processos de bioissorção é dependente da especificidade dos metais, bem como da composição do adsorvente, nesse sentido a biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 apresenta potencial de utilização em sistemas de tratamento de  $\text{Pb}^{2+}$ , podendo ser aplicados em biorreatores de tanque com agitação (STRs) (Rosca et al., 2015), pois além de ser eficiente no processo de adsorção, apresenta mecanismos de resistência e rápido crescimento em meios de cultura com baixa exigência nutricional (Araújo et al., 2010)

A concentração inicial do  $\text{Pb}^{2+}$  e pH influenciaram no processo de bioissorção pela biomassa microbiana. Normalmente, baixos valores de pH tendem a ionizar os grupos

funcionais da superfície da parede celular e altos valores podem apresentar potencial de redução oxidativa do metal, os valores ótimos para remoção dos metais podendo variar entre 4.5 a 7.0 (Aryal and Kyriakides, 2015; Hossain and Anantharaman, 2006; Verma et al., 2016).

Altas concentrações de metal no meio tendem a saturar os sítios de ligação da parede celular bacteriana, prejudicando assim, a taxa de remoção. Entretanto, a capacidade de remoção dos metais pela biomassa é dependente da reatividade da parede celular de cada microrganismos, conferindo características intrínsecas a cada isolado (Wen et al., 2018; Aryal; Kyriakides, 2015). Aparentemente os componentes do meio de cultura LB interferiram nos processos de remoção do  $Pb^{2+}$ , devido possivelmente a formação de precipitados de chumbo por componentes do próprio meio, mesmo sendo o meio de cultura mais indicado pra estudos de crescimento de microrganismos na presença de metais pesados (Sani et al., 2001). Assim, para avaliar o potencial máximo de remoção de  $Pb^{2+}$  em processos de adsorção pela biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 é mais indicado utilizar estudos em água do que em meio de cultura.

Estudos da expressão de genes de resistência a metais pesados, além de proporcionarem maior conhecimento em relação à fisiologia dos microrganismos em ambientes contaminados também são úteis no desenvolvimento de biossensores de células inteiras (Kim et al., 2018; Gutiérrez et al., 2015).

A ZntR é uma proteína tipo MerR reguladora da transcrição do gene *zntA*, o qual produz uma proteína (ZntA) de transporte de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Co^{2+}$  para fora da célula, e logo na altura da descoberta desta proteína foi desvendado que a sua ligação a estes íões a tornavam num fator de transcrição do *zntA* e que a expressão deste gene aumentava com a exposição das células aos íões (Rensing et al. 1997; Brocklehurst et al. 1999; Singh et al. 1999; Binet e Poole 2000; Pennella e Giedroc 2005; Helmann et al. 2007). No entanto, inicialmente nada era conhecido acerca da regulação do próprio gene *zntR*, embora a presença duma cópia parcial do promotor do gene *zntA* na região codificadora do *zntR* (Brocklehurst et al. 1999) assim como ensaios de mudança de mobilidade eletroforética e ensaios de transcrição *in vitro* (Singh et al. 1999) levantassem a hipótese de autorregulação. Além disso, as similaridades das sequências do promotor do *zntA* (*PzntA*) com as sequências dos promotores dos operões de resistência ao mercúrio *mer* T21 e *mer* Tn501 (Rensing et al. 1997; Brocklehurst et al. 1999) sugeriam um processo de autorregulação negativa. As proteínas MerR (que originaram o nome da família de reguladores tipo MerR) em resposta ao reconhecimento do íão  $Hg^{2+}$  ligam-se aos promotores dos operões *mer* para ativar a

transcrição de vários genes envolvidos no mecanismo de desintoxicação de este íon e os mesmos locais de ligação também regulam negativamente a transcrição dos promotores dos genes *merR*, que estão em sobreposição e em direção divergente (Helmann et al. 2007).

Recentemente, a hipótese da autoregulação negativa do gene *zntR* ficou reforçada num estudo com linhas mutantes de *Brucella abortus* acerca da importância da homeostase do zinco para a virulência destas bactérias. Nesse estudo, a deleção do gene *zntR* resultou num aumento da expressão do *zntA* (Sheehan et al. 2015).

Neste trabalho, com estirpes de bactérias selvagens sem o gene *zntR* anulado (*S. marcescens* CCMA 1010) demonstrou-se a resposta da autoregulação negativa no sentido inverso: a presença de  $Pb^{2+}$ , que quando ligados à proteína ZntR induzem a expressão do gene *zntA*, resultou numa redução da expressão do *zntR*.

Por outro lado, este trabalho revelou que os mecanismos regulados pela proteína ZntR produzida pelo *zntR* têm um papel importante na resistência desta bactéria até determinadas concentrações destes íons, mas que para concentrações superiores esses mecanismos deixam de ser determinantes. Nas concentrações de 15 e 60 mg/L de  $Pb^{2+}$  a expressão do gene *zntR* foi 14 e 100 (respetivamente) vezes abaixo da expressão “normal” na cultura sem suplemento de  $Pb^{2+}$ , enquanto na concentração de 120 mg/L  $Pb^{2+}$  a expressão foi apenas 2 vezes inferior. Provavelmente acontece em *S. marcescens* CCMA 1010 uma resposta semelhante à descrita por Choudhary e Sar (2016). Num estudo de expressão de genes de resistência a metais em *Pseudomonas aeruginosa* estes autores observaram um aumento da expressão dos genes de sequestro e efluxo de íons metálicos *copA* e *czcA* quando expostos a baixas concentrações de metais por curta duração, enquanto que a expressão do gene de resposta global ao stress *sodA*, que codifica a enzima superóxido dismutase, aumentou somente em concentrações de metal mais altas ou tempo de exposição mais longo.

## Conclusões

O isolado de *S. marcescens* CCMA 1010 apresentou resultados satisfatórios para remoção de chumbo em água artificialmente contaminada, indicando assim a utilização da biomassa microbiana como adsorvente. A remoção do chumbo em meio LB não foi eficiente, apresentando possíveis interações dos íons do  $Pb^{2+}$  com componentes do meio.

*S. marcescens* CCMA 1010 apresentou resistência e crescimento nas concentrações de  $Pb^{2+}$  no meio LB, sendo possível relacionar a expressão do gene *ZntR* com o aumento da concentração dos íons no meio.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FAPEMIG, CCMAR (através do projeto UID/Multi/04326/2013) e projeto BIOMETAL DEMO (European Union's Seventh Framework Programme, FP7/2007-2013, under grant agreement nº 619101)

## Referencias

Afzal, A. M., Rassol, M. H., Waseem, M., Aslam, B., 2017. Assessment of heavy metal tolerance and biosorptive potential of *Klebsiella variicola* isolated from industrial effluents. *AMB express*, 7, 1-9.

Ahemad, M., Kibret, M., 2013. Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: a review. *Biochemistry and molecular biology*, 1, 19-26.

Araújo, H. W. C., Fukushima, K., Takaki, G. M. C., 2010. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 159 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules*, 15, 6931-6940.

Aryal, M., Kyriakides, M. L., 2015. Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. *Environmental monitoring assessment*, 187, 1-26.

Bahadir, T., Bakan, G., Altas, L., Buyukgungor, H., 2007. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme and microbial technology*, 41, 98-102.

Binet, M. R., Poole, R. K., 2000. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 473, 67-70.

Bingle, L. E., Bailey, C. M., Pallen, M. J., 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 3-8.

Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., Attree, I., 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10, 104.

Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L. Morby, A. P., 1999. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31, 893-902.

Chakraborty, J., Dash, H., Das, S. Metals and their toxic effects: An introduction to noxious elements. In: DAS, S., DASH, H. R. *Handbook of Metal-Microbe interactions and bioremediation*. CRC Press. Ed.1, 2017. 838 p.

- Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., Mongkolsuk, S., 2015. Roles of *Agrobacterium tumefaciens* C58 *ZntA* and *ZntB* and the transcriptional regulator *ZntR* in controlling  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}$  resistance and the peroxide stress response. *Microbiology*, 161, 1730-1740.
- Chen, J. P. Decontamination of heavy metals. CRC press. Ed. 1. 2012, 434 p.
- Choudhary, S., Sar, P., 2016. Real-time PCR based analysis of metal resistance genes in metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain J007. *Journal of Basic Microbiology*, 56, 688–697.
- Cristani, M. T., Naccari, C., Nostro, A., Pizzimenti, A., Trombetta, D., Pizzimenti, F., 2012. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). *Environmental science pollution research*, 19, 61-168.
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewater: A review. *Journal of environment management*, 92, 407-418.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., Fava, F., 2015. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, 32, 147-156.
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A. P., Camargo, F. A. O., Gianello, C., Bento, F. M., 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 162-169.
- Gutiérrez, J. C., Amaro, F., Gonzalez, A. M., 2015. Heavy metal whole-cell biosensors using eukaryotic microorganisms: an update critical review. *Frontiers in microbiology*, 6, 1-8.
- Helmann, J. D., Soonsanga, S., Gabriel, S. Metalloregulators: Arbiters of metal sufficiency. In: NIES, D. S. *Molecular microbiology of heavy metals*, 2007, 446 p.
- Hossain, S. K. M., Anantharaman, N., 2006. Studies on bacterial growth and lead(IV) biosorption using *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of chemical technology*, 13, 591-596, 2006.
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C. L., Lu, G. N., Gu, R. R., Liu, H. J., Zhang, H., 2013. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 107, 11-18.
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Korokawa, K., Oshima, K., Hattori, M., Parkhill, J., Sebahia, M., Coulthurst, S. J., Gotoh, N., Thomson, N. R. Ewbank, J. J., Hayashi, T., 2014. Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome biology evolution*, 6, 2096-2110.
- Ilhan, S., Nourbakhsh, M. N., Kiliçarslan, S., Ozdag, H., 2004. Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish electronic journal of biotechnology*, 2, 50-57.

- Khan, M. S., Zaidi, A., Goel, R., Musarrat, J. *Bio-management of Metal-Contaminated Soils*. Springer Science and Business Media. 2011, 459 p.
- Khan, Z., Nisar, M. A., Hussain, S. Z., Arshad, M. N., Rehman, A., 2015. Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 10745-10757.
- Kim, H. J., Jeong, H., Lee, S. J., 2018. Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410, 1191-1203.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Migahed, F., Abdelrazak, A., Fawzy, G., 2017. Batch and continuous removal of heavy metals from industrial effluents using microbial consortia. *International journal of science and technology*, 14, 1169-1180.
- Naik, M. M., Dubey, S. K., 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 1-7.
- Nwagwu, E. C., Yilwa, V. M., Egbe, N. E., Onwumere, G. B., 2017. Isolation and characterization of heavy metal tolerant bacteria from Panteka stream, Kaduna, Nigeria and their potential for bioremediation. *African journal of biotechnology*, 16, 32-40.
- Outten, C. E., Outten, F. W., O'halloran, T., 1999. DNA Distortion Mechanism for Transcriptional Activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR Homologue in *Escherichia coli*\*. *The journal of biological chemistry*. 274, 37517–37524.
- Pennella, M. A., Giedroc, D. P., 2005. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators ZntR is a metalloregulatory protein from the MerR family. *BioMetals*, 18, 413–428.
- Pires, J. F., Cardoso, L. S., Schwan, R. F., Silva, C. F., 2017. Diversity of microbiota found in coffee processing wastewater treatment plant. *World journal and biotechnology*, 33, 1-14.
- Rensing, C., Mitra, B., Rosen, B. P., 1997. The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14326–14331.
- Rosca, M., Hlihor, M. R., Cozma, P., Comanita, E. D., Simion, I. M., Gavrilescu, M., 2015. Potential of biosorption and bioaccumulation process for heavy metals removal in bioreactors. *International conference on E-health and bioengineering*, v.1, 19-21.
- Sani, R. K., Geesey, G., Peyton, B. M., 2001. Assessment of lead toxicity to *Desulfovibrio desulfuricans* G20: influence of components of lactate C medium. *Advances in environmental research*, 5, 269-276.

- Sengupta, S., Das, P., Mukhopadhyay, A., Datta, S. Microbial biosorption and improved/genetically modified biosorbents for toxic metal removal and thermodynamics. In: DAS, S., DASH, H. R. Handbook of Metal-Microbe interactions and bioremediation. CRC Press. Ed.1, 2017. 838 p.
- Sheehan, L. M., Budnick, J. A., Roop, R. M., Caswell, C. C., 2015. Coordinated Zinc Homeostasis Is Essential for the Wild-Type Virulence of *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriol*, 197, 1582–1591.
- Tabaraki, R., Nateghi, A., Asbchin, S. S., 2014. Biosorption of lead (II) ions on *Sargassum ilicifolium*: Application of response surface methodology. *International biodeterioration and biodegradation*, 93, 145-152.
- Verma, A., Bishnoi, N. R., Gupta, A., 2016. Optimization study for Pb(II) and COD sequestration by consortium of sulphate-reducing bacteria. *Applied water science*, 1, 1-12.
- Wang, T. S. I. M., Song, Y., Zhu, W., Gao, F., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, W., Wei, G., Luo, Z. Q., Shen, X., 2015. Type VI Secretion System Transports Zn<sup>2+</sup> to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. *PLoS Pathogens*, 1, 2-25.
- Wang, T., Chen, K., Gao, F., Kang, Y., Chaudhry, M. T., Wang, Z., Wang. Y., Shen, X., 2017. ZntR positively regulates T6SS4 expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of microbiology*, 55, 448-456.
- Wen, X., Du, C., Zeng, G., Huang, D., Zhang, J., Yin, L., Tan, S., Huang, L., Chen, H., Yu, G., Hu, X., Lai, C., Xu, P., Wan, J., 2018. A novel biosorbent prepared by immobilized *Bacillus licheniformis* for lead removal from wastewater. *Chemosphere*, 200, 173-179.
- Zeng, X., Tang, J., Liu, X., 2012. Response of *P. Aeruginosa* E<sub>1</sub> gene expression to cadmium stress. *Current microbiology*, 65, 799-804.

### **Artigo 3: Eficiência de *Serratia marcescens* CCMA 1010 na biossorção de metais em sistemas multicontaminados**

#### **Resumo**

Resíduos industriais e agroindustriais normalmente apresentam contaminação com múltiplos metais, dificultando a biorremediação, uma vez que o microrganismo envolvido deve ser multi-resistente. Além disso, a eficiência do processo pode ser comprometida uma vez que metais com valência semelhantes competem entre si pelos sítios de ligação da superfície da parede celular microbiana. Isso é extremamente relevante quando o principal mecanismo na remoção dos metais pelo microrganismo é a adsorção. *S. marcescens* CCMA 1010 é conhecida por ser resistente ao  $Pb^{2+}$  e foi avaliada quanto a resistência  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  e capacidade de remoção otimizado por DCCR em meio líquido artificialmente contaminado e confirmado por absorção atômica. *S. marcescens* CCMA 1010 mostrou-se mais resistente ao  $Zn^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+}$ . Entretanto, maior remoção foi observado para o  $Cd^{2+}$  (32,8%) e  $Pb^{2+}$  (31,8%) em pH 5,0 e concentração inicial de  $590 \text{ mg L}^{-1}$  para o  $Pb^{2+}$  e  $470 \text{ mg L}^{-1}$  para o  $Cd^{2+}$ . A presença dos metais refletiu na variação no grupamento amina, grupo carboxyl, hidroxyl e ligação com o oxigênio ou nitrogênio na parede celular na presença dos metais. A biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 apresentou potencial de utilização nos processos de remoção de metais pesados em meios multicontaminados. Entretanto, devido à complexidade dos resíduos com múltiplos metais há a necessidade de mais estudos para viabilizar a aplicação da biomassa em resíduos contaminados, determinando outras fontes de variação bem como a interação do microrganismo com outros metais e a interação entre os metais.

**Palavras-chave:** Multi-metais, bactérias, biorremediação.

## 1. Introdução

A contaminação do meio ambiente com metais pesados ocorre normalmente de forma multicontaminada, sendo os metais/metalóides Zn, Cr, Cu, Pb, Ni, As, Cd e Hg que apresentam maior risco ecológico (Bian et al., 2016). Assim, a disposição desses elementos no solo ou ambientes aquáticos pode levar a uma contaminação continuada e progressiva ocasionada pelo acúmulo dos metais nos seres vivos, e consequente transferência no ambiente através das redes tróficas (Guo et al., 2016). As principais fontes de multi-contaminação são as atividades de mineração, aterros sanitários, resíduos industriais, fertilizantes e defensivos agrícola (Gautam et al., 2015).

O cádmio e o chumbo são elementos químicos extremamente tóxicos mesmo em concentrações baixas, podendo acarretar diversos danos a saúde dos seres vivos. O  $Zn^{2+}$  apesar de ser considerado um elemento traço, em altas concentrações, pode ser tóxico. Esses metais são utilizados principalmente nas indústrias siderúrgicas, de plástico, de combustíveis e de fertilizantes agrícolas e seus limites em água potável é de  $0.003 \text{ mg L}^{-1}$  para  $Cd^{2+}$ ;  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  para  $Pb^{2+}$  e  $3 \text{ mg L}^{-1}$  para  $Zn^{2+}$  (WHO, 2006).

Com o intuito de tratar os resíduos contaminados com metais pesados, diversas técnicas de baixo custo estão sendo desenvolvidas e estudadas (Kurniawan et al., 2015). Entre essas técnicas a utilização da biomassa microbiana ou seus metabólitos são considerados de alta eficiência, baixo custo e ambientalmente corretas (Ahemad and Kibret, 2013). Os microrganismos podem apresentar diversos mecanismos para remoção dos metais pesados do ambiente, como a adsorção na superfície da parede celular ou na região periplasmática, absorção no interior da célula, redução, precipitação ou volatilização através da atividade microbiana (Giovanela et al, 2017).

Em processos de biorremediação há uma correlação dos mecanismos de resistência a metais com a eficiência no processo, mantendo a biomassa ativa mesmo em resíduos contaminados (Naik and Dubei, 2011). Bactérias isoladas de áreas de mineração de zinco demonstraram capacidade de biossorção de  $Cd^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  com destaque para os microrganismos *Tsukamurella pautometabola* e *Pseudomonas aeruginosa* (Limcharoensuk et al., 2015). Em algumas espécies de bactérias esses mecanismos de resistência são regulados por uma série de genes, como o *CadR*, *PbrR* e *ZntR* responsáveis pela regulação do fluxo de íons dos metais  $Cd^{+2}$  e  $Pb^{+2}$  e  $Zn^{2+}$ , respectivamente (Naik and Dubey, 2011; Permina et al., 2006; Taghavi et al., 2009).

Outro mecanismo de resistência é a capacidade de adsorção dos metais aos grupos funcionais da superfície da parede celular sendo esse processo dependente de alguns fatores, tais como pH, concentração inicial do íon e composição da biomassa (Huang and Lio, 2013). Em determinados casos a bioadsorção pode ocorrer utilizando a biomassa microbiana inativa a qual pode apresentar maior eficiência na adsorção comparado com a biomassa ativa (Huang et al., 2013).

*S. marcescens* é uma bactéria cosmopolita, podendo algumas cepas estar relacionadas com infecções hospitalares. No entanto, há estudos de aplicação em processos de biorremediação, como na bioadsorção de metais pesados (Cristani et al., 2012), biodegradação de biodiesel (Souza et al., 2016), pesticidas (Cycon et al., 2013) e compostos orgânicos (Pires et al., 2017).

Neste trabalho uma cepa de *Serratia marcescens* CCMA 1010, já conhecida como resistente ao  $Pb^{2+}$ , foi avaliada quanto a resistência e capacidade de remoção de  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  em condições de cultivo otimizados visando multi-remoção desses metais.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Resistência de *S. marcescens* ao $Cd^{2+}$ , $Pb^{2+}$ e $Zn^{2+}$

#### 2.1.1. Concentração mínima inibitória (MIC)

O isolado de *S. marcescens* CCMA 1010 pertencente a Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras. Inicialmente o isolado foi reativado em placa contendo o meio Agar Nutriente (NA) (3% de extrato de levedura, 5% de peptona e 15% de agar), a 28°C por 24 horas e em seguida transferidos para placas de AN acrescido das concentrações dos íons metálicos individualmente (0; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5 e 6.0 mM) utilizando soluções de Nitrato de Chumbo ( $Pb(NO_3)_2$ ), Nitrato de Cd ( $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) e Nitrato de Zinco ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ). O crescimento dos microrganismos foi avaliado pelo aparecimento das colônias após 24 horas de incubação, sendo observado por um período de até 7 dias. O controle positivo foi o crescimento no mesmo meio de cultura sem a adição dos metais. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A concentração mínima inibitória foi determinada como a menor concentração do metal que isolado não foi capaz crescer (Castro et al., 2015).

#### 2.2.2. Efeito dos metais no crescimento bacteriano

Os valores observados CMI determinaram as condições para realizar a curva de crescimento dos microrganismos nos meios de cultura líquido contendo os íons metálicos. *S. marcescens* CCMA 1010 foi reativada em caldo nutriente (NB) (3% de extrato de levedura e 5% de peptona) a 28°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas, sendo o inóculo padronizado na absorbância de 0.6 em espectrofotômetro com densidade ótica (OD)<sub>(600 nm)</sub>.

Em seguida, uma alíquota de 0,6 ml foi inoculada em 300 ml de caldo nutriente contendo Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, comparando o crescimento em caldo nutriente sem a presença dos íons metálicos (controle). O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 3 horas por um período de 36 horas utilizando espectrômetro molecular de Ultravioleta-visível a 600 nm (Limcharoensuk et al., 2015).

#### 2.4. Experimentos de remoção de Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>

##### 2.4.1. Cultivo da biomassa e inoculação

*Serratia marcescens* CCMA 1010 foi cultivada em meio NB até atingir uma população de 10<sup>9</sup> UFC/ml a 28°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, uma alíquota 10 ml foi centrifugado a 4°C a 7155.2 xg por 10 min. A biomassa foi ressuspensa em 1 ml de água peptonada a 0,1%.

Os experimentos de remoção dos metais foram realizados em tubos falcon de 50 ml contendo 9 ml da solução com Pb<sup>2+</sup>; Cd<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> e 1 ml da suspensão de suspensão da biomassa bacteriana. Os tubos foram incubados a 28°C com agitação de 150 rpm/24 h.

##### 2.4.2. Otimização de remoção de Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> em meio com múltiplos metais utilizando o delineamento central composto rotacional (DCCR).

As variáveis independentes utilizadas no experimento foram o pH, e concentrações de Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>. A tabela 2 apresenta a matriz do designer experimental gerada pelo software Designer Expert<sup>®</sup> versão 8.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

A variável resposta foi a concentração dos metais adsorvido pela biomassa bacteriana, determinado pela equação 1, utilizando espectrofotômetro de absorção atômica para quantificar a presença do  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  residual.

$$q = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{M} \quad (1)$$

Onde:

$q$ : quantidade de íon metálico capturado pela biomassa ( $\text{mg g}^{-1}$ );

$C_o$ : concentração inicial do íon metálico ( $\text{mg L}^{-1}$ );

$C_e$ : concentração final do íon metálico ( $\text{mg L}^{-1}$ );

$V$ : volume da solução (L);

$M$ : massa do bioissorvente (g).

#### 2.4.3. Interação dos íons metálicos com a superfície da parede celular bacteriana

A interação dos íons metálicos com os grupos funcionais da superfície da parede celular de *S. marcescens* CCMA 1010 foi analisado utilizando espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para essa análise, as amostras bacterianas foram expostas aos metais em frascos de 150 ml, utilizando 100 ml de água destilada acrescida de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  nas concentrações  $590 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $470 \text{ mg L}^{-1}$  e  $60 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente. A biomassa bacteriana foi inoculada na proporção de 10% (v:v) e os frascos incubados em agitação de 150 rpm a  $28^\circ\text{C}/24 \text{ h}$ . A biomassa bacteriana não exposta aos metais foi utilizada como amostra controle.

A biomassa foi centrifugada a  $7155.2 \text{ xg}$  e seca em estufa de ventilação forçada a  $60^\circ\text{C}$ , em seguida foi misturada com Kbr em uma proporção de 1% de amostra. A faixa espectral utilizada foi de  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , número de scans de 32 e resolução de  $4 \text{ cm}^{-2}$  (Martins et al., 2010), utilizando o espectrômetro FTS 3000 Excalibur Digilab com transformada de Fourier.

### 3. Resultados

#### 3.1. Efeito do $Cd^{+2}$ , $Pb^{+2}$ e $Zn^{+2}$ no crescimento bacteriano

A resistência dos microrganismos aos metais pesados foi avaliada através da concentração mínima inibitória com contaminação máxima de 6 mM. *S. marcescens* CCMA 1010 apresentou crescimento  $Zn^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+}$  com valores de resistência de 5, 4 e 0,1 mM respectivamente em meio AN.

Os valores obtidos na MIC foram utilizados para determinar a dinâmica de crescimento de *S. marcescens* CCMA 1010 em meio caldo nutriente multicontaminado com  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ . Comparou-se o crescimento bacteriano durante 34 horas na presença dos metais  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  individualmente e multicontaminado ao tratamento controle (sem metal) (figura 1).

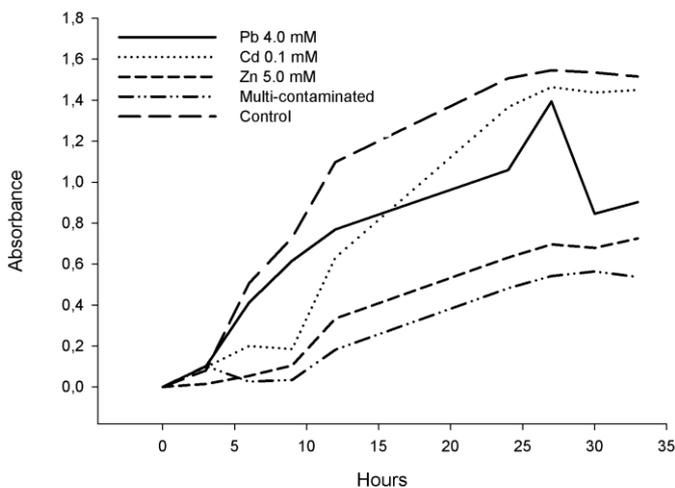


Fig. 1. Perfil de crescimento de *S. marcescens* CCMA 1010 na presença de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , multicontaminado e tratamento controle (sem a presença de metais).

No experimento de resistência do microrganismo, observou-se no tratamento controle o máximo crescimento em cerca de 24h após a inoculação. O crescimento de *S. marcescens* CCMA 1010 na presença do  $Pb^{2+}$  não apresentou fase lag tão longa ( $\cong 10h$ ) quanto as amostras contendo  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e para o multicontaminado, que exibiram uma fase lag de aproximadamente 10 h. Entretanto, essa concentração de  $Pb^{2+}$  apresentou efeito tóxico ao microrganismo durante o crescimento celular.

Apesar de ter apresentado efeito na fase lag o  $\text{Cd}^{2+}$  na concentração de 0,1 mM apresentou menor efeito tóxico a bactéria, quando comparado ao  $\text{Zn}^{2+}$  e ao  $\text{Pb}^{2+}$ . O  $\text{Zn}^{2+}$  apesar de apresentar maior valor de MIC apresentou efeito negativo no crescimento bacteriano. A condição de multicontaminação apresentou efeito negativo no crescimento, apresentando além do aumento da fase lag, um crescimento inferior a 50% em relação ao tratamento controle.

### 3.2. Otimização da remoção do $\text{Pb}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$ e $\text{Zn}^{+2}$ em meio multicontaminado

Os modelos para remoção do  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  no DCCR foram significativos ( $p < 0,05$ ) e os valores dos parâmetros da análise de variância estão apresentados na tabela 1.

Os modelos mais eficientes para a remoção foram para o  $\text{Cd}^{2+}$  e para o  $\text{Pb}^{2+}$ , os quais apresentaram menor coeficiente de variação (27,37 e 68,44 %) em relação ao  $\text{Zn}^{2+}$  (124,13 %) e maiores valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (tabela 1).

Tab. 1. Tabela de análise de variância para a otimização da remoção de  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  em meio multi-contaminado

Fontes de variação	Variáveis resposta		
	Cd	Pb	Zn
Modelo	0.0001**	0.0121**	0.04**
pH	0.64	0.86	0.19
Cd	0.0001**	0.82	0.62
Pb	0.52	0,0004**	0.62
Zn	0.04	0.5212	0,003**
CV (%)	27.37	68,44	124,13
$R^2$	97.63%	81,86 %	39.78 %

CV (%) – Coeficiente de variação.

Entretanto, nas condições avaliadas não houve interação estatística entre as variáveis e pH ( $p > 0,05$ ) para a remoção dos metais. Somente a concentração inicial de cada metal apresentou significância estatística ( $p < 0,05$ ) para a remoção do mesmo.

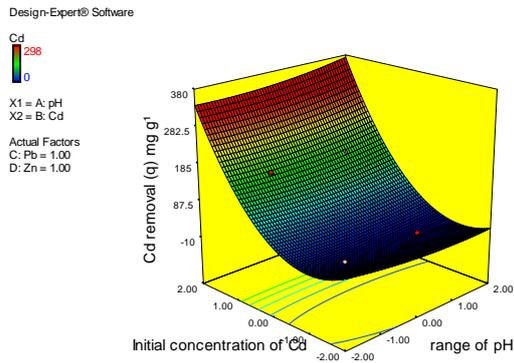
O máximo de remoção dos íons metálicos pela biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 observados no experimento, foi de 298.7 mg g<sup>-1</sup> para o  $\text{Cd}^{2+}$ , 338.9 mg g<sup>-1</sup> para o  $\text{Pb}^{2+}$  e 45,2 mg g<sup>-1</sup> para o  $\text{Zn}^{2+}$  (Tabela 2).

Tab. 2. Matriz do designer experimental do DCCR para remoção ( $q$ )  $\text{mg g}^{-1}$  do  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  utilizando biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010.

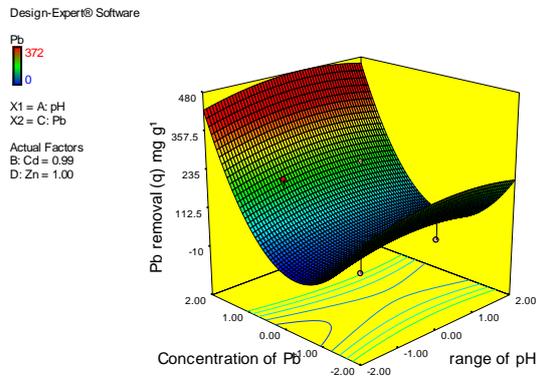
Run	pH	Variáveis			$(q)$		
		$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
		$\text{mg L}^{-1}$			$\text{mg g}^{-1}$		
1	5	110	590	60	0	243,3	17
2	6	350	420	40	18,9	34,3	0
3	5	470	590	60	157,1	188,8	18,7
4	5	110	250	25	0	0	0
5	3	110	250	25	0	0	0
6	4	350	420	40	20	64,4	0
7	4	350	80	40	20,3	<b>338,9</b>	0
8	5	110	250	60	0	0	19,2
9	4	350	750	40	14,5	372	0
10	3	470	590	25	158,3	185,8	0
11	5	470	250	25	154,5	0	25,5
12	5	110	590	25	0	212,6	27,2
13	4	350	420	40	24,8	26,7	0
14	3	110	590	25	0	260,5	0
15	2	350	420	40	27,1	16,8	0
16	3	110	250	60	0	0	19,7
17	4	350	420	9	39,8	42,2	0
18	3	470	590	60	163,1	208,3	20,4
19	3	470	250	60	162,3	0	20,1
20	4	350	420	75	112,2	177,7	<b>45,2</b>
21	4	350	420	40	22,4	45,6	0
22	5	470	590	25	164,3	212,5	0
23	5	470	250	60	223,9	11,7	24,9
24	4	230	420	40	0	26	0
25	4	590	420	40	<b>298,8</b>	31,5	0
26	3	110	590	60	0	185	0
27	3	470	250	25	153,9	0	0

A Figura 2 apresenta os gráficos de superfície de resposta com os valores do modelo predito para a multi-remoção do  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 2 a),  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 2 b) e  $\text{Zn}^{2+}$  (Fig. 2 c). Pode ser observado efeito da concentração inicial dos íons. Entretanto, não foi observado efeito do pH na remoção ( $q$ ) dos metais nas condições estudadas.

a)



b)



c)

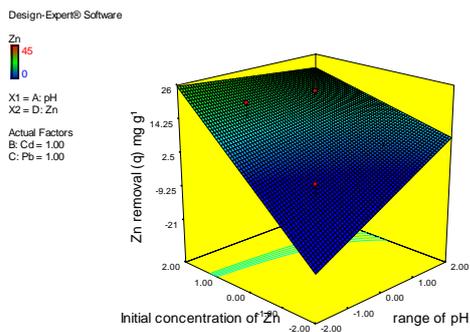


Fig. 2. Modelo de superfície de resposta para otimização da biossorção ( $q$ ) do  $\text{Cd}^{2+}$ (a),  $\text{Pb}^{2+}$ (b) e  $\text{Zn}^{2+}$ (c) em relação a variação do pH.

Não ocorreu interação significativa entre os metais. Entretanto, observou-se que a multicontaminação interfere nos valores máximos de remoção de cada metal, pois de acordo com as condições otimizadas previstas seria em pH 5 e concentração inicial de 2, 7 e 7 mM para o  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  respectivamente, com valores estimados de remoção de 165,4  $\text{mg g}^{-1}$  para  $\text{Cd}^{2+}$ , 194,3  $\text{mg g}^{-1}$  para  $\text{Pb}^{2+}$  e 19,25  $\text{mg g}^{-1}$  para  $\text{Zn}^{2+}$ .

Ao realizar a validação do experimento com as condições previstas pelo modelo, foi obtido uma bioadsorção de  $150 \text{ mg g}^{-1}$  para o  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $171 \text{ mg g}^{-1}$  para o  $\text{Pb}^{2+}$  e  $32,5 \text{ mg g}^{-1}$  para o  $\text{Zn}^{2+}$ , com uma eficiência de remoção de 31,8% para o  $\text{Cd}^{2+}$ , 32,8% para o  $\text{Pb}^{2+}$  e 56,1% para o  $\text{Zn}^{2+}$ .

### 3.3 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A partir da análise do espectro de FTIR (Figura 3) observam-se as variações nos grupos funcionais da superfície da parede celular na presença dos metais.

A maior variação no espectro ocorreu na região de  $3250 \text{ cm}^{-1}$ , que determina vibração no grupo amina, as variações entre  $1600$  e  $1300 \text{ cm}^{-1}$  é relativo ao grupo carboxyl, a região de  $975 \text{ cm}^{-1}$  é relativo ao grupo C-O e variação assimétrica na região de  $570$  e  $540 \text{ cm}^{-1}$  pode indicar ligação do metal com o oxigênio ou com nitrogênio presente na superfície da parede celular.

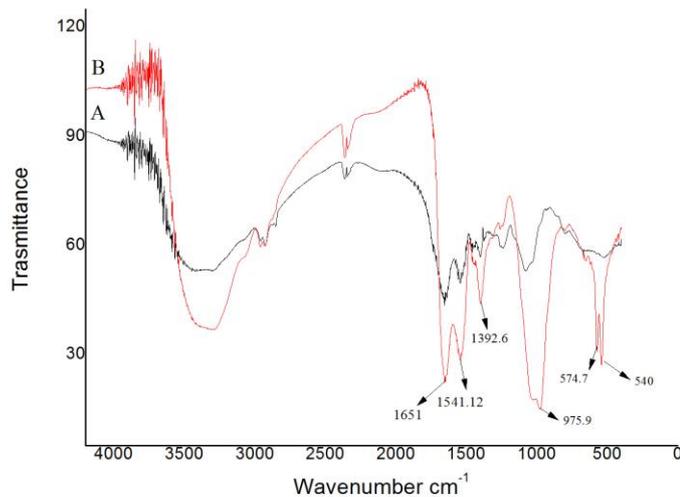


Fig. 3. Espectro de FTIR da biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010: (A) antes da exposição aos múltiplos metais e (B) após a exposição aos múltiplos metais ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ).

#### 4. Discussão

Microrganismos isolados de áreas contaminadas apresentam potencial de utilização em processos de biorremediação, uma vez que apresentam mecanismos de resistência ao estresse causado pelos metais para manter sua sobrevivência adequada (Tharmalingan et al. 2017). A cepa de *S. marcescens* CCMA 1010 foi isolada da água residual do processamento do café, a qual apresentou concentrações de até 130 mg L<sup>-1</sup> de Cd<sup>2+</sup> (Pires et al., 2017).

Isolados de *S. marcescens* de diversas origens já foram estudados e apresentaram potencial de utilização na biorremediação de níquel, cádmio, chumbo, cromo e zinco, apresentando mecanismos de redução dos metais, produção de sideróforos, metaloneína ou adsorção na superfície da parede celular (Nwagwu et al., 2017; Cristani et al., 2012; Kumar et al., 2011; Rahman et al., 2009).

A presença do Cd<sup>2+</sup> e do Zn<sup>2+</sup> afetou a fase lag de *S. marcescens* CCMA 1010 em relação ao meio contendo Pb<sup>2+</sup> e ao tratamento controle, assim como observado por Poirier et al. (2013) utilizando *Pseudomonas fluorescens* e em Huang et al. (2014) usando *Bacillus cereus*, que da mesma forma apresentaram aumento da fase lag em até 10 horas na presença dos metais.

Os resultados também demonstraram uma diminuição no crescimento celular na presença de múltiplos metais, podendo esse resultado ser ocasionado pela degradação de proteínas das células e sobrecarga dos mecanismos de resistência (Poirier et al., 2013).

A proporção de remoção dos metais obtida foi Pb<sup>2+</sup>>Cd<sup>2+</sup>>Zn<sup>2+</sup> por g<sup>-1</sup> de biomassa. Esses resultados sugeriu que não necessariamente a resistência ao metal pelo microrganismo pode estar relacionado com a capacidade de adsorção pela biomassa. A presença de múltiplos metais no meio pode afetar negativamente os processos de bioadsorção, devido a competição por sítios de ligação na superfície da parede celular (Ahemad and Kibret, 2013). Entretanto, estudos de bioadsorção de múltiplos metais podem levar a um melhor entendimento dos mecanismos e possibilidades de aplicações, devido a complexidade dos resíduos contaminados (Gravilescu, 2004).

A concentração dos íons metálicos também pode interferir diretamente na bioadsorção dos metais, baixas concentrações na solução podem proporcionar maior eficiência da bioadsorção, aumentando a interação entre os íons e os sítios de ligação da superfície da parede celular, já altas concentrações dos íons pode saturar os sítios de ligação, prejudicando a eficiência do processo de bioadsorção (Aryal and Kyriakides, 2015).

No presente trabalho, observou-se aumento do valor da quantidade de íons adsorvidos pela biomassa com o aumento da concentração inicial dos metais, assim como observado por Huang et al. (2014) em seus estudos com *Bacillus cereus* em processos de adsorção do  $\text{Cd}^{2+}$ , indicando uma não saturação dos sítios de ligação.

O pH é um fator que pode interferir na biossorção, devido a alterações na solubilidade dos metais e saturação dos sítios de ligação na parede celular (Sari et al., 2008), onde baixos valores tendem a ionizar os grupos funcionais, impedindo assim a ligação com os íons metálicos. Altos valores de pH podem influenciar na formação de hidróxidos metálicos, dificultando o processo de biossorção devido a precipitação dos metais (Huang et al., 2013; Sitko et al., 2013). Valores ótimos de pH para biossorção dos metais pode variar de acordo com as propriedades da superfície das células bacterianas (Aryal and Kyriakides, 2015). No presente estudo não foi observado significância estatística em relação ao pH na faixa estudada, mesmo o modelo de multi remoção dos metais sendo otimizado para pH 5,0. Entretanto, estudos demonstram que as faixas ótimas de pH para remoção dos metais encontram-se entre 5 e 7 (Munoz et al., 2015; Verma et al., 2016; Limcharoensuk et al., 2015).

A biossorção dos metais pela biomassa bacteriana depende também da reatividade química aos grupos funcionais da superfície da parede celular (Verma et al., 2016). Os grupos funcionais apresentam carga negativa na superfície da célula permite a ligação com os íons metálicos (Orandi, 2017). A exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  apresentaram variação nas regiões que representam o grupo amina e carboxyl assim como relatado por Huang and Lio (2013), Munoz et al. (2015) e Bowman et al. (2018). A exposição aos metais causou também alterações vibracionais nos grupos funcionais nas regiões abaixo de  $700\text{ cm}^{-1}$  (figura 4), o que pode caracterizar uma ligação com o oxigênio formando uma ligação  $\delta(\text{M-O})$  e  $\delta(\text{O-M-O})$  (M=Metal) (Kamnev et al., 1997) ou uma ligação dos íons com o nitrogênio (Munoz et al., 2009).

## Conclusão

Há a possibilidade de aplicação da biomassa de *S. marcescens* CCMA 1010 na remoção de  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  em resíduos contaminados por múltiplos metais. No entanto é importante observar que a resistência a altas concentrações de  $\text{Zn}^{2+}$  não refletiu maior eficiência da biossorção, sugerindo que não necessariamente os mecanismos de resistência aos metais podem estar relacionados com a capacidade de biossorção pela biomassa. Apesar do potencial

de aplicação nos processos de bioissorção, a utilização em resíduos multicontaminados ainda deve ser estudada, devido a complexidade das interações entre os múltiplos metais e os microrganismos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

### **Referencias**

- Ahemad, M., Kibret, M., 2013. Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: a review. *Biochemistry and molecular biology*. 1, 19-26.
- Aryal, M., Liakopoulou-Kyriakides, M., 2015. Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. *Environmental monitoring assesment*. 187, 1-26.
- Bian, B., Zhou, Y., Fang. B. B., 2016. Distribution of heavy metals and benthic macroinvertebrates: Impacts from typical inflow river sediments in the Taihu Basin, China. *Ecological indicators*. 69, 348-359.
- Bowman, N., Patel, D., Sanchez, A., Xu, W. , Alsaffar, A. , Arashiro, S. M. T., 2018. Lead-resistance bacteria from Saint Clair River sediments and Pb removal in aqueous solutions. *Applied microbiology and biotechnology*. 1, 1-8.
- Castro, C. B., Machado, R. A., Moreira, I. V., Manaia, C. M., 2015. Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Science of the total environment*. 530, 367-372.
- Cristani, M. T., Naccari, C., Nostro, A., Pizzimenti, A., Trombetta, D., Pizzimenti, F., 2012. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). *Environmental science pollution research*. 19, 61-168.
- Cycon, M., Zmijowska, A., Wojcik, M., Pootrowska-Seget, Z., 2013. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *Journal of environmental management*. 117, 7-16.
- Gautam, S. K., Maharana, C., Sharma, D., Singh, A. K., Tripath, J. K., Singh, S. K., 2015. Evaluation of groundwater quality in the Chotanagpur plateau region of the Subarnarekha river basin, Jharkhand State, India. *Sustainability of water quality and ecology*. 6, 57-74.

- Gavrilescu, M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in life science*, 4, 1-14.
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A. P., Camargo, F. A. O., Gianello, C., Bento, F. M., 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and environmental safety*. 140, 162-169.
- Guo, B., Jiao, D., Wang, J., Lei, K., Lin, C., 2016. Trophic transfer of toxic elements in the estuarine invertebrate and fish food web of Dalio River, Liaodong Bay, China. *Marine pollution bulletin*. 113, 258-265.
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C. L., Li, G.N., Gu, R. R., Liu, H. J., Zhang, H., 2013. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and surfaces*. 107, 11-18.
- Huang, F., Guo, C. L., Li, G. N., Yi, X. Y., Zhu, L. D., Dang, Z. 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere*. 109, 134-142.
- Huang, W., Liu, Z. M., 2013. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biofilm-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristics and mechanism studies. *Colloid and surfaces*, 105, 113-119.
- Kamnev, A. A., Ristic, M., Antonyuk, L. P. Chernyshev, A. V., Ignatov, V. V., 1997. Fourier transform infrared spectroscopic study of intact cells of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of molecular structure*. 408, 201-205.
- Kumar, R., Achatya, C., Joshi, A. R., 2011. Isolation and analyses of uranium tolerant *Serratia marcescens* strains and their utilization for aerobic uranium U(VI) bioreduction. *The journal of microbiology*. 49, 568-574.
- Kurniawan, T. A., Chan, G. Y. S., Lo, W. H., Babel, S., 2006. Comparison of low-cost adsorbents for treating wastewaters laden with heavy metals. *Science of the total environment*. 366, 409-426.
- Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C., 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and environmental safety*. 122, 322-330.
- Loutseti, S., Danielidis, D. B., Amilli, A. E., Kastsaros, C., Santas, R., 2009. The applications of a micro-algal/bacterial biofilter for the detoxification of copper and cadmium metal waste. *Bioresource technology*. 100, 2099-2105.

- Martins, M., Faleiro, M. L., Costa, A. M. R., Chaves, S., Tenreiro, R., Matos, A. P., Costa, M. C., 2010. Mechanism of uranium (VI) removal by two anaerobic bacterial communities. *Journal of hazardous materials*. 184, 98-96.
- Munoz, A. J., Espinola, F., Moya, M., Ruiz, E., 2015. Biosorption of Pb(II) ions by *Klebsiella* sp. 3S1 isolated from a wastewater treatment plant: Kinetics and mechanisms studies. *Biomed research international*. 1, 1-12.
- Naik, M. M., Dubey, S. K., 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*. 98, 1-7.
- Nwagwu, E. C., Yilwa, V. M., Egbe, N. E., 2017. Onwumere, G. B. Isolation and characterization of heavy metal tolerant bacteria from Panteka stream, Kaduna, Nigeria and their potential for bioremediation. *African journal of biotechnology*. 16, 32-40.
- Orandi, S. Biosorption of metals by microorganisms in the bioremediation of toxic metals. In: Das, S., Dash, H. R. *Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation*. CRC Press, ed. 1, 2017, 838 p.
- Permina, E. A., Kazakov, A. E., Kalinina, O. V., Gelfand, M. S., 2006. Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in eubacteria. *BMC microbiology*. 6, 1-11.
- Pires, J. F., Cardoso, L. S., Schwan, R. F., Silva, C. F., 2017. Diversity of microbiota found in coffee processing wastewater treatment plant. *World journal and biotechnology*. 33, 1-14.
- Poirier, I., Hammann, P., Kuhn, L., Bertrand, M., 2013. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: A proteome analysis. *Aquatic toxicology*, 128, 215-232.
- Rahman, M. F. A., Shukor, M. Y., Suhali, Z., Mustafa, S., Shamaan, N. A., Syed, M. A., 2009. Reduction of Mo (VI) by the bacterium *Serratia* sp. Strain DRY5. *Journal of environmental biology*. 30, 65-72.
- Sari, A., Mendil, D., Tuzen, M., Soylak, M., 2008. Biosorption of Cd(II) and Cr(III) from aqueous solution by moss (*Hylocomium splendens*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical engineering journal*. 144, 1-9.
- Shaban, N. S., Abdou, K. A., Hassan, N. E. Y., 2016. Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products. *Journal of basic and applied sciences*. 5, 102-106.
- Sitko, R., Turek, E., Zawisza, B., Malicka, E., Talik, E., Heimann, J., Gagor, A., Feist, B., Wrzalik, R., 2013. Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using grapheme oxide. *Dalton transactions*. 42, 1-8.

- Souza, M. M., Cola, T. S., Bucker, F., Ferrão, M. F., Huang, C. T., Andreazza, R., Camargo, F. A. O., Bento, F. M., 2016. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. *International biodeterioration and biodegradation*. 110, 141-146.
- Srivastava, N. K., Majumder, C. B., 2008. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of hazardous materials*. 151, 1-8.
- Taghavi, S., Lesaulnier, C., Monchy, S., Wattiez, R., Mergeay, M., Lelie, D. V. D., 2009. Lead (II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located function. *Antonie van Leeuwenhoek*. 96, 171-182.
- Tharmaligan, S., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Appana, V. D. Decontamination of multiple-metal pollution by microbial systems: The metabolic twist. In: Das, S., Dash, H. R. *Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation*. CRC Press, ed. 1, 2017, 838 p.
- Verma, A., Bishnoi, N. R., Gupta, A., 2016. Optimization study for Pb(II) and COD sequestration by consortium of sulphate-reducing bacteria. *Applied water science*. 1, 1-12.
- World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality*. 2006, 595 p.