



VANESSA ALVARENGA MESQUITA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL
USO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO
E AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DO IMPACTO
DE ELEMENTOS TRAÇO NAS CÉLULAS**

LAVRAS – MG

2015

VANESSA ALVARENGA MESQUITA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL USO EM PROCESSOS
DE BIORREMEDIAÇÃO E AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DO
IMPACTO DE ELEMENTOS TRAÇO NAS CÉLULAS**

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

Orientadora

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Coorientadores

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dr. Eduardo Jorge Valente Soares

LAVRAS – MG

2015

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

Mesquita, Vanessa Alvarenga.

Seleção de leveduras com potencial uso em processos de
biorremediação e avaliação fisiológica do impacto de elementos traço nas
células / Vanessa Alvarenga Mesquita. – Lavras: UFLA, 2015.

168 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Cristina Ferreira Silva e Batista Ferreira Silva e Batista.
Bibliografia.

1. Microcosmos. 2. Solo. 3. Toxicidade.

VANESSA ALVARENGA MESQUITA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL USO EM PROCESSOS
DE BIORREMEDIAÇÃO E AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DO
IMPACTO DE ELEMENTOS TRAÇO NAS CÉLULAS**

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 24 de fevereiro de 2015.

Dra. Maria Manuela Dias Machado	ISEP/Portugal
Dr. Eduardo Jorge Valente Soares	ISEP/Portugal
Dr. Cleidir Rodrigues Santos	Uminho/Portugal
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista
Orientadora

**LAVRAS – MG
2015**

*À minha mãe, Dilza,
pelas orações e conselhos.
Ao meu pai, Luiz, pela criação.
Ao meu irmão, Vinicius, familiares e amigos, pelo carinho.*

DEDICO

*Aos orientadores, coorientadores e professores,
pelos valiosos conhecimentos transmitidos.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

O trabalho que apresento para apreciação na minha defesa de doutorado foi realizado ao longo de três intensos anos de trabalho, em continuação ao trabalho apresentado para a defesa de mestrado em Microbiologia Agrícola. O meu fascínio em conhecer o mundo dos “pequenos organismos” contribuiu para que esta tarefa fosse feita com grande satisfação.

Um doutorado é feito em um longo período de tempo, envolvendo, por isso, diferentes circunstâncias, locais e pessoas que podem contribuir de muitas formas para a sua execução. Estando ciente do apoio, da amizade e do carinho que algumas pessoas me dispensaram ao longo deste percurso, proporcionando-me um bem-estar imprescindível para a execução desta tarefa, desde já expresso a todos os meus sinceros agradecimentos.

A DEUS, pela vida e pela força para enfrentar todas as dificuldades. Agradeço às inúmeras pessoas que colocastes em meu caminho e que contribuíram imensamente com a minha caminhada; agradeço por me dar sabedoria para identificá-las e humildade para receber sua ajuda.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, do Departamento de Biologia, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Capes-PDSE, pelo apoio financeiro e por me proporcionar tão valiosa experiência no doutorado sanduiche.

À professora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, pela orientação deste trabalho, por ter confiado em mim e por ter me proporcionado tão valiosas experiências, que levarei por toda a vida. Quero também fazer um agradecimento especial à sua qualidade de ser muito humana. Agradeço pela paciência e dedicação na orientação, pela amizade, pela responsabilidade em

transmitir conhecimentos e pelo exemplo de conduta como pesquisadora e professora. Agradeço, principalmente, pela sua presença em minha vida durante o período de mestrado e doutorado e, assim, espero que permaneça por todo o meu caminho que seguirei a partir deste momento.

Ao professor Dr. Romildo da Silva, pelos ensinamentos transmitidos, atenção, brincadeiras e, em especial, pela sua alegria.

Ao professor Dr. Eustáquio Souza Dias, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e dedicação como educador.

À professora Dra. Carla Luiza da Silva Ávila, pela amizade e ensinamentos.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias e à Dra. Rosane Freitas Schwan, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção, amizade e imensa ajuda sempre que era solicitada.

Ao meu coorientador, Dr. Eduardo Jorge Valente Soares, por ter me recebido com muito carinho e atenção no ISEP, para o doutorado sanduiche e por ter me proporcionado tão grandioso aprendizado durante os doze meses que permaneci em seu laboratório, além de seu exemplo de responsabilidade, inteligência, docência e pesquisador.

Ao meu coorientador, Dra. Whasley Ferreira Duarte, pela imensa ajuda e conhecimentos transmitidos.

À Dra. Cintia Lacerda Ramos e à professora Dra. Sara Maria Chalfoun, pela participação, conselhos e colaboração em minha banca de qualificação.

À Dra. Maria Manuela Dias Machado, que contribuiu com a minha grande experiência adquirida no doutorado sanduíche em Portugal, além da amizade, carinho e companheirismo.

Aos amigos que conquistei em Portugal e que foram fundamentais em minha vida durante os doze meses de estadia naquele país. Espero que estes laços sejam eternos, pois, para mim, foram a família que tive durante aquele

período. Em especial, agradeço às minhas amigas de laboratório, Catia, Ana, Maria João, Vânia e Manuela, pelos cafés e amizade. Às minhas “irmãs” Agnes, Aninha, Mel, Raiany e meu “irmão” Leo, pela amizade, companheirismo e por todos os momentos intensos que vivemos juntos.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, pela amizade. E a Rose, pela amizade, dedicação e ajuda sempre.

À Angélica, agradeço em especial pela amizade, por todos os momentos vividos sempre juntas, bons ou ruins, perto ou a longas distâncias.

Às minhas amigas Andréia, Roberta, Camila, Ana, Cintia, Luciana, Sirlei, Mariana, Josiane, Monique e o Igor, pelos momentos mais divertidos que já tive, pela amizade, companheirismo. Vocês são muito especiais pra mim!

Ao Gustavo, Jéssica, Luiz e Matheus, pela ajuda no laboratório e na estatística. Saibam que vocês são muito importantes para mim.

A todos os meus amigos, colegas e companheiros de laboratório e de mestrado e doutorado. Não citarei nomes, pois não quero cometer o erro de esquecer alguém. Assim, agradeço a todos, e saibam que cada um tem um lugarzinho em meu coração.

Aos meus primos Fernanda, Tatiana, Moisa, Izabela, Izadora, Adriana e Matheus, obrigada por sempre estarem comigo e pela amizade.

Ao Guilherme Felisberto, por me ajudar em muitos momentos e por sempre poder contar com você.

À todos os meus familiares, pelas orações e incentivo.

Ao inimigo. Agradeço por ter me auxiliado a crescer; por me mostrar, a cada perseguição e a cada puxão de tapete, o valor da fé e da oração. Agradeço-lhe por aclarar todos os pontos falhos que tenho, cada defeito, cada erro, cada tropeço dos muitos que cometi, dos pequenos aos patéticos. Cada risada sarcástica que você dava me empurrava para o trabalho incessante em cada ponto que eu poderia melhorar. Você me ensinou o valor da humildade.

Agradeço-lhe, meu inimigo, por me ensinar o valor da coragem. Por fim, meu inimigo, agradeço-lhe por ressaltar meus valores publicamente e pelas inúmeras horas gastas no seu dia a dia com minha pessoa. Sou muito feliz por saber que, com sua ajuda, cheguei até aqui e continuarei no meu caminho.

Finalmente, agradeço aos meus pais, Luiz e Dilza e ao meu irmão Vinicius, que sempre acreditaram e apoiaram minhas decisões e estiveram presentes em todos os momentos difíceis desta jornada. E a Sophie, por me amar incondicionalmente.

RESUMO

Nos últimos trinta anos, a expansão dos setores industriais, principalmente metalurgia e mineração, revelou um aumento progressivo na geração de resíduos tóxicos. Assim, a gestão desses resíduos, no intuito de minimizar a poluição gerada, tem sido uma preocupação mundial. Sabe-se que os microrganismos têm alto poder de adsorver esses elementos traços. A levedura *Pichia kudriavzevii* foi selecionada previamente e utilizada em experimentos de bioaumentação (microcosmos) com solo artificialmente contaminado com Cd, Zn e Pb. Os resultados demonstraram que *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 foi capaz de diminuir a disponibilidade dos elementos traços, quando avaliados em extrato de solo em 37% de Cd, 16% de Zn e 48% de Pb, e que as células não viáveis são mais eficientes quando comparadas com as viáveis. *P. kudriavzevii*, quando exposta à mistura de metais (Cd, Pb e Zn) após 6 horas, mantém a integridade da membrana, mas apresenta perda da atividade metabólica e capacidade de proliferação, sendo o Pb o responsável pelos efeitos tóxicos causados na célula. O estresse oxidativo após a exposição da levedura aos multimetais parece ser responsável pela perda da integridade da membrana plasmática, uma vez que o disparo para que isso ocorresse coincidiu com o início da acumulação de ROS, também incrementado na presença de Pb. A presença de glicose aumentou a perda da integridade da membrana e a capacidade de proliferação induzida pelos elementos traço. A azida sódica alivia a toxicidade dos elementos traço sobre as células, mas os íons de Ca não foram capazes de proteger a toxicidade gerada por Cd e Pb. Estas informações podem ser úteis na utilização de *P. kudriavzevii* na biorremediação do solo e lixiviado do solo carregados com elementos traço.

Palavras-chave: *Pichia kudriavzevii*. Microcosmos. Solo. Toxicidade. Espécies reativas de oxigênio. Antioxidante. Cádmio. Zinco. Chumbo.

ABSTRACT

In the last thirty years the expansion of industrial sectors, especially metallurgy and mining, revealed a progressive increase in the generation of toxic waste. So, the management of this waste, in order to minimize the pollution generated by them, has been a global concern. It is known that microorganisms have a high capacity to absorb these trace elements. The yeast *Pichia kudriavzevii* was previously selected and used in bioaugmentation experiments (microcosms) with soil artificially contaminated with Cd, Zn and Pb. The results demonstrated that *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 was able to reduce the availability of the trace elements when evaluated in soil extract 37% of Cd, Zn 16% and Pb 48% and non-viable cells that are most efficient when compared with the feasible. This study found that when exposed to *P. kudriavzevii* mixture of metals (Cd, Pb and Zn) after 6 hours, maintaining the integrity of the membrane, but shows the loss of metabolic activity and proliferation capacity and Pb was responsible for the effects toxic caused in the cell. Oxidative stress after exposure to yeast multimetals seems to be responsible for the disruption of the plasma membrane, once the trigger of membrane integrity loss coincided with the accumulation of ROS. Also the Pb element was responsible for the accumulation of internal ROS. The presence of glucose increased the loss of membrane integrity and proliferation capacity induced by trace elements. Sodium azide alleviates toxicity of trace elements on the cells, but the Ca ions were not able to protect the toxicity generated by Cd and Pb. This information may be useful in the use of *P. kudriavzevii* in soil bioremediation and soil leachate adduced with trace elements.

Keywords: *Pichia kudriavzevii*. Microcosms. Soil. Toxicity. Reactive oxygen species. Antioxidant. Cadmium. Zinc. Lead.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Terminologia de elementos traço	16
2.2	Fontes de contaminação	16
2.3	Biodisponibilidade dos elementos traço no solo	18
2.3.1	Fatores que influenciam a biodisponibilidade dos elementos traço	18
2.3.2	Cádmio	19
2.3.3	Chumbo	20
2.3.4	Zinco	21
2.4	Teores de elementos traço permitidos pela legislação	22
2.5	Métodos convencionais de remoção de elementos traço	22
2.6	Processos de remediação	23
2.7	Processos de biorremediação	24
2.7.1	Bioaumentação	25
2.8	Interação elementos traço e microrganismos	26
2.8.1	Leveduras	28
2.8.2	Efeitos tóxicos dos elementos traços nas leveduras	29
2.8.2.1	Mecanismos de transporte	32
2.8.3	Alvos da toxicidade	35
2.8.3.1	Peroxidação lipídica e o papel da membrana	36
2.8.3.2	Oxidação das proteínas	36
2.8.3.3	Oxidação do DNA	37
2.9	Resposta da levedura aos elementos traço	37
2.9.1	Estresse oxidativo	38
2.9.1.1	Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	38
2.9.2	Estresse oxidativo mitocondrial	39
2.9.3	Indução de sistemas antioxidantes	41
2.9.3.1	Catalase	41
2.9.3.2	Superoxido desmutase	41
2.9.3.3	Glutaciona redutase (GR)	42
2.10	Mecanismos de desintoxicação e tolerância	42
2.10.1	Compartimentação no vacúolo	43
2.10.2	Sequestração com glutaciona	44
2.10.3	Exportação	45
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	48
	REFERÊNCIAS	50
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	64

ARTIGO 1 Avaliação da persistência de <i>Pichia kudriavzevii</i> e o grau de remoção de elementos traço do solo em microcosmos.....	64
ARTIGO 2 Impact of multi-metals (Cd, Pb and Zn) exposure on the physiology of the yeast <i>Pichia kudriavzevii</i>	102
ARTIGO 3 Multi-metals (Cd, Pb and Zn) induces oxidative stress in the yeast <i>Pichia kudriavzevii</i>.....	129
ARTIGO 4 Multi-metals (Cd, Pb and Zn) induce toxicity in the yeast <i>Pichia kudriavzevii</i>: impact of cell metabolic state	147

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos trinta anos, a rápida expansão e a sofisticação dos diferentes setores industriais culminaram num aumento da quantidade e da complexidade dos resíduos tóxicos gerados (GOMES et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2000). Dessa forma, no intuito de diminuir, controlar e prevenir a poluição liberada pelas indústrias, os órgãos ambientais têm buscado uma melhor gestão dos resíduos (MALIK, 2004).

Os ambientes contaminados com quantidades excessivas de elementos traço podem afetar sistemas biológicos pela sua toxicidade (WYSOCKI; TAMÁS, 2010). Os solos, quando contaminados, raramente apresentam somente com um elemento traço. Normalmente, essa contaminação acontece com dois ou mais elementos (MCBRIDE, 1994).

A recuperação de ambientes contaminados por técnicas convencionais, tais como aterros, reciclagens, pirólise e incineração, muitas vezes produz substâncias tóxicas e, conseqüentemente, as técnicas são ineficientes e, muitas vezes, com alto valor para sua aplicação (KALYANI; RAO; KRISHNAIAH, 2004).

Como consequência, novas tecnologias passaram a ser abordadas, como a utilização de tratamentos biológicos no local poluído. Os microrganismos são relatados como bons remediadores de ambientes contaminados, pois absorvem numerosos poluentes ambientais (KALYANI; RAO; KRISHNAIAH, 2004).

Os microrganismos têm amplo potencial catabólico, além das diversas estratégias de adaptação, com capacidade de manter as funções biológicas necessárias, e demonstram alto potencial para a biorremediação de locais contaminados (VOLESKY, 2004).

Em processos de biorremediação, os microrganismos necessitam ser competentes, ou seja, capazes de degradar ou acumular o contaminante. O processo de inserção de estirpes de microrganismos no ambiente contaminado é chamado bioaumentação ou semeadura, que é a adição de uma concentração determinada de especializadas populações microbianas para o local contaminado (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011).

De acordo com Kurek, Czoban e Bollag (1982), os fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccharomyces* e *Trichoderma* têm mostrado grande eficiência na remoção de elementos traço, tais como cádmio, em solução com componentes abióticos do solo.

A resistência ao cádmio, ao chumbo e ao zinco, de forma associada, já foi citada por Ubeda et al. (2014). Neste trabalho, a levedura *Pichia kudriavzevii* foi capaz de biossorver mais de um elemento traço do ambiente, eliminando aproximadamente 20% de Pb (II) e aproximadamente 50% de Cd (II). Algumas espécies microbianas desenvolveram estratégias ou mecanismos complexos para sobreviver aos efeitos tóxicos dos elementos traço. Portanto, é importante avaliar o efeito desses elementos traço nas células mais resistentes a esses elementos, para que elas sejam utilizadas como biorremediadoras em processo de bioaumentação no solo contaminado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Terminologia de elementos traço

Nas pesquisas relacionadas à contaminação no ambiente com metais é comum encontrar os termos “metais pesados” e “metal tóxico” associando os efeitos adversos destes elementos à biota e à saúde humana. Estes, porém, são termos imprecisos, uma vez que a densidade do elemento não define sua toxicidade e esta, por sua vez, é relativa à concentração do elemento contaminante e à resposta dos organismos. A biodisponibilidade é o melhor caminho para o entendimento do potencial de toxicidade dos elementos e seus compostos (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC, 2002).

A definição “metais traço” é utilizada para caracterizar os metais encontrados em baixas concentrações, com teor em torno de parte por milhão em massa, ou menor, em substratos específicos, como solo, planta, água subterrânea (IUPAC, 2002). Alguns autores também utilizam a terminologia “elementos traço” para definir metais catiônicos e aniônicos presentes em baixas concentrações (usualmente $< 0,1 \text{ dag kg}^{-1}$) em solos e plantas, sendo considerado por Hooda (2010) mais útil, pois abrange metais, metaloides e não metais. Elementos traço incluem qualquer elemento, independente de sua função química.

2.2 Fontes de contaminação

A presença de elementos traço e outras substâncias inorgânicas tóxicas no ambiente são atribuídas i) a processos naturais, como o intemperismo das rochas e o carreamento de solos e ii) a processos artificiais, os quais se

relacionam aos resíduos das atividades antropogênicas (VOLKAMER et al., 2006). Além desses processos, a contaminação por elementos traço pode ocorrer por fontes difusas, como aquelas originadas da atmosfera, da deposição sólida e da lixiviação do solo, das emissões de efluente industriais, dos esgotos domésticos, dos depósitos de lixo e dos resíduos de mineração (ADOKOH et al., 2011; OLAYINKA, 2004).

A liberação dos elementos traço no meio ambiente tem aumentado continuamente como resultado das atividades industriais e do desenvolvimento tecnológico. Isso representa uma significativa ameaça ao meio ambiente, à saúde pública e ao solo (ZAFAR; AQIL; AHMAD, 2007), já que a exposição contínua a esses elementos conduz a uma variedade de doenças.

Quando dispostos no meio ambiente em altas concentrações, os elementos traço podem interferir no crescimento das plantas e alterar a biota do solo, inibindo uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos, além de afetar a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas (GAVRILESCU, 2004).

De acordo com a Organização dos Estados Americanos (OEA), as indústrias que mais contaminam o meio ambiente são os setores de mineração e metalurgia. Estas indústrias disseminam diariamente grandes volumes de gases, resíduos aquosos e/ou sólidos, contendo elementos de toxicidade variada (VOLESKY, 2001).

Além da contaminação pelas indústrias, outras fontes de contaminação com elementos traço são relatadas, tais como efluentes de esgotos, incineradores de lixo urbano e industrial, partículas em suspensão na atmosfera e suas precipitações, e a atividade agrícola.

2.3 Biodisponibilidade dos elementos traço no solo

Os elementos traço estão, e sempre estarão, presentes em solos, sedimentos e sistemas aquáticos. A concentração destes elementos no solo antes da ação antropogênica é de pouco risco porque o crescimento de plantas ou a qualidade da água não são afetados negativamente (BRADY, 1990).

Entretanto, em locais em que os limites admissíveis no solo excedem, podendo ser biodisponíveis, geralmente valores acima de $1,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ de cádmio, 300 mg.kg^{-1} de Zn e 72 mg.kg^{-1} de Pb, o risco gerado pela presença destes elementos químicos eleva-se consideravelmente (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2009).

A disponibilidade desses elementos traço pode ser afetada pelas reações de redução/oxidação que ocorrem no solo, na quantidade em radicais orgânicos, facilitando o transporte de elementos traço e aumentando a solubilidade, evitando, em alguns casos, a sua precipitação (EMBRAPA, 2009).

2.3.1 Fatores que influenciam a biodisponibilidade dos elementos traço

A fração à qual o elemento traço está associada ao solo é de relevância, devido à sua mobilidade e disponibilidade no solo, sendo influenciada pelo pH, matéria orgânica e sua composição, minerais de argila, presença de óxidos e hidróxidos de Fe/Mn/Al, potencial redox, concentração de sais e de agentes complexantes e teor em cátions e ânions da solução do solo (ALLOWAY, 1995; TABAK; HULLEBUSH; DEJONGHE, 2004).

Essa influência é exercida nas constantes de equilíbrio das diferentes reações que transferem os elementos traço de uma fase para outra: precipitação e dissolução, complexação e descomplexação, adsorção e dessorção (Figura 1) (VIOLANTE et al., 2010).

Existe um grande número de ligantes no solo, orgânicos ou inorgânicos, com os quais os elementos traço podem formar reações de complexação. Os compostos orgânicos têm afinidade para cátions metálicos, devido à presença de ligantes ou grupos que formam complexos com o elemento traço. Com o aumento do pH, os grupos funcionais carboxílicos, fenólicos, alcoólicos e carbonílicos da matéria orgânica dissociam-se (perdem o próton e adquirem carga negativa), aumentando, assim, a sua afinidade como ligantes para os cátions metálicos. A ordem geral de afinidade dos cátions metálicos por ligantes orgânicos é a seguinte (ADRIANO et al., 2004; VIOLANTE; KRISHNAMURTI; PIGNA, 2008):

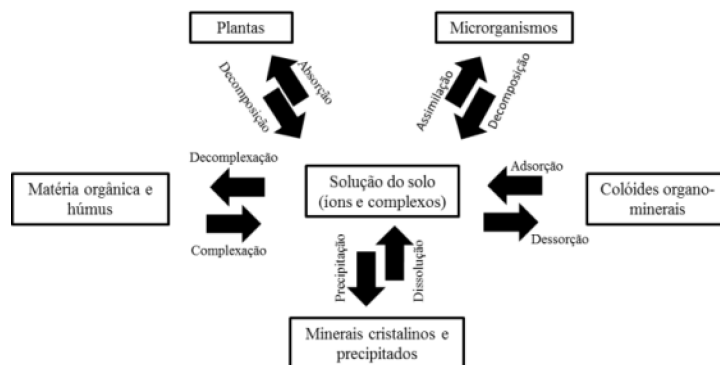
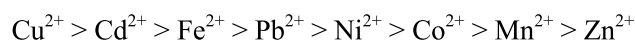


Figura 1 Equilíbrio dinâmico dos elementos traço no solo
Fonte: Adaptado de Alloway (1995)

2.3.2 Cádmi

Cerca de 20.000 toneladas por ano de cádmio são liberados no ambiente por processos industriais, causando efeitos tóxicos e cancerígenos (GOMES et al., 2011). Em 2001, o cádmio foi classificado na lista "de substâncias mais perigosas" da *Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act* (CERCLA), juntamente com a *Environmental Protection Agency*

(EPA) e *Agency for toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), na qual as substâncias são classificadas de acordo com sua toxicidade, potencial de risco à saúde e exposição destes aos organismos vivos.

O cádmio é amplamente utilizado nas indústrias automobilísticas (34% do total), em revestimentos metálicos e telecomunicações; outros 23% em processos de pigmentação, sendo também utilizado na fabricação de policloreto de vinila (PVC) e outros plásticos. É encontrado em grandes quantidades de resíduos urbanos e em descargas de indústrias metalúrgicas (GOMES et al., 2011).

Os teores de Cd permitidos para solos não contaminados são menores que $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), embora possam ser encontrados $10,0 \text{ mg de Cd kg}^{-1}$ em Latossolos do Cerrado brasileiro (FADIGAS et al., 2002).

2.3.3 Chumbo

O chumbo, geralmente, ocorre como Pb^{+2} e é encontrado em silicatos. Apresenta características químicas semelhantes às do grupo dos elementos traço alcalinos terrosos, o que determina habilidade em deslocar tais elementos (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Segundo McBride (1994), o Pb é considerado um dos elementos traço menos móveis no solo, podendo ser complexado pela matéria orgânica, quimiossorvido em óxidos e minerais silicatados e precipitado como carbonato, hidróxidos ou fosfato, em condições de altos valores de pH. Os principais minerais de chumbo são galena (PbS) e cerussite (PbCO_3); anglesite (PbSO_4) e piromorfite ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$) (CROOK, 1921). O chumbo é, normalmente, encontrado em minérios, juntamente com cobre, zinco e prata. Também é um elemento traço muito tóxico, pois afeta o sistema nervoso central e periférico, os rins e a pressão arterial. Hoje é

amplamente utilizado na construção civil, em baterias de chumbo-ácidas, além de pesos, soldas, ligas de estanho, fusíveis e munições para armas de fogo (CHENG; HU, 2010).

2.3.4 Zinco

O zinco (Zn) é um micronutriente essencial para as plantas e para os humanos, e o seu teor total no solo varia de 10 a 300 mg kg⁻¹ (PAIS; JONES JUNIOR, 2000). Nas rochas, o Zn ocorre, principalmente, como sulfetos, mas também pode aparecer em substituições isomórficas de silicatos, no lugar de Mg⁺², e a solubilização pelo intemperismo produz o íon Zn⁺² (RAIJ, 1991). Em solo ácido, este íon forma ligações eletrostáticas com minerais de argila e matéria orgânica, o que lhe confere solubilidade. Entretanto, em solos com valores de pH mais elevado ocorre sua adsorção por óxidos e aluminossilicatos, além de complexação pela matéria orgânica, o que faz com que sua solubilidade diminua (MCBRIDE, 1994).

O zinco, presente na forma biológica de íons Zn²⁺, é um componente essencial de mais de 300 enzimas, incluindo RNA polimerase, fosfatase alcalina, álcool desidrogenase, anidrase carbônica e várias carboxipeptidases. Também realiza um papel estrutural em muitas proteínas não catalíticas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; GUERINOT; EIDE, 1999). Este íon forma ligações eletrostáticas com minerais de argila e matéria orgânica do solo, o que lhe confere solubilidade. Entretanto, em solos com valores de pH mais elevados ocorre sua adsorção por óxidos e aluminossilicatos, além de complexação pela matéria orgânica, o que faz com que sua solubilidade diminua (MCBRIDE, 1994).

2.4 Teores de elementos traço permitidos pela legislação

Os órgãos de monitoramento ambiental necessitam de indicadores de referência para a avaliação dos impactos ambientais e da extensão da poluição de uma área. Esses indicadores são obtidos por meio da comparação entre os teores totais de elementos tóxicos de um ambiente com valores determinados em condições naturais (não poluídos) ou com valores de referência (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 2001).

A legislação brasileira estabelece os valores de referência de qualidade (VRQs), de prevenção (VP) e de investigação (VI). O VRQ indica o limite de qualidade para um solo considerado limpo a ser utilizado em ações de prevenção e no controle de áreas contaminadas. O VP é o intermediário entre o VRQ e o VI, que representa a concentração de determinada substância no solo, acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana. Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009), os valores de prevenção para cádmio, chumbo e zinco são de 1,3; 72 e 300 mg.kg⁻¹ de peso seco, respectivamente (BRASIL, 2009).

2.5 Métodos convencionais de remoção de elementos traço

Várias técnicas de descontaminação de solos, águas e sedimentos contendo elementos traço têm sido utilizadas. Dentre elas destacam-se precipitação, trocas iônicas, técnicas de alto impacto, como a lixiviação do solo com produtos químicos ou completa remoção e transferência para aterros (GOYAL; JAIN; BANERJEE, 2003).

Conforme Malik (2004) relatou, tais métodos apresentaram sucesso em situações específicas, porém, há dificuldades operacionais relacionadas ao tipo de solo, à produção de metabólitos, à destruição do local e um provável aumento

do contaminante mobilizado que limita o seu uso, além do alto custo de operação. O método convencional de remediação envolve solidificação, estabilização, vitrificação, escavação e remoção do contaminante do leito do solo, ou sua lavagem com ácidos fortes ou agentes quelantes (GOYAL; JAIN; BANERJEE, 2003; KALYANI; RAO; KRISHNAIAH, 2004; LAZARIDIS; JEKEL; ZOUBOULIS, 2003).

Pesquisas correlacionadas com poluição com elementos traço vêm sendo desenvolvidas como alternativas promissoras para a remediação do solo, as quais são menos agressivas ao ambiente (ecologicamente corretas) e economicamente mais viáveis (MALIK, 2004). A biorremediação surge como uma dessas alternativas.

2.6 Processos de remediação

Os métodos de remediação mais empregados com sucesso ao longo dos anos, seja “in situ” ou “ex situ” e que são aceitos em todo o mundo, incluem a remoção e redistribuição de solos, o bombeamento e o tratamento de águas subterrâneas, a injeção de ar (*air sparging*), a extração de vapores (forma gradiente de pressões no solo), a biorremediação com microrganismos biodegradadores de poluentes, as barreiras reativas e a atenuação natural monitorada (CETESB, 2001).

Dentre os métodos mais comumente utilizados na remediação de áreas contaminadas está a biorremediação, em que organismos vivos podem eliminar ou reduzir contaminantes de áreas poluídas.

2.7 Processos de biorremediação

O termo “biorremediação” está, normalmente, associado à despoluição ambiental utilizando sistemas biológicos. Estes sistemas biológicos, tais como plantas e microrganismos, podem transformar os poluentes em produtos menos perigosos para o ambiente (REIS; ALMEIDA; ZUNGAILIA, 2003). Os elementos traço não podem ser degradados química ou biologicamente, portanto, persistem no solo. A biorremediação destes elementos busca a remoção ou a alteração das formas tóxicas (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

A técnica mais comumente utilizada de biorremediação é a fitorremediação, na qual utilizam-se plantas para extrair, conter ou imobilizar contaminantes do solo e da água. Sua efetividade está limitada pela capacidade da planta em sorver os elementos traço das superfícies das partículas do solo e da solubilidade desses elementos. Outras limitações estão relacionadas ao clima, ao tipo de solo, à estação do ano, à concentração e à profundidade do contaminante e à interferência do contaminante no crescimento da planta, o que, muitas vezes, leva a um crescimento lento, aumentando o tempo necessário para o processo de descontaminação (REIS; ALMEIDA; ZUNGAILIA, 2003).

Buosi e Felfili (2004) avaliaram a contaminação gerada por uma fábrica de hexaclorociclo-hexano (HCH), um pesticida organoclorado, que foi desativada entre os anos de 1960 e 1965, na Cidade de Meninos, RJ. Associado à aplicação da cal e à agregação de adubo orgânico ao solo, foi sugerido o plantio de *Eucalyptus grandis* e de *Corymbria citriodora*, visando à fitorremediação, que foi realizada com resultados positivos e com teores mais baixos do que os encontrados em trabalhos anteriores.

Outra técnica de biorremediação pode ser utilizada. Ela envolve o uso de microrganismos na remoção de poluentes do ambiente (BARKAY; SCHAEFER, 2001). Os microrganismos podem sequestrar os elementos traço

dos solos e sedimentos, facilitando a sua extração ou, mesmo, alterar a especiação dos contaminantes (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

A utilização dos microrganismos na biorremediação tem grande importância porque eles podem atuar em conjunto com a fitorremediação, aumentando o poder de remediar uma área contaminada. Este consórcio entre plantas e microrganismos tem importância devido ao fato de os microrganismos serem capazes de transformar substâncias químicas no solo, favorecendo a sua captura pelas plantas, ou atuando sobre os produtos já metabolizados pelas plantas como resultado da remediação (REIS; ALMEIDA; ZUNGAILIA, 2003).

Siciliano et al. (2003) avaliaram o impacto e a capacidade de degradação de hidrocarbonetos pela comunidade microbiana no solo, no intuito de determinar se a fitorremediação aumenta o potencial metabólico da comunidade microbiana do solo pela alteração da sua estrutura taxonômica. Foi verificado que o aumento da população bacteriana contendo genes para o catabolismo de hidrocarbonetos na rizosfera diminuiu a concentração de hidrocarbonetos no solo.

2.7.1 Bioaumentação

A bioaumentação, ou sementeira, é a adição de uma elevada concentração de populações microbianas especializadas (linhagens individuais ou consórcios) para o local contaminado com compostos tóxicos, tais como os elementos traço. Esta técnica é mais adequada para locais que não têm células microbianas suficientes ou a população nativa não tem as vias metabólicas necessárias para metabolizar os compostos contaminantes (GENTRY; RENSING; PEPPER, 2004).

O passo inicial de rastreio/seleção da estirpe a ser utilizada deve ser baseado no potencial metabólico e também nas características essenciais que

permitam que as células estejam funcionalmente ativas e persistentes nas condições ambientais desejadas (GAST; WHITELEY; THOMPSON, 2004; THOMPSON et al., 2005; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011).

Em estudos realizados por Wang et al. (2014) foi demonstrado que a espécie mutante *Bacillus subtilis* 38 (B38), adquirida por irradiação UV, revelou ser um bom bioissorvente para a adsorção de diversos elementos traço (cádmio, crômio, mercúrio e chumbo) no solo. A tecnologia de bioaumentação foi analisada em campo e demonstrou redução na concentração de elementos traço na parte comestível do rabanete entre 30,8% e 96,0% de Cd, Cr, Hg e Pb.

Sprocati et al. (2012) avaliaram a bioaumentação com microrganismos em solo contaminado com óleo diesel (1%, v/w) e elementos traço (Pb e Zn), utilizando microcosmos do solo. O bioaumento foi realizado por meio da introdução de 12 cepas alóctones pertencentes a uma população previamente isolada de um local poluído com hidrocarbonetos e elementos traço. A biorremediação foi eficaz, demonstrando degradação do óleo diesel próximo a 75%, na presença dos elementos traço biodisponíveis.

2.8 Interação elementos traço e microrganismos

As interações entre elementos traços e microrganismos têm como objetivo recuperar, remover ou desintoxicar poluentes inorgânicos e orgânicos ou radionuclídeos (FRANCIS, 1998; LOVLEY; COATES, 1997). Segundo Ledin (2000), vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com os elementos traço, conforme resumido na Figura 2.

Os microrganismos têm capacidade de se ligar a íons metálicos presentes no ambiente externo à superfície celular ou de transportá-los para o interior da célula para várias funções intracelulares (GADD, 1990).

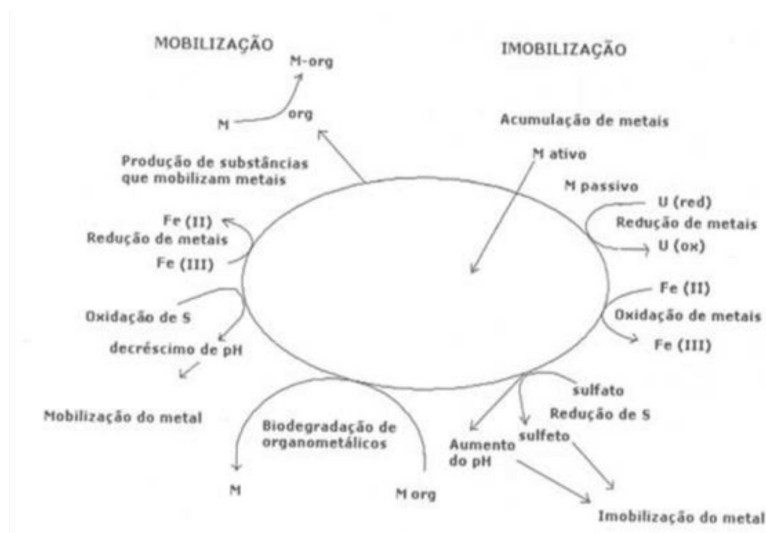


Figura 2 Interação entre elementos traço e microrganismos
 Fonte: Ledin (2000)

Os processos biológicos realizados pelos microrganismos podem solubilizar os elementos traços, contribuindo para aumentar a sua biodisponibilidade e potencial toxicidade, como também podem imobilizá-los, reduzindo sua biodisponibilidade e toxicidade (GAVRILESCU, 2004; WHITE; SAYER; GADD, 1997).

A mobilização dos elementos traço é a passagem de um estado insolúvel inicial, correspondente a uma fase sólida, para um estado solúvel final em fase aquosa (PÉREZ, 2006). Este processo abrange a lixiviação, a quelação por metabólitos microbianos e sideróforos, e a metilação, que pode resultar na sua volatilização (WHITE; SAYER; GADD, 1997). Os microrganismos ainda podem mobilizar metaloides e compostos organometálicos, por meio de reações de oxidação-redução (GADD, 2004).

Dentre os tipos de mobilização, a lixiviação autotrófica de sulfuretos metálicos, tais como ácido sulfúrico por espécies *Thiobacillus*, tem sido utilizada para a solubilização dos elementos traço, a partir das lamas de águas

residuais, permitindo, assim, a separação do lodo, que pode, então, ser utilizado como fertilizante (GADD, 2004). Um exemplo de utilização de lixiviação heterotrófica é a solubilização da piromorfita ($(\text{Pb}_5\text{PO}_4)_3\text{Cl}$) por fungos solubilizadores de fosfato, como *Aspergillus niger*. Neste processo é observada a produção biogênica de dioxalato de chumbo, demonstrando a importância desta técnica na remediação de solos contaminados com elementos traço (GADD, 2000).

A metilação microbiana também é um processo de mobilização. Segundo Gadd (2000), o tratamento “in situ” de água e solo contaminado com selênio pode ser realizado com esta técnica, citando como exemplo a área tratada no reservatório Kesterson, na Califórnia.

A imobilização é definida como a passagem de um estado solúvel inicial em fase aquosa para um insolúvel final em fase sólida (PÉREZ, 2006). Os processos de imobilização permitem a transformação *in situ* em formas insolúveis e inertes (WHITE; SAYER; GADD, 1997).

2.8.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares eucarióticos, etimologicamente associados a processos de fermentação. Estudos relacionados à levedura *Saccharomyces cerevisiae* já demonstraram que a levedura tem capacidade de realizar a bioissorção de Cd. Quando comparada com outros bioissorventes, ela pode ser considerada um biomaterial com características únicas para a investigação e a aplicação prática da bioissorção (GOKSUNGUR; UREN; GUVENC, 2005; WANG; CHEN, 2006; ZOUBOULIS; MATIS; LAZARIDIS, 2001).

A célula da levedura pode atuar como um agente quelante e o biosurfactante produzido pelas leveduras também pode ser utilizado em

processos de tratamento de áreas contaminadas. Segundo Rufino et al. (2011), o biosurfactante bruto remove cerca de 96% de Zn e Cu, e reduz as concentrações de Pb, Cd e Fe. Neste trabalho, o solo e os contaminantes foram preparados para a percolação do biosurfactante e a condutividade hidráulica foi medida ao longo da percolação dos fluidos, mostrando que o biosurfactante reduziu significativamente a permeabilidade do solo, o que demonstrou a sua aplicabilidade como um aditivo em barreiras reativas.

A composição em polissacarídeos, a estrutura e a espessura da parede celular das leveduras variam consideravelmente com as condições ambientais (KLIS; BOORSMA; GROOT, 2006). Uma grande variedade de potenciais sítios para a complexação de elementos traço, como grupos carboxilato, fosfato, sulfidril e amino, pode estar presente nas paredes das células das leveduras (ZOUBOULIS; MATIS; LAZARIDIS, 2001).

A levedura *Pichia kudriavzevii* é capaz de bioissorver mais de um elemento traço do ambiente, quando testada em processos de biocontrole de fungos e biorremediação de águas residuais, removendo, aproximadamente, 20% de Pb (II) e 50% de Cd (II). Nesse trabalho, demonstrou-se que *P. kudriavzevii* é uma boa candidata para biocontrole e biorremediação porque inibiu fungos e acumulou a maior proporção de três elementos traço testados (UBEDA et al., 2014).

2.8.2 Efeitos tóxicos dos elementos traços nas leveduras

A toxicidade de um determinado elemento traço é governada por seus mecanismos de absorção, estado de oxidação e especiação, distribuição intracelular e interações com as macromoléculas, e depende de suas propriedades físico-químicas e preferências dos ligantes (LEDIN, 2000). Quase todos os elementos traço (incluindo não essenciais, Hg, As, Cd e Pb) exibem alta

reatividade com grupos sulfidrilas. Esta propriedade pode contribuir para a sua toxicidade, mas também é explorada por células para detoxificação. A toxicidade do elemento traço leva ao estresse oxidativo, à reparação do DNA danificado, à inibição da função das enzimas e, por perturbação da função de proteínas que regulam a proliferação, à progressão do ciclo celular, à apoptose ou à diferenciação (Figura 3) (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008; STOHS; BAGCHI, 1995).

O cádmio (Cd^{2+}) provoca hipermutabilidade nas células, inibindo o sistema de reparação do DNA, tais como enzimas de reparo (JIN et al., 2003), a reparação na excisão das bases (BRAVARD et al., 2006) e nos sistemas de reparação da excisão dos nucleotídeos (GIAGINIS; GATZIDOU; THEOCHARIS, 2006). O Cd^{2+} tem alta afinidade do com os grupos tiol (STOHS; BAGCHI, 1995), o que levaria à inibição das enzimas essenciais (FALLER; KIENZLER; KRIEGER-LISZKAY, 2005). Outro efeito do Cd^{2+} na célula é o estresse oxidativo pelo aumento dos níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em maior peroxidação lipídica e dano ao DNA (TOLEDANO et al., 2003). Outra hipótese é de que o Cd^{2+} inibe a cadeia de transferência de elétrons na mitocôndria. Ele é também um indutor de apoptose em levedura, com perda da membrana mitocondrial (GARDARIN et al., 2010; NARGUND; AVERY; HOUGHTON, 2008).

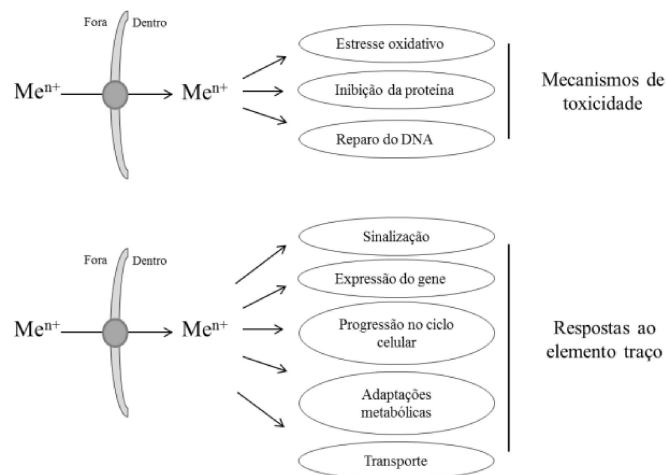


Figura 3 Esquema dos mecanismos de toxicidade de elementos traços e as respostas dos elementos traços. Muitos elementos traços desencadeiam o estresse oxidativo nas células, interferem na função e na atividade das proteínas e/ou prejudicam os mecanismos de reparo do DNA, direta ou indiretamente. Em resposta à exposição aos elementos traços, as células param de progredir no ciclo celular, a expressão genética e metabólica é alterada, se ajustando a processos de transporte para guardar a integridade celular e genética

Fonte: Wysocki e Tamás (2010)

Outro elemento traço que pode causar grande toxicidade as células é o Pb. A toxicidade gerada pelo Pb (II) ocorre como resultado das alterações na conformação de ácidos nucleicos e proteínas, na inibição da atividade enzimática, na perturbação de funções da membrana e na fosforilação oxidativa, assim como alterações no equilíbrio osmótico (JAROSŁAWIECKA; PIOTROWSKA-SEGET, 2014). O Pb (II) também apresenta forte afinidade para os grupos tiol e de oxigênio dos elementos traço essenciais, tais como cálcio e zinco (HEGGEN et al., 2010). Heggen et al. (2010) demonstraram que a inibição da formação de estruturas cilíndricas intravacuolares (CIVS) em células de *S. cerevisiae* expostas ao Pb sugere que a glutatona (GSH) ou a

compartimentação vacuolar podem estar envolvidas nos mecanismos de defesa da célula.

O elemento Zn também pode causar toxicidade à célula das leveduras. Os altos níveis de zinco no metabolismo celular de levedura prejudicam a síntese proteica e afetam os fosfolípidos da membrana (DE NICOLA; WALKER, 2009). Em *S. cerevisiae*, dois sistemas de absorção do zinco foram descritos no plasma da membrana: alta afinidade do sistema com K_d (constante de afinidade) = 10 nM, ativo em células com limitadas taxas de zinco e um sistema de baixa afinidade com K_d = 100 nM, ativo em células com muito zinco (ZHAO; EIDE, 1996). Uma vez transportada na membrana através da célula, as células de levedura acumulam os íons de zinco no vacúolo, junto com outros cátions metálicos, tais como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} e os cátions monovalentes K^+ , Li^+ e Cs^+ . A acumulação de zinco vacuolar é controlada por, pelo menos, três transportadores (DE NICOLA; WALKER, 2009).

2.8.2.1 Mecanismos de transporte

As permeases da membrana plasmática e canais nas células evoluíram para a captação dos elementos traço e outros nutrientes, tais como Fe, Mn, Zn, fosfato, sulfato e glicerol. No entanto, todos os organismos, incluindo as leveduras, desenvolveram mecanismos que podem reduzir este influxo por regulação dos níveis da expressão na transcrição e pós-transcrição e/ou inibindo as atividades do transporte (GOMES et al., 2002).

Os mecanismos sugeridos para o transporte de íons metálicos em células microbianas incluem peroxidação lipídica, complexo de permeação, mediadores do transporte, bombas e canais iônicos, e endocitose (BLACKWELL; SINGLETON; TOBIN, 1995). A maioria dos mecanismos de transporte dos elementos traço parece necessitar de prótons através da membrana da célula, que

tem um produto químico e potencial elétrico, os quais são responsáveis pelo transporte de solutos ionizados através das membranas (GADD, 1993).

O Cd entra nas células através de proteínas envolvidas na absorção de cátions essenciais, como Zn (através Zrt1p), Mn (Smf1p , Smf2p), Fe (Fet4p) e Ca (Mid1p). Inicialmente, o cádmio seria removido através do transportador Zrt1, que pertence à proteína Zrt e Irt, com alta afinidade no transporte do Zn (Figura 4) (ZHAO; EIDE, 1996). Uma vez dentro da célula, o Cd forma um complexo com a glutatona reduzida, o que faria com que ele fosse sequestrado no vacúolo pela proteína YCF1 (GOMES et al., 2002). O cádmio pode também formar um complexo com as proteínas chamadas metalotioneínas.

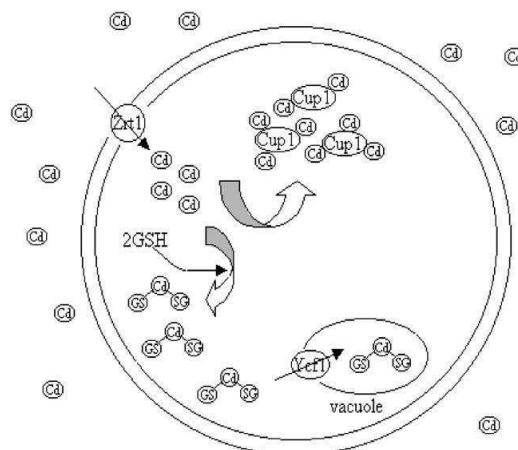


Figura 4 Modelo do mecanismo de transporte do cádmio em *S. cerevisiae*
Fonte: Wysocki e Tamás (2010)

Ramsay e Gadd (1997) confirmaram o papel do vacúolo em resposta a elementos traço potencialmente tóxicos em *S. cerevisiae*. Neste estudo verificaram-se o aumento da sensibilidade e uma grande diminuição da capacidade das estirpes deficientes de vacúolo em acumular Zn, Mn, Co e Ni,

assim confirmando o papel essencial do vacúolo na desintoxicação destes metais.

O transporte de Zn na célula é importante. Na maioria dos casos, Zn^{2+} desempenha um papel estrutural na definição de forma da proteína. A dependência de absorção do Zn^{2+} pelas células de levedura mostrou a presença de, pelo menos, dois sistemas de captação (Figura 5). O gene que codifica o transportador de alta afinidade de zinco é *ZRT1*. A Zrt1p pertence à proteína Zrt e Irt, com alta afinidade no transporte do Zn (ZHAO; EIDE, 1996).

O papel do chumbo em células de leveduras ainda não foi totalmente elucidado e pouco se sabe sobre o transporte. O transporte saturável por canais de cálcio tem sido mostrado para o Pb em células humanas (SIMONS; POCOCK, 1987).

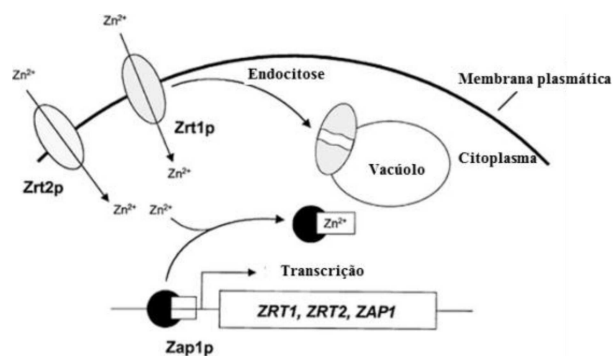


Figura 5 Modelo de transporte de zinco. Transporte de Zn^{2+} por Zrt1p (de alta afinidade) e Zrt2p (baixa afinidade) para dentro da célula. Os genes que codificam Zrt1p e Zrt2p são transcricionalmente regulados pela atividade de Zap1p, que ativa a transcrição sob condições limitantes de zinco. No nível pós-tradução, Zrt1p sofre endocitose e é degradado dentro dos vacúolos

Fonte: Ho, Ward e Kaplan (2002).

2.8.3 Alvos da toxicidade

As funções biológicas de Cd^{2+} , os mecanismos de toxicidade induzida e as estratégias desenvolvidas por organismos vivos, em resposta à exposição a Cd^{2+} , não estão completamente compreendidos (TAMAS et al., 2006). Uma evidência crescente indica que mecanismos multifatoriais podem estar envolvidos na toxicidade induzida por cádmio, devido à inibição de algumas enzimas essenciais (STOHS; BAGCHI, 1995; TAMAS et al., 2006). O cádmio, como outros elementos traços, também pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem atacar e danificar todas as macromoléculas da célula e levar a oxidação das proteínas, peroxidação lipídica e dano ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Além disso, o cádmio amplifica os efeitos induzidos por estresse oxidativo, esgotando a glutatona citosólica (GSH) (BAUDOUIN-CORNU; LABARRE, 2006; THORSEN et al., 2007). O cádmio tem fortes efeitos mutagênicos; induz eventos de recombinação (BRENNAN; SCHIESTL, 1996), substituições de base e mutações frame-turno (JIN et al., 2003), mesmo em baixas concentrações.

O Pb pode acarretar a perda de viabilidade celular (SOARES et al., 2002; SOARES; HEBBELINCK; SOARES, 2003; SUH; YUN; KIM, 1999) e a inibição do crescimento de células (CHEN; WANG, 2007; SAKAMOTO et al., 2010) e da atividade metabólica (HEGGEN et al., 2010), prejudicando a assimilação de amônio, reduzindo a proporção de DNA/RNA (CHEN; WANG, 2007) e provocando danos ao DNA (YUAN; TANG, 1999). Segundo Bussche e Soares (2011), o chumbo tem a capacidade de alterar morfológicamente os núcleos celulares e produzir as espécies reativas de oxigênio (ROS), cuja acumulação pode induzir e regular a morte celular por apoptose. Perez et al. (2013) relatam que a glutatona citosólica (GSH) deve estar envolvida na defesa contra a toxicidade do chumbo, dado que a depleção de GSH aumenta a

sensibilidade ao chumbo e o seu enriquecimento celular apresenta efeito contrário.

O excesso de zinco pode ser tóxico para as células. A toxicidade de zinco pode ser mediada, via ligação cátion, a lugares impróprios em proteínas ou cofatores (COSTELLO et al., 1997; EIDE, 2003). A natureza essencial, mas potencialmente tóxica, do zinco necessita de mecanismos precisos de controle homeostático. Em *E. coli*, a homeostase de zinco é realizada, em grande parte, através do controle transcricional de captação de zinco e do efluxo dos transportadores (EIDE, 2003).

2.8.3.1 Peroxidação lipídica e o papel da membrana

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando, principalmente, radical alquila, alcóxila e peróxila. Este processo leva à destruição da estrutura celular, à falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

2.8.3.2 Oxidação das proteínas

Os danos oxidativos das proteínas influenciam negativamente as funções homeostáticas das células e comprometem a viabilidade das células. Todos os ROS, incluindo os peróxidos lipídicos, podem oxidar proteínas através de vários caminhos diferentes, resultando na formação de carbonilas de proteínas. Os grupos tiol (-SH) de cisteína, metionina e os resíduos de fenilalanina (aminoácidos aromáticos) são particularmente sensíveis à oxidação por todas as ROS (BERLETT; STADTMAN, 1997). As consequências fisiológicas da

oxidação da actina em leveduras incluem envelhecimento acelerado e a morte celular por apoptose (FARAH; AMBERG, 2007).

2.8.3.3 Oxidação do DNA

Os ácidos nucleicos podem sofrer mutações causadas por ROS. Estas mutações incluem quebras dos filamentos simples ou duplos, modificação de base, locais abásicos e ligação cruzada na DNA-proteína (FINN; LOWNDES; GRENON, 2011). As mutações induzidas por oxidação comprometem a integridade do DNA e sua funcionalidade tem sido implicada no desenvolvimento de patologias, tais como o câncer (AMES; GOLD; WILLETT, 1995) e no envelhecimento (BURHANS; WEINBERGER, 2012).

2.9 Resposta da levedura aos elementos traço

As células de levedura expressam antioxidantes que protegem suficientemente contra o ROS. No entanto, essas defesas constitutivas não podem proteger as células dos repentinos danos oxidativos (TEMPLE; PERRONE; DAWES, 2005). Portanto, as leveduras acabaram por evoluir a habilidade de percepção aos agressivos estresses e gerar rápidas respostas adaptativas à maior acumulação de ROS. O aparecimento do estresse oxidativo nas células de levedura, geralmente, induz uma resposta inicial, com uma transmissão de sinais no início do estresse e, conseqüentemente, a síntese de defesas antioxidantes (GASCH et al., 2000; TEMPLE; PERRONE; DAWES, 2005). Isso leva a uma resposta tardia, envolvendo a síntese e a ativação de novas defesas antioxidantes, a reparação das biomoléculas oxidadas e a restauração do equilíbrio redox celular (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

2.9.1 Estresse oxidativo

A geração de ROS pode sobrecarregar as defesas intrínsecas antioxidantes das células e resultar em uma condição conhecida como "estresse oxidativo". As células sob estresse oxidativo exibem várias disfunções devido a lesões causadas por ROS nos lipídios, proteínas e DNA. Consequentemente, é sugerido que o estresse oxidativo induzido por metais em células pode ser parcialmente responsável pelos efeitos tóxicos de elementos traço (LUSHCHAK; LUSHCHAK, 2008).

2.9.1.1 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas que consistem em um número de diversas espécies químicas, incluindo ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CUI; KONG; ZHANG, 2012). Estes ROS, normalmente, surgem por causa de vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons para dioxigênio (O_2), durante a respiração aeróbia (Figura 6) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Devido ao seu potencial para provocar a deterioração oxidativa no DNA, proteínas, e lipídeos (YOKOZAWA et al., 2011), os ROS são gerados, essencialmente, como subprodutos da respiração mitocondrial, as mitocôndrias são o principal alvo de danos oxidativos e desempenham papel importante no envelhecimento (CUI; KONG; ZHANG, 2012). A falha das defesas antioxidantes para impedir a acumulação de ROS nas células inevitavelmente resulta em estresse oxidativo, uma condição amplamente definida como um desequilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes. Este ROS, potencialmente, leva a uma situação em que biomoléculas celulares importantes sofrem graves

danos oxidativos, comprometendo, assim, a viabilidade das células (HALLIWELL; CROSS, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.9.2 Estresse oxidativo mitocondrial

A maioria das ROS é produto da respiração mitocondrial. Aproximadamente 1% a 2% do oxigênio molecular consumido durante a respiração fisiológica normal são convertidos em radicais superóxido. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial contém vários centros redox, os quais podem vaziar elétrons para o oxigênio molecular, servindo como a principal fonte de produção de superóxido, na maioria dos tecidos (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007).

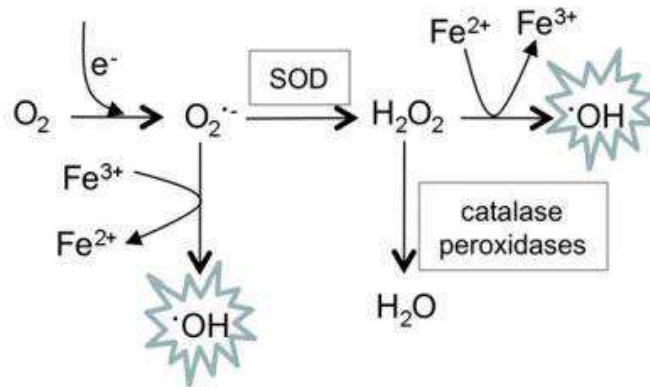


Figura 6 Geração de ROS. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ser formado via vazamento de elétrons de oxigênio da cadeia de transporte de elétrons. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado pelo colapso de catálises superóxido pela superóxido desmutase (SODs). O peróxido de hidrogênio pode ser reduzido a ferro (Fe^{2+}) na reação de Fenton, para produzir radical hidroxil altamente reativo. Na reação Haber-Weiss, superóxido pode doar um elétron para ferro, gerando um radical hidroxil e Fe^{2+} , que pode, futuramente, reduzir o peróxido de hidrogênio. Várias enzimas antioxidantes, incluindo catalases e peroxidases, detoxificam o peróxido de hidrogênio para prevenir a geração de ROS

Fonte: Morano, Grant e Moye-Rowley (2012)

Um alvo crítico ao estresse oxidativo é o DNA mitocondrial, que causa a perda do transporte de elétrons, do potencial da membrana mitocondrial e a produção de ATP. Quando danificado, o DNA mitocondrial pode, ainda, amplificar o efeito do estresse oxidativo pela diminuição da expressão de proteínas importantes no transporte dos elétrons, levando a um ciclo vicioso de produção de ROS e de desregulação da organela. Todos estes fatores podem conduzir à morte celular (HOUTEN; WOSHNER; SANTOS, 2006).

2.9.3 Indução de sistemas antioxidantes

As células têm sistemas enzimáticos e não enzimáticos de defesa para proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox celular. Sistemas de defesa não enzimáticos consistem, tipicamente, em moléculas pequenas que são solúveis em qualquer ambiente aquoso ou, em alguns casos, um ambiente de lipídeos. Eles agem, em geral, como varredores de radicais, sendo oxidados por ROS e removendo oxidantes a partir da solução. As defesas antioxidantes celulares incluem também várias enzimas, que são capazes de remover os radicais de oxigênio e os seus produtos e/ou reparar os danos causados pelo estresse oxidativo (JAMIESON, 1998).

2.9.3.1 Catalase

Esta enzima catalisa a quebra de H_2O_2 em O_2 e H_2O . A levedura *S. cerevisiae* apresenta duas destas enzimas, a catalase A e a catalase T, que são codificadas pelos genes *Cta1* e *Ctt1*, respectivamente (FARRUGIA; BALZAN, 2012). A catalase A tem a função de remover H_2O_2 produzido pela oxidação dos ácidos graxos. O papel fisiológico da enzima citosólica, catalase T, é menos claro. Os genes da catalase são moderadamente induzidos por H_2O_2 , mas ambas as catalases são importantes na resistência a H_2O_2 (JAMIESON, 1998).

2.9.3.2 Superóxido desmutase

A superóxido desmutase (SOD) é um desproporcionador de ânion superóxido de H_2O_2 e O_2 . A Cu/ZnSod parece ser a principal enzima envolvida na remoção de ânions superóxido a partir do citoplasma e, possivelmente, também do peroxissoma, enquanto o papel fisiológico da MnSOD parece ser de

proteger a mitocôndria de superóxidos gerados durante a respiração (JAMIESON, 1998; O'BRIEN et al., 2004).

2.9.3.3 Glutathione redutase (GR)

A glutathione redutase é um potente substrato de uma enzima específica da família das flavoenzimas (FAD), que desempenham papel essencial, catalisando as formas oxidadas da glutathione (GSSG) para a forma reduzida (GSH) mediada por NADPH (Figura 7). A GR pertence ao sistema de defesa do organismo contra agentes químicos e ao estresse oxidativo. A deficiência desta enzima é caracterizada por hemólise, devido ao aumento da sensibilidade das membranas de eritrócitos ao H_2O_2 e contribui para o estresse oxidativo, que desempenha papel chave na patogênese de muitas doenças (TANDOGAN; NURAY, 2006).

2.10 Mecanismos de desintoxicação e tolerância

O mecanismo de tolerância aos elementos traço na célula está correlacionado com o citosol por meio de vias de exportação. Enquanto procariontes têm várias rotas de exportação, em *S. cerevisiae* existem apenas duas vias caracterizadas: Acr3p e Pca1p, que catalisam o efluxo de As (III) e de Cd (II), respectivamente (ADLE et al., 2007; WYSOCKI; TAMAS, 2010). Devido à sua importância, à tolerância e à alta especificidade a um determinado elemento traço, Acr3p e Pca1p são reguladas por mecanismos sensíveis a elementos traço (ADLE; LEE, 2008; WYSOCKI; TAMAS, 2010). Os transportadores localizados na membrana vacuolar também removem elemento traço do citosol por compartimentação, catalisando-o. Outro modo de desintoxicação envolve a quelação dos elementos traço em peptídeos e proteínas

Alguns estudos genéticos e bioquímicos estão relacionados a adicionais transportadores vacuolares na tolerância de elementos traços. Os dois parálogos de Ycf1p, Bpt1p e Vmr1p, desempenham papel inferior na desintoxicação Cd (SHARMA et al., 2002). A falta de Vmr1p provoca ligeira sensibilidade ao Cd.

O sequestro de vários cátions metálicos bivalentes, incluindo Cd e Co, em vacúolos, requer a presença de Zrc1p e Cot1p, que desempenham papéis importantes na homeostase do Zn (MACDIARMID; MILANICK; EIDE, 2002). Ambos os transportadores pertencem à família de facilitadores de difusão do cátion (CDF) (PAULSEN; SAIER, 1997) e compartilham a capacidade de transporte de Zn e Co (CONKLIN et al., 1994). O Zrc1p é também o provável transportador de Cd e Ni. Como estes elementos traços inibem a absorção de Zn, o Zrc1p é dependente em vacúolos (MACDIARMID; MILANICK; EIDE, 2002).

A tolerância a Cd em *S. pombe* envolve o transportador ABC Hmt1, que está localizado na membrana vacuolar (ORTIZ et al., 1992) porque as leveduras de fissão, como as plantas, usam fitoquelatina (PC) para quelar os elementos traço. Os principais substratos para Hmt1 parecem ser complexos de Cd-PC (ORTIZ et al., 1992; WYSOCKI; TAMAS, 2010).

2.10.2 Sequestração com glutathione

Proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína e peptídeos, como glutathione redutase (GSH), metalotioneínas (MT) e fitoquelatinas (PC), são importantes contribuintes para a desintoxicação dos elementos traço. Em *S. cerevisiae* existem dois tipos de MT, Cup1p e Crs5p, os quais diferem estruturalmente e funcionalmente. Cup1p é um polipeptídeo de 53 aminoácidos, que tem limitada homologia para MT em mamíferos e se liga a Cu, Cd e Zn (WINGE et al., 1985). Na ausência de elemento traço, a expressão *Cup1*

é insignificante, mas é fortemente induzida por níveis elevados de Cu (THIELE; HAMER, 1986). A alta expressão de *Cup1* leva a uma melhor tolerância ao Cd e é possível que *Cup1p* também proteja as células contra a toxicidade do Cd (ECKER et al., 1986). *Crs5p* é uma proteína de 69 aminoácidos, rica em cisteína, e mostra alta semelhança com a MT nos outros organismos. Na presença de Cu, Cd e Zn, o *Crs5p* aumenta a sua expressão, além de se ligar a estes elementos. Além disso, a proteína parece ser essencial para a viabilidade da levedura, durante a mistura Cu/Zn em altos níveis (PAGANI et al., 2007; WYSOCKI; TAMAS, 2010).

Os PCs são peptídeos encontrados em todos os eucariontes e em alguns procariontes. São compostos por repetições de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (PC_n ; $n = 2-11$) (Figura 8). Estes peptídeos são sintetizados a partir de GSH pela enzima sintase PC (PCS). O PC constitui uma importante via de desintoxicação de elemento traço em levedura de fissão e plantas, especialmente para Cd e As (CLEMENS, 2006). A síntese de PC é estimulada por uma grande variedade de elementos traço e metaloides, incluindo Cd, Cu, Ag, Hg, Zn e As (HÁ; SMITH; HOWDEN, 1999; WYSOCKI et al., 2003). As PC parecem proteger as células por quelar os elementos traço, reduzindo, assim, a sua reatividade e toxicidade.

2.10.3 Exportação

Pca1p constitui a principal via de exportação Cd em *S. cerevisiae* e desempenha papel crucial na tolerância Cd (ADLE et al., 2007). *Pca1p* pertence à superfamília ATPase tipo P_{1B}, incluindo os transportadores de uma ampla gama de elemento traço, tais como Ag, Cd, Co, Cu, Pb e Zn (KÜHLBRANDT, 2004; WYSOCKI; TAMAS, 2010). A expressão tipo selvagem de *Pca1p* confere tolerância a baixos níveis intracelulares de Cd, estabelecendo esta proteína como a principal via de desintoxicação para este elemento.

Alguns transportadores adicionais de membrana plasmática têm sido implicados na desintoxicação de elemento traço, mas pouco se sabe sobre sua regulamentação ou modo de ação. Yor1p pertence à família do transportador via ligação ATP (ABC) e é estruturalmente relacionada à resistência humana a múltiplas drogas com a proteína Mrp1 e nas leveduras com Ycf1p (DECOTTIGNIES et al., 1998; WYSOCKI; TAMAS, 2010). A supressão de *Yor1* resulta na sensibilidade moderada a Cd e, provavelmente, medeia o efluxo Cd na forma de Cd (GS)₂ (NAGY et al., 2006). Ssu1p é um membro da família de facilitador e está envolvido em efluxo de sulfito (PARK; BAKALINSKY, 2000). A sobre-expressão do gene *Ssu1* leva a um aumento da tolerância de Se (IV) (PINSON; SAGOT; DAIGNAN-FORNIER, 2000), sugerindo que Ssu1p medeia a exportação do Se (IV) (PINSON; SAGOT; DAIGNAN-FORNIER, 2000; WYSOCKI; TAMAS, 2010).

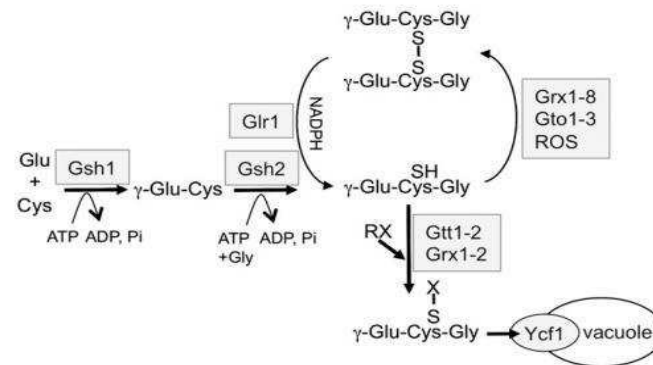


Figura 8 O sistema glutationa. GHS é sintetizado de constituintes de aminoácidos via dependente de ATP. A primeira etapa, catálises de Gsh1 (γ -glutamilcisteína sintetase) na formação de dipeptídeo de γ -Glu-Cys de ácido glutâmico e cisteína. Na segunda etapa, catálise Gsh2 (glutationa sintetase), a ligação de γ -Glu-Cys com glicina. GSH pode ser oxidado a GSSG por ROS ou em reações catalisadas pela Grx1-8 e Gto 1-3. Reduzido GSH é regenerado na reação dependente de NADPH- catalisado pelo Glr1 (glutationa redutase). GHS pode ser conjugado a xenobióticos (RX) por GSTs, incluindo GTT1-2 e Grx1-2. Conjugados de GSH são transportados no vacúolo pela bomba Ycf1 GS-X

Fonte: Modificado de Morano, Grant e Moye-Rowley (2012)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para uma visão mais esclarecedora dos trabalhos realizados durante o período de doutorado, sumarizam-se, a seguir, as principais contribuições de cada uma das fases, fazendo-se a articulação de todo o trabalho ao final.

Seguem as contribuições de maior relevância.

- a) a utilização de leveduras em técnicas de biorremediação tende a ser promissora em solos contaminados com elementos traço. O solo e o lixiviado do solo contaminados podem ser tratados com células de leveduras previamente selecionadas, no intuito de remover ou indisponibilizar os elementos traço, como Cd, Zn e Pb. As células de leveduras inativas pelo calor demonstraram maior teor de remoção, quando comparadas com células vivas, inferindo-se que a viabilidade da célula nem sempre é requerida nestes tratamentos;
- b) a avaliação da toxicidade de Cd, Zn e Pb na célula de *Pichia kudriavzevii* em extrato de solo e tampão demonstrou que a perda da atividade metabólica da levedura acontece após 6 horas. Dentre os elementos testados, o chumbo é o responsável pelo efeito tóxico na célula;
- c) o estresse oxidativo, após 6 horas de contato da levedura *P. kudriavzevii* com os elementos traço Cd, Zn e Pb, parece ser responsável pela interrupção da membrana plasmática. E a produção de ROS acontece quando a levedura está exposta aos elementos traço, causando, provavelmente, a perda da atividade metabólica;
- d) na presença de glicose, os efeitos dos elementos traço nas células de *P. kudriavzevii* são intensificados, aumentando a perda da integridade da membrana e a capacidade de proliferação celular. Uma substância que pode aliviar esse efeito tóxico é a azida sódica,

porém, o cálcio não consegue proteger as células da toxicidade gerada pelo Cd e Pb.

A bioaugmentação com células de *P. kudriavzevii* pode ser promissora em tratamentos com elementos traço no solo, uma vez que, apesar da alta toxicidade gerada pelos elementos traços nas células das leveduras, quando inativas, elas demonstraram alto poder de remoção destes elementos no solo, indisponibilizando-os para plantas e, até mesmo, diminuindo o grau de contaminação do ambiente.

REFERÊNCIAS

ADLE, D. J. et al. A cadmiumtransporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 2, p. 947-955, Jan. 2007.

ADLE, D. J.; LEE, J. Expressional control of a cadmium transporting P1B-type ATPase by a metal sensing degradation signal. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 46, p. 31460-31468, Nov. 2008.

ADOKOH, C. K. et al. Statistical evaluation of environmental contamination, distribution and source assessment of heavy metals (Aluminum, Arsenic, Cadmium, and Mercury) in some lagoons and an estuary along the coastal Belt of Ghana. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 61, n. 2, p. 389-400, May 2011.

ADRIANO, D. C. et al. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. **Geoderma**, Amsterdam, v. 122, n. 2/4, p. 121-142, 2004.

ALLOWAY, B. J. Soil processes and the behaviour of metals. In: _____. **Heavy metals in soils**. Madrid: Springer, 1995. p. 9-37.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 92, n. 12, p. 5258-5265, June 1995.

BARKAY, T.; SCHAEFER, J. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 318-323, 2001.

BAUDOUIIN-CORNU, P.; LABARRE, J. Regulation of the stress response by cadmium as SCF ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1673-1685, Mar. 2006.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Hants, v. 47, n. 3, p. 233-261, May 1996.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2002. 270 p.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 33, p. 20313-20316, Aug. 1997.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, New York, v. 82, n. 8, p. 493-512, Aug. 2008.

BLACKWELL, K. J.; SINGLETON, I.; TOBIN, J. M. Metal cation uptake by yeast: review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 4, p. 579-584, Sept. 1995.

BRADY, N. C. **The nature and properties of soil**. 10th ed. New York: MacMillan, 1990. 201 p.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelecendo diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2014.

BRAVARD, A. et al. Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 26, n. 20, p. 7430-7436, Oct. 2006.

BRENNAN, R. J.; SCHIESTL, R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeasts. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 356, n. 2, p. 171-178, Sept. 1996.

BUOSI, D.; FELFILI, J. M. Recuperação de áreas contaminadas por pesticidas organoclorados na Cidade de Meninos, município de Duque de Caxias, RJ. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 3, p. 465-470, June 2004.

BURHANS, W. C.; WEINBERGER, M. DNA damage and DNA replication stress in yeast models of aging. *Subcell.* **Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 187-206, Oct. 2012.

BUSSCHE, V. J.; SOARES, E. V. Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 90, n. 2, p. 679-687, Apr. 2011.

CHEN, C.; WANG, J. L. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 3, p. 683-687, Mar. 2007.

CHEN, J. et al. Background concentrations of elements in soils of China. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 57/58, p. 699-712, 1991.

CHENG, H.; HU, Y. Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 158, n. 5, p. 1134-1146, May 2010.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1707-1719, Nov. 2006.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.
Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. São Paulo, 2001. 247 p.

CONKLIN, D. S. et al. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 12, n. 9, p. 3678-3688, Sept. 1992.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 22, n. 4/5, p. 217-246, Aug. 2001.

COSTELLO, L. C. et al. Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 46, p. 28875-28881, Nov. 1997.

CROOK, T. **Economic mineralogy**: a practical guide to the study of useful minerals. London: Longmans, 1921. 566 p.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **Journal of Signal Transduction**, New York, v. 2012, p. 1-13, 2012.

DE NICOLA, R.; WALKER, G. M. Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 44, n. 4, p. 210-216, Apr. 2009.

DECOTTIGNIES, A. et al. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 20, p. 12612-12622, May 1998.

ECKER, D. J. et al. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, p. 16895-16900, 1986.

EIDE, D. J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 1532S-1535S, 2003. Supplement.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Elementos-traço e sua relação com qualidade e inocuidade de fertilizantes, corretivos agrícola e resíduos orgânicos no Brasil**. Platina: EMBRAPA Cerrados, 2009. 12 p.

FADIGAS, F. S. et al. Concentrações naturais de metais pesados de metais pesados em algumas classes de solos Brasileiros. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 151-159, 2002.

FALLER, P.; KIENZLER, K.; KRIEGER-LISZKAY, A. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1706, p. 158-164, 2005.

FARAH, M. E.; AMBERG, D. C. Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, San Francisco, v. 18, n. 4, p. 1359-1365, Apr. 2007.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 64, n. 2, p. 1-20, June 2012.

FINN, K.; LOWNDES, N. F.; GRENON, M. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 69, n. 9, p. 1447-1473, May 2011.

FRANCIS, A. J. Biotransformation of uranium and other actinides in radioactive wastes. **Journal of Alloys and Compounds**, Lausanne, v. 3, n. 2, p. 271-273, June 1998.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 11, n. 3, p. 271-279, 2000.

GADD, G. M. Fungi and yeasts for metal accumulation. In: LEHRLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L.; MACGRAW, H. (Ed.). **Microbial mineral recovery**. New York: Ehrlich & Brierley, 1990. p. 249-275.

GADD, G. M. Interaction of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 1, p. 25-60, May 1993.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, Amsterdam, v. 122, n. 2/4, p. 109-119, 2004.

GARDARIN, A. et al. Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 76, n. 4, p. 1034-1048, May 2010.

GASCH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, n. 12, p. 4241-4257, Dec. 2000.

GAST, C. J. van der; WHITELEY, A. S.; THOMPSON, I. P. Temporal dynamics and degradation activity of a bacterial inoculum for treating waste metal-working fluid. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 6, n. 3, p. 254-263, May 2004.

GAVRILESCU, M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, New York, v. 4, n. 3, p. 219-232, 2004.

GENTRY, T. J.; RENSING, C.; PEPPER, I. L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 34, n. 2, p. 447-494, Jan. 2004.

GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E.; THEOCHARIS, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 213, n. 3, p. 282-290, June 2006.

GOKSUNGUR, Y.; UREN, S.; GUVENC, U. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 1, p. 103-109, 2005.

GOMES, D. S. et al. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1573, p. 21-25, 2002.

GOMES, L. H. et al. Cadmium biosorption by immobilized dead yeast cells from bioethanol. **Industries International Journal of Environment Research**, Tehran, v. 5, n. 4, p. 833-836, 2011.

GOYAL, N.; JAIN, S. C.; BANERJEE, U. C. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. **Advances in Environmental Research**, London, v. 7, n. 2, p. 311-319, 2003.

GUELDRY, O. et al. Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 11, p. 2486-2496, June 2003.

GUERINOT, M. L.; EIDE, D. Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 244-249, June 1999.

HA, S. B.; SMITH, A. P.; HOWDEN, R. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 6, p. 1153-1164, June 1999.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 102, n. 10, p. 5-12, Dec. 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford University, 2007. 344 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, London, v. 219, p. 1-14, 1984.

HEGGEN, M. van der et al. Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 88, n. 6, p. 1355-1361, Dec. 2010.

HO, A. van; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Transition metal transport in yeast. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 237-261, 2002.

HOODA, P. S. **Trace elements in soil**. 2nd ed. London: Wiley, 2010. 44 p.

HOUTEN, B. van; WOSHNER, V.; SANTOS, J. H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. **DNA Repair Review**, New York, v. 5, n. 2, p. 145-152, Feb. 2006.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Chemistry and human health division clinical chemistry: "heavy metals", a meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 793-807, Apr. 2002.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 14, n. 16, p. 1511-1527, Dec. 1998.

JAROSŁAWIECKA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Lead resistance in microorganisms. **Microbiology**, New York, v. 160, n. 1, p. 12-25, Jan. 2014.

JIN, Y. H. et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. **Nature Genetics**, New York, v. 3, n. 3, p. 326-329, July 2003.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 331 p.

KALYANI, S.; RAO, P. S.; KRISHNAIAH, A. Removal of nickel(II) from aqueous solutions using marine macroalgae as the sorbing biomass. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 1225-1229, 2004.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 23, n. 3, p. 185-202, Feb. 2006.

KUHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of Ptype ATPases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 282-295, Apr. 2004.

KUREK, E.; CZOBAN, J.; BOLLAG, J. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1011-1015, May 1982.

LAZARIDIS, N. K.; JEKEL, M.; ZOUBOULIS, A. I. Removal of Cr(VI), Mo(VI), and V(V) ions from single metal aqueous solutions by sorption or nanofiltration. **Separation Science and Technology**, New York, v. 38, n. 10, p. 2201-2219, 2003.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms: processes and importance for soil systems. **Earth-Science Reviews**, New York, v. 51, n. 1/4, p. 1-31, Aug. 2000.

LOVLEY, D. R.; COATES, J. D. Bioremediation of metal contamination. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 8, n. 3, p. 285-289, June 1997.

LUSHCHAK, O. V.; LUSHCHAK, V. I. Catalase modifies yeast *Saccharomyces cerevisiae* response towards S-nitrosoglutathione induced stress. **Redox Report**, Philadelphia, v. 13, n. 6, p. 144-152, Dec. 2008.

MACDIARMID, C. W.; MILANICK, M. A.; EIDE, D. J. Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 19, n. 42, p. 2845-2855, Oct. 2002.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, New York, v. 30, n. 2, p. 261-278, 2004.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1994. 406 p.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Austin, v. 190, n. 4, p. 1157-1195, Apr. 2012.

MU, Q. et al. Macrophages decreases atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Journal American Heart Association**, Dallas, v. 79, n. 20, p. 1375-1382, Mar. 2007.

NAGY, Z. et al. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1665-1671, Nov. 2006.

NARGUND, A. M.; AVERY, S. V.; HOUGHTON, J. E. Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis**, New York, v. 13, n. 6, p. 811-821, June 2008.

O'BRIEN, K. M. et al. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutant lacking manganese- (MnSOD) or copper-and zinc- containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 50, p. 51817-51827, Dec. 2004.

OLAYINKA, K. O. Studies on industrial pollution in Nigeria: the effect of textile effluents on the quality of groundwater in some parts of Lagos. **Nigerian Journal of Health Biomedical Sciences**, Grahamstown, v. 3, n. 1, p. 27-30, Apr. 2004.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 143-83, Feb. 2007.

ORTIZ, D. F. et al. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 3491-3499, Oct. 1992.

PAGANI, A. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Crs5 metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 63, n. 1, p. 256-269, Jan. 2007.

PAIS, I.; JONES JUNIOR, J. B. **The handbook of trace elements**. 2nd ed. Boca Raton: Saint Lucie Press, 2000. 223 p.

PARK, H.; BAKALINSKY, A. T. SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 10, p. 881-888, July 2000.

PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 156, n. 2, p. 99-103, Mar. 1997.

PAUMI, C. M. et al. ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 73, n. 4, p. 577-593, Dec. 2009.

PÉREZ, O. C. **Atenuación natural de suelos contaminados com resíduos tóxicos de origen minero: aislamiento y caracterización microbiana: relatório interno de atividades da Faculdade de Biología.** 2. ed. Habana: Universidade de La Habana, 2006. 87 p.

PEREZ, R. R. et al. Evaluation of the role of glutathione in the lead-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, New York, v. 67, n. 3, p. 300-305, Sept. 2013.

PINSON, B.; SAGOT, I.; DAIGNAN-FORNIER, B. Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 36, n. 3, p. 679-687, May 2000.

PREVERAL, S. et al. Metal(loid)s and radionuclides cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1651-1663, Nov. 2006.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e adubação.** 2. ed. Piracicaba: Ceres, 1991. 343 p.

RAMSAY, L. M.; GADD, G. M. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 293-298, June 1997.

REIS, M. A. M.; ALMEIDA, J. S.; ZUNGAILIA, E. J. Biorremediação. In: LIMA, N.; MOTA, M. (Ed.). **Biotecnologia: fundamentos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Lidel, 2003. p. 147-168.

RUFINO, R. D. et al. Application of a yeast biosurfactant in the removal of heavy metals and hydrophobic contaminant in soil used as slurry barrier. **Applied and Environmental Soil Science**, Cairo, v. 2011, p. 1-7, 2011.

SAKAMOTO, F. et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to heavy element stress: lead vs. uranium. **Geomicrobiology Journal**, London, v. 27, n. 3, p. 240-244, Sept. 2010.

SHARMA, K. G. et al. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. **Eukaryot Cell**, Washington, v. 1, n. 3, p. 391-400, June 2002.

SICILIANO, S. D. et al. Changes in microbial community composition and during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 483-489, Jan. 2003.

SIMONS, T. J. B.; POCOCK, G. Lead enters bovine adrenal medullary cells through calcium channels. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 48, p. 383-389, 1987.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 319, n. 2, p. 291-297, June 2004.

SOARES, E. V. et al. Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 6, p. 836-841, Mar. 2002.

SOARES, E. V.; HEBBELINCK, K.; SOARES, H. M. V. M. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, n. 5, p. 336-343, May 2003.

SPROCATI, A. R. et al. Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. **Process Biochemistry**, London, v. 47, n. 11, p. 1649-1655, Nov. 2012.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 18, n. 2, p. 321-336, Feb. 1995.

SUH, J. H.; YUN, J. W.; KIM, D. S. Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 21, n. 5, p. 383-387, Nov. 1999.

TABAK, H. H.; HULLEBUSH, E. van; DEJONGHE, W. Bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides. In: EURO SUMMER SCHOOL CONFERENCE: TRENDS IN REMEDIATION OF SOILS AND SEDIMENTS, 2., 2004, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen: Wageningen University, 2004. p. 356.

TAMAS, M. J. et al. Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. **Topics in Current Genetics**, New York, v. 14, n. 2, p. 395-454, Sept. 2006.

TANDOGAN, B.; NURAY, N. U. Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 31, n. 1/2, p. 230-237, Sept. 2006.

TEIXEIRA, W. et al. **Decifrando a terra**. São Paulo: Oficina de Textos, 2000. 568 p.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 319-326, June 2005.

THIELE, D. J.; HAMER, D. H. Tandemly duplicated upstream control sequences mediate copper-induced transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 6, p. 1158-1163, 1986.

THOMPSON, I. P. et al. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 7, n. 7, p. 909-915, July 2005.

THORSEN, M. et al. Quantitative Transcriptome, proteome and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 30, n. 1, p. 35-43, June 2007.

TOLEDANO, M. B. et al. Oxidative stress responses in yeast. In: HOHMANN, S.; MAGER, P. W. H. (Ed.). **Topics in current genetic: yeast stress responses**. Berlin: Springer-Verlag, 2003. p. 222-234.

TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 231-241, Apr. 2011.

UBEDA, J. F. et al. Bio-prospecting of distillery yeasts as bio-control and bio-remediation agents. **Current Microbiology**, New York, v. 68, n. 5, p. 594-602, May 2014.

VIOLANTE, A. et al. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 10, n. 3, p. 268-292, July 2010.

VIOLANTE, A.; KRISHNAMURTI, G. S. R.; PIGNA, M. Mobility of trace elements in soil environments. In: VIOLANTE, A.; HUANG, P. M.; GADD, G. M. (Ed.). **Biophysico-chemical processes of metals and metalloids in soil environments**. 2nd ed. Hoboken: J. Wiley, 2008. p. 110-131.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 59, n. 2/3, p. 203-216, Feb. 2001.

VOLESKY, B. **Sorption and biosorption**. 2nd ed. Saint Lambert: Quebec, 2004. 326 p.

VOLKAMER, R. et al. Secondary organic aerosol formation from anthropogenic air pollution: rapid and higher than expected. **Geophysical Research Letters**, Washington, v. 33, n. 17, p. 1-4, Sept. 2006.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 5, p. 427-451, Sept./Oct. 2006.

WANG, T. et al. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by NovoGro biostimulation and changes of soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 278, n. 1, p. 438-490, Aug. 2014.

WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 20, n. 3/4, p. 503-516, 1997.

WINGE, D. R. et al. Yeast metallothionein: sequence and metal-binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, p. 14464-14470, 1985.

WYSOCKI, R. et al. Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. **Biochemical and Biophysical Research**, New York, v. 304, n. 2, p. 293-300, May 2003.

WYSOCKI, R.; TAMAS, M. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 34, n. 6, p. 925-951, Nov. 2010.

YOKOZAWA, T. et al. Protective effect of proanthocyanidin against diabetic oxidative stress. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Cairo, v. 34, n. 1, p. 1-11, Sept. 2011.

YUAN, X. F.; TANG, C. C. DNA damage and repair in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells exposed to lead. **Journal of Environmental Science and Health. Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, New York, v. 34, n. 5, p. 1117-1128, Dec. 1999.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 13, p. 2557-2561, Sept. 2007.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 93, n. 6, p. 2454-2458, Mar. 1996.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; LAZARIDIS, N. K. Removal of metal ions from simulated wastewater by *Saccharomyces* yeast biomass: combining biosorption and flotation processes. **Separation Science and Technology**, New York, v. 36, n. 3, p. 349-365, 2001.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Normas do periódico *Environmental Microbiology*

**Artigo em formatação para publicação no periódico:
*Environmental Microbiology***

**Avaliação da persistência de *Pichia kudriavzevii* e o grau de remoção de
elementos traço do solo em microcosmos**

RESUMO

Os microrganismos podem ser utilizados para remediar solos contaminados com elementos traço. A capacidade das estirpes de leveduras de sequestrar os elementos traço tem sido amplamente estudada. Os elementos traço Cd, Zn e Pb, em conjunto, podem causar grandes prejuízos ambientais. Desse modo, o potencial de bioaugmentação de solo contaminado com Cd, Zn e Pb foi avaliado neste trabalho. Para isso, 62 estirpes de leveduras foram testadas quanto à capacidade de crescer em meio quimicamente definido (QD) com Cd, Zn e Pb. Cinco isolados apresentaram crescimento colonial de 1-1,5 cm, quando 200 mg/L de Pb, 1 cm em de 100 mg/L de Cd e de 1 cm para 1.500 mg/L de Zn e, desse modo, foram selecionados para análises seguintes. As cepas selecionadas foram *Schizosaccharomyces pombe* CCMA 0194, *Pichia fermentans* CCMA 0195, *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136, *Issatchenkia terricola* CCMA 0196 e *Candida xylopsoci* CCMA 0197. A biomassa destas leveduras foi testada quanto à capacidade de acumular na célula e remover do extrato de solo os multielementos traço (Cd, Zn e Pb). *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136) conseguiu remover cerca de 88%, 35% e 15% de Cd, Pb e Zn, respectivamente, em pH 7. A interferência das propriedades do solo sobre o processo de descontaminação pela *Pichia kudriavzevii* foi avaliada em microcosmos com a célula da levedura ativa e inativa em um solo estéril ou não estéril. As células inativas demonstraram maior capacidade de adsorver Cd, Pb e Zn, quando comparadas com as células ativas em microcosmos no solo. Os atributos biológicos do solo (Cmic, qCO₂, respiração basal e respiração induzida) comprovaram que as altas concentrações de elementos traço não afetaram a comunidade microbiana do solo. Contudo, as células de *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136) demonstraram alta capacidade de remoção e ou indisponibilidade de Cd, Pb e Zn em extrato de solo e solo, significando um promissor agente biológico sequestrante em solos contaminados ou lixiviados com Cd, Pb e Zn.

Palavras-chave: Leveduras. Microcosmos. Extrato de solo. Elementos traço. Biorremediação.

ABSTRACT

Microorganisms can be used to remediate soils contaminated with trace elements. The ability of yeast strains to abstract trace elements has been widely studied. The trace elements Cd, Zn and Pb, all together can cause significant environmental damage. Thereby, the potential bioaugmentation of soil contaminated with Cd, Zn and Pb were evaluated in this work. For this purpose 62 yeast strains were tested for the ability to grow in chemically defined medium (QD) with Cd, Zn and Pb. Five isolates showed colony growth 1-1.5 cm when 200 mg/L Pb, 1 cm in 100 mg/L Cd and 1 cm to 1500 mg/L of Zn and thereby were selected for these analyzes. The selected strains were *Schizosaccharomyces pombe* (CCMA 0194), *Pichia fermentans* (CCMA 0195), *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136), *Issatchenkia terricola* (CCMA 0196), *Candida xyloposci* (CCMA 0197). The biomass of these strains were tested for the ability to accumulate in the cell and remove the soil extract multi-trace elements (Cd, Zn and Pb). *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136) was able to remove about 88%, 35% and 15% of Cd, Pb and Zn, respectively at pH 7. The interference of soil properties on the decontamination process by *Pichia kudriavzevii* was evaluated in microcosms with cell active and inactive in sterile or non-sterile soil yeast. Inactivated cells demonstrated higher capacity to adsorb Cd, Pb and Zn compared to the active cells in the soil microcosms. The biological soil attributes (Cmic, qCO₂, basal respiration and induced respiration) have proved that high concentrations of trace elements did not affect the soil microbial community. However, the cells of *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136) demonstrated high capacity to remove and/or unavailability of Cd, Pb and Zn in soil extract and soil, meaning a promising sequestering biological agent in contaminated soil or leached with Cd, Pb and Zn.

Keywords: Yeast. Microcosms. Soil extract. Trace elements. Bioremediation.

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes contaminados com quantidades excessivas de elementos traço podem afetar sistemas biológicos pela sua toxicidade (WYSOCKI; TAMÁS, 2010). A capacidade de o elemento traço entrar na cadeia alimentar e a sua alta toxicidade geram um grande risco para a saúde humana e ambiental (BOYD, 2004). Como consequência, novos métodos de tratamentos de ambientes contaminados com elementos traço têm sido empregados, no intuito de remover e imobilizar esses elementos do solo (PŁOCINICZAK et al., 2013).

Um desses métodos de remoção é a biorremediação. Os processos de biorremediação, quando comparados aos métodos convencionais de tratamento de ambientes contaminados, têm boa relação custo-eficiência. O emprego dos microrganismos em processos de biorremediação tem demonstrado grande eficiência (WACKETT; HERSHBERGER, 2001). As espécies de bactérias, tais como *Pseudomonas* e *Bacillus Streptomyces*, são capazes de acumular Cd, Zn e Pb, e, possivelmente, podem ser empregadas em solos contaminados com estes elemento traço. Também espécies de fungos *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccharomyces* e *Fusarium* são relatadas como biosorventes de Pb, Cu, Cd, Zn, demonstrando grande potencial em processos de biorremediação com estes elementos traço (WANG; CHEN, 2009).

O sucesso dos processos de biorremediação no solo contaminado depende, além da capacidade de remoção dos contaminantes pelo microrganismo, das propriedades do poluente, da temperatura, da disponibilidade dos nutrientes, do pH e dos elétrons (HUSSAIN et al., 2009; REID; JONES; SEMPLE, 2000; RÖLING; VERSEVELD, 2002; VIDALI, 2001; VOGEL, 1996).

Apesar do alto potencial dos microrganismos autóctones em eliminar poluentes (atenuação natural), a extensão da biodegradação pode ser apenas residual. Por esta razão, é, por vezes, preferido o bioaumento, que pode ser utilizado em solos contaminados com elementos traço.

Os elementos traço cádmio, zinco e chumbo são relatados como grandes problemas, quando dispostos em altas concentrações no solo. As fontes de contaminação do cádmio podem ser devido à alta empregabilidade deste elemento nas indústrias automobilísticas, em revestimentos metálicos, em pigmentação, em resíduos urbanos e em descargas de indústrias metalúrgicas (GOMES et al., 2011). O chumbo é, normalmente, encontrado em minérios, juntamente com cobre, zinco e prata, e é extraído como um coproduto desses elementos traço (CHENG; HU, 2010). O zinco, presente na forma biológica de íons Zn^{2+} , é um componente essencial de mais de 300 enzimas, porém, grandes quantidades podem ser tóxicas para a célula (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Tóxicos e cancerígenos, o cádmio e o chumbo podem causar grandes problemas ambientais (GOMES et al., 2011).

A resistência a cádmio, chumbo e zinco, de forma associada, já foi citada por Ubeda et al. (2014). Neste trabalho, a levedura não convencional *Pichia kudriavzevii* foi capaz de bioissorver mais de um elemento traço do ambiente, eliminando, aproximadamente, 20% de Pb (II) e 50% de Cd (II).

Na maioria dos casos, a contaminação de uma dada área não está limitada apenas à presença de um metal, sendo, portanto, facilmente encontradas áreas multicontaminadas. Assim, é importante selecionar cepas de leveduras mais resistentes a elementos traço específicos (por exemplo, Cd, Pb e Zn), no intuito de serem utilizadas como agentes biológicos em processo de biorremediação. Este estudo foi realizado com o objetivo de selecionar, *in vitro*, leveduras resistentes a Cd, Zn e Pb. Além disso, buscou-se avaliar a bioissorção

de Cd, Pb e Zn pela levedura resistente a estes multimetais em extrato de solo e avaliar o efeito dos diferentes pHs na remoção destes elementos traço.

2 METODOLOGIA

2.1 Seleção dos isolados sob diferentes concentrações de Cd, Zn e Pb

As leveduras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas Gerais, Brasil), selecionadas de solo do cerrado, cacau, cauim, caxiri e café. Um exemplar de cada espécie presente na CCMA foi utilizado. A fim de selecionar uma levedura resistente, foi testado o crescimento colonial de cada isolado em meio de cultura contendo, separadamente, Cd (5, 100 e 200 mg/L), Zn (5, 1.500 e 3.000 mg/L) e Pb (10, 200 e 300 mg/L). Essas concentrações de elementos traço são referenciadas como valores de prevenção ou, mesmo, de investigação, ou seja, valores acima da referência de qualidade exigida pelo CONAMA (BRASIL, 2009).

Os isolados foram reativados em meio YW (g/L: extrato de levedura 3,0, extrato de malte 3,0, glicose 10,0, e peptona 5,0) mantidos a 28 °C/24 horas. Após esta etapa, 1.000 µl da suspensão de células de cada isolado de levedura foram inoculados em 1.000 µL de água destilada estéril e, após 24 horas, foi padronizado o tamanho do inóculo em 10⁷ cel/mL. Este inóculo foi adicionado em placas contendo meio quimicamente definido (QD) (PAS et al., 2004) (g/L: glicose 0,1, (NH₄)₂SO₄ 0,45, KCl 0,01, NaCl 0,01, MgSO₄.7H₂O 0,05, CaCl₂.2H₂O 0,01, KH₂PO₄ 0,1, H₃BO₃ 0,0005, CuSO₄.5H₂O 0,0002, ZnSO₄.7H₂O 0,001, Na₂MoO₄.2H₂O 0,0002, e KI 0,0001) sendo adicionados, separadamente, Cd (5, 100 e 200 mg/L), Zn (5, 1500 e 3.000 mg/L) e Pb (10, 200 e 300 mg/L). O controle positivo foi realizado em meio YW e QD sem Pb, Zn e Cd. Os isolados de leveduras que apresentaram crescimento nos três elementos traços nas maiores concentrações foram selecionados para o cultivo em extrato de solo e microcosmo.

2.2 Coleta das amostras de solo e obtenção do extrato de solo

As amostras compostas de solo foram coletadas na fazenda experimental da UFLA, cujo solo é caracterizado como Latossolo Vermelho-Amarelo. Cada amostra composta foi formada por 12 subamostras, coletadas na profundidade de 0-30 cm, dentro de um círculo de raio de 3 a 6 m a partir do centro. Antes de coletar as subamostras em cada ponto de amostragem, todo o equipamento foi flambado para evitar a contaminação a partir do ponto anterior. As amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (Nasco ®) e armazenadas a 4 °C, até posterior utilização em até 24 horas.

O extrato de solo líquido foi utilizado como base para o crescimento da levedura previamente selecionada para simular as condições do solo contaminado (LEBEAU et al., 2002). Para a obtenção do extrato foram utilizados solo e água, na proporção de 1:1. Esta mistura foi aquecida a 100 °C, durante 2 horas. Após este período, o extrato foi centrifugado (3.500 x g/10 min) e filtrado em membrana de 10 µm e esterilizado, a 121 °C/ 20 min.

2.3 Caracterização físico-química das amostras de solo e extrato de solo

O solo e o extrato líquido do solo foram analisados física e quimicamente, utilizando-se, aproximadamente, 200 g de cada amostra composta. Após extração com Mehlich-1, o potássio foi determinado por fotometria e fósforo, analisado por espectrofotometria a 660 nm (DEFELIPO; RIBEIRO, 1997). O pH do solo foi medido a partir de 1:2,5 da suspensão solo:água, utilizando-se pHmetro Micronal. Após a extração com KCl 1 M/L, teores de Ca e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica e de Al, por titulação ácido-base (DEFELIPO; RIBEIRO, 1997). O potencial de acidez (H + Al) foi estimado por uma equação com base no pH determinado em

solução de tampão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1997). O cálculo de bases trocáveis (SB) foi realizado pela soma dos teores de Ca, Mg, Na e K. Os elementos traço Fe, Mn, Zn e Cu contidos no solo foram analisados pela extração sequencial, utilizando-se como extratores H₂O, Mehlich 1 e HCl 6 M/L, e determinados por espectrometria de absorção atômica.

2.4 *Screening* de isolados com capacidade de crescimento em extrato de solo contaminado com Cd, Zn e Pb

Frascos de 250 ml foram previamente lavados com HNO₃ a 10% e sequencialmente lavados com água destilada. Dois ml de suspensão de células a 10⁸ UFC/ mL foram adicionados ao extrato de solo, com e sem a adição de Cd, Zn e Pb (concentração final de Cd e Zn de 5 mg/L e Pb de 10 mg/L, 10⁷ UFC/mL). As culturas foram incubadas, durante 17 dias, com agitação de 100 rpm, a 28 °C, utilizando-se o extrato de solo com pH inicial de 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0. As culturas foram centrifugadas a 9.000 x g/10 min. A análise dos elementos traço residuais foi realizada a partir do sobrenadante do centrifugado e no pellet residual por espectroscopia de absorção atômica. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.5 Simulação do ambiente natural em microcosmos

A estirpe de levedura que apresentou maior remoção dos elementos traço testados nos ensaios *in vitro* (itens 2.4) foi inoculada em solo estéril e não estéril em microcosmos. Para os ensaios, potes de vidro foram preenchidos com 200 g de solo com 20% de umidade, ajustada pela adição de água destilada estéril ou solução dos elementos traço. Os ensaios foram mantidos à temperatura

ambiente (± 20 °C), por 336 horas (JEZEQUEL; PERRIN; LEBEAU, 2005). Neste estudo, três concentrações de Cd, Pb e Zn foram utilizadas (sem Cd, Zn e Pb; 1,3 e 3 mg/L de Cd; 300 e 450 mg/L de Zn; e 72 e 180 mg/L de Pb). Estas concentrações são citadas na legislação como de prevenção e de investigação, de acordo com o CONAMA (BRASIL, 2009). Quando requerido, o solo foi esterilizado duas vezes, a 121 °C, por 30 minutos, com intervalo de 24 horas. A umidade do solo foi mantida durante todo o período de ensaio e, para isto, a umidade inicial foi avaliada. Para isso, 10 g de solo úmido foram pesados e acondicionados em estufa, a 105 °C, até peso constante. A umidade foi obtida de acordo com a seguinte equação:

$$U (\%) = [(m_u - m_s) \times 100] / m_s$$

em que m_u é a massa úmida
 m_s é a massa seca

2.5.1 Inoculação da levedura no solo

Os microcosmos nas diferentes condições foram inoculados com levedura, a uma concentração final de 10^7 UFC/mL em solo úmido. A levedura foi pré-cultivada em caldo YW a 28 °C/24 horas, a 150 rpm. Após o período de incubação, a biomassa foi centrifugada (7.000 x g/10 min) e lavada duas vezes com solução etilenodiaminotetracético de ácido acético (EDTA) (Merck), a 30 mmol/L, sequencialmente lavada uma vez com água deionizada e uma vez com tampão MES [2-(N-morfolino) etanosulfônico] pH 6 (Sigma) a 10 mmol/L. A concentração de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A biomassa inativa foi colocada a 48 °C, durante 2 horas, para a morte das células e, posteriormente, colocada nos ensaios de microcosmos. Os potes de solo foram incubados, a 20 °C, mantidos no escuro e a umidade foi controlada

duas vezes por semana, pelo peso inicial e final dos potes. Os ajustes eram realizados caso necessário.

Os experimentos foram realizados em triplicata. No total, 12 ensaios foram realizados com as combinações citadas na Figura 1. As amostragens dos solos dos microcosmos foram realizadas em 0, 96, 168, 264 e 336 horas, totalizando 14 dias para análise microbiana.

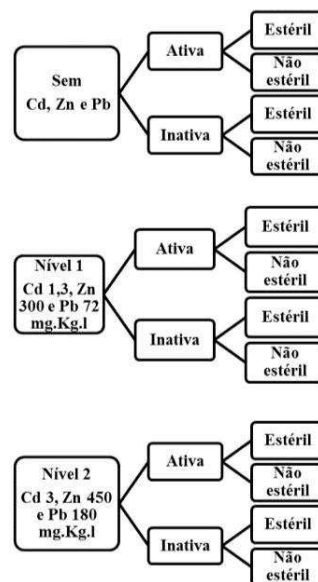


Figura 1 Esquema do experimento realizado em microcosmo, demonstrando a combinação das variáveis testadas, ou seja, concentrações de Cd, Zn e Pb, condição do solo (estéril e não estéril) e estado fisiológico das células (viáveis e não viáveis)

2.6 Avaliação da concentração de Cd, Zn e Pb residual no extrato e solo do microcosmo

As concentrações totais de Cd, Zn e Pb do solo do microcosmo (item 2.5) e extrato de solo (item 2.4) foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (EAA), utilizando Perkin Elmer Analyst 100.

A extração de Cd, Zn e Pb do solo foi realizada por dois métodos, sendo: i) fracionamento na matriz do solo, inferindo sobre a concentração de elementos não disponíveis e ii) digestão ácida, inferindo sobre a concentração de elementos disponíveis no solo.

2.6.1 Extrato de solo

Os sobrenadantes recuperados após a centrifugação das células foram submetidos à digestão nitroperclórica, para a dissolução dos elementos traço presentes no sobrenadante do extrato de solo (ALBARRACIN; AMOROSO; ABATE, 2010) e, posteriormente, avaliados por EAA.

2.6.2 Fracionamento dos elementos traço na matriz do solo

A extração sequencial seletiva de elementos traço do solo foi realizada seguindo Tessier, Campbell e Bisson (1979). Um grama de amostra de solo (peso seco) foi utilizado para a extração dos elementos traço. O solo foi lavado com 8 mL de água destilada, agitado (120 x g/30 min) e centrifugado (3500 x g/20 min). Para análise, foi considerado o pellet; os elementos traço do solo foram extraídos, à temperatura ambiente, durante 1 hora, com 8 mL de uma solução de cloreto de magnésio (1 M MgCl, pH 7) ou uma solução de acetato de sódio (1M NaOAc, pH 8,2), com agitação contínua (120 x g/30 min).

Posteriormente, a solução, junto com o pellet, foi lavada à temperatura ambiente, com 8 mL de 1 M de NaOAc (1M) e ajustado o pH para 5,0, utilizando ácido acético (HOAc) a 25% (v/v). Os tubos foram agitados continuamente (120 x g/5 h.). Após a agitação, foi realizada a extração, utilizando-se 20 mL de NH₂OH-HCl (0,04 M) em 25% (v/v) de HOAc. Este passo foi realizado a 96 °C, durante 6 horas. Posteriormente, 3 mL de HNO₃ (0,02 M) e 5 mL de H₂O₂ a 30% (pH ajustado para 2 com ácido acético) foram adicionados. A mistura foi aquecida a 85 °C, durante 2 horas, com agitação ocasional. Uma alíquota de 3 mL de 30% H₂O₂ (pH 2 com HSO) foi, então, adicionada e, novamente, a solução foi aquecida a 65 °C, durante 3 horas, com agitação intermitente. Após arrefecimento, 5 mL de NH₄OAc (3.2 M) em 25% (v/v) de HNO₃ foi adicionado, diluiu-se a 20 ml e agitou-se continuamente, durante 30 minutos. Finalmente, o resíduo do passo anterior foi digerido com 8 mL de água régia (HCl + HNO₃, 3 + 1, v / v). As análises dos elementos traço foram realizadas utilizando-se espectrofotômetro de absorção atômica (Vario-6, Analytik Jena, Alemanha) e com plasma indutivamente acoplado-espectroscopia de emissão atômica (Thermo Electron Corporation, Modelo IRIS Intrepid II XSP).

2.6.3 Elementos traço prontamente disponíveis

Um grama de solo foi digerido com 10 mL de HNO₃ concentrado em bloco digestor, durante 10 minutos, a 95±5 °C. As amostras foram resfriadas e, após a adição de 5 mL de HNO₃, novamente levadas ao bloco digestor para aquecimento, a 95±5 °C, por 2 horas. Em seguida, foram resfriadas e adicionados 2 mL de água destilada e 3 mL de H₂O₂ a 30%. A seguir, foram novamente conduzidas ao bloco digestor, por mais 2 horas, a 95±5 °C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e receberam 5 mL de HCl e 10 mL de água destilada e foram aquecidas, por 5 minutos, a 95±5 °C. As alíquotas

foram filtradas e armazenadas em recipiente plástico para posterior análise em EAA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 1998).

2.7 Determinação da atividade metabólica microbiana no microcosmo

As análises bioquímicas consistiram na determinação da respiração basal, carbono da biomassa microbiana (C_{mic}), carbono prontamente mineralizável (CPM), quociente metabólico, carbono orgânico total (C_{org}) e relação C_{mic}/C_{org} .

A determinação do carbono da biomassa microbiana foi realizada pelo método da fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). Para isso, amostras de 20 g de solo (peso fresco) foram fumigadas com 25 mL de clorofórmio livre de etanol, sob vácuo de, aproximadamente, 600 mm de Hg, por 2 minutos. Após o início da ebulição no “dessecador úmido”, as amostras permaneceram, durante 24 horas, em contato com o vapor deste fumigante, em local escuro e à temperatura de 27 ± 2 °C. Amostras de 20 g, não fumigadas, também foram deixadas em condições semelhantes às aquelas fumigadas, por 24 horas. Após este período, extraiu-se o carbono orgânico de cada amostra, adicionando-se 50 mL de sulfato de potássio (0,5M) (K_2SO_4), sob agitação, por 30 minutos. O extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman 42. Após este período, o dessecador com os frascos que continham as amostras de solo foi aberto em capela de exaustão e assim permaneceram até a total evaporação do clorofórmio (aproximadamente 40 minutos). Uma alíquota de 8 mL do filtrado, juntamente com 2 mL de $K_2Cr_2O_7$ (66,7 mmol-1), 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , 98%) e 5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 88%), foi aquecida em chapa térmica por refluxo, por 3 minutos, após o surgimento da primeira bolha, quando ocorreu a reação de oxidação do carbono presente nas

amostras de solo. Após o resfriamento da mistura, quantificou-se o $K_2Cr_2O_7$ residual por meio de titulação com sulfato ferroso amoniacal 33,3 mM ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6(H_2O)$) e difenilamina 1%, em meio ácido como indicador. Acrescentou-se um branco com 50 mL de sulfato de potássio 0,5 M (sem o solo).

O carbono da biomassa microbiana foi calculado pelas fórmulas:

$$C \text{ oxidável do solo: } (\mu\text{g C.g}^{-1} \text{ de solo}) = [(Br-A) \times N \times 0,003 \times 50 \times 10^6] \times 8 \times PS$$

sendo Br = volume gasto para titular o branco

A = volume gasto para titular a amostra

N = normalidade exata do sulfato ferroso amoniacal

0,003 = meq do C

50 = volume do extrator

8 = volume da alíquota

PS = peso seco da amostra

10^6 = fator de conversão para $\mu\text{g g C}$

$$\text{Carbono da biomassa microbiana} = (\mu\text{g C.g}^{-1} \text{ de solo})$$

$$C_{mic} = (CF - CNF) \cdot kC$$

Sendo CF = carbono da amostra fumigada

CNF = carbono da amostra não fumigada

kC = 2,78 (fator de correção)

A respiração basal foi determinada de acordo com o método descrito por Alef (1995), por meio da captura e da quantificação do CO_2 liberado no processo de respiração microbiana por um período de incubação de 3 dias. Para isso, pesaram-se 25 g de solo, os quais foram acondicionados em potes plásticos com

capacidade para 1,5 L, juntamente com um frasco de vidro com 25 mL de NaOH 0,05M para capturar o CO₂ liberado. Após o período de incubação de três dias, adicionaram-se 5 ml de solução aquosa de cloreto de bário (BaCl₂ 0,5M) para precipitação do carbonato e titulou-se com HCl, 0,5M, utilizando fenolftaleína (1%) como indicador, conforme metodologia descrita por Isermeyer (1952 citado por ALEF, 1995). A taxa de evolução de CO₂ de cada amostra foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg)} = [(V_b - V_a) \times 1,1 \times 1000] / \text{PSS}$$

em que

V_b = volume do HCl (mL) gasto na titulação do NaOH do controle;

V_a = volume do HCl (mL) gasto na titulação do NaOH da amostra;

1,1 = fator de conversão (1 mL de NaOH 0,05M = 1 mg de CO₂);

PSS = peso seco do solo.

Os resultados foram expressos em mg CO₂g⁻¹ solo h⁻¹.

A partir dos resultados da respiração basal das amostras de solo e do C da biomassa microbiana, foi calculado o quociente metabólico (qCO₂) que representa a quantidade de C-CO₂ evoluída por unidade de C microbiano (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Os resultados foram expressos em µg CO₂ g Cmic⁻¹ h⁻¹.

Para a determinação do carbono prontamente mineralizável foi repetido o procedimento descrito para a respiração basal, porém, com a substituição do solo fumigado pelo não fumigado, durante o período de incubação de 10 dias.

2.8 Análise da microbiota persistente nos microcosmos por DGGE

Nesta análise, 0,25 g de solo de cada ensaio de microcosmos foram transferidos para tubos tipo eppendorf e submetidos à extração de DNA, usando o kit Max Power Solo DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi utilizado como molde para a amplificação do DNA microbiano nas regiões alvo do ribossomo. O par de *primers* NS3fGC/YM951r, da região 18S do rDNA, foi utilizado para a análise da comunidade fúngica. O DNA foi submetido às seguintes condições de amplificação: aquecimento a 95 °C/5 min, seguido por 35 ciclos de 60s a 92 °C, anelamento a 55 °C/60s e extensão a 72 °C/60s, e extensão final de 72 °C/10 min.

A análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada no sistema BioRad Dcode (BioRad). As amostras de DNA amplificadas foram colocadas em um gel 8%, com o gradiente desnaturante de 12-60% de formamida, em uma corrida, por 16 horas, a 70V e a 60 °C. Após o período de corrida, os géis foram corados com Syber Green, por 30 minutos.

2.8.1 Similaridade da comunidade

O perfil de similaridade da comunidade microbiana nos ensaios de microcosmos coletados foi determinado com base na presença ou ausência de bandas detectadas nos perfis gerados no DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o software BioNumerics (versão 1.5, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), para determinar a diversidade dos amplicons com imagens do gel. As semelhanças entre os perfis foram calculadas utilizando-se o coeficiente de Dice e um dendrograma com ligação média (método em grupo não pareado por meio de média aritmética; UPGMA) foi obtido para os perfis de DGGE.

2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de média Scott-knott (5%), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 Seleção dos isolados sob diferentes concentrações de Cd, Pb e Zn

Sessenta e dois isolados de leveduras foram submetidos ao crescimento em meio QD, em placas de Petri contendo, separadamente, Cd (5, 100 e 200 mg/L), Zn (5, 1.500, 3.000 mg/L) e Pb (10, 200 e 300 mg/L). A maioria das estirpes não apresentou crescimento nas maiores concentrações testadas de Pb, Cd e Zn, em 300, 200 e 3.000 mg/L, respectivamente. Cinco isolados, nominalmente *Schizosaccharomyces pombe* (CCMA 0194), *Pichia fermentans* (CCMA 0195), *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136), *Issatchenkia terricola* (CCMA 0196) e *Candida xylopsoci* (CCMA 0197), apresentaram crescimento colonial radial entre 1-1,5 cm, na presença de Pb (200mg/L), 1 cm na concentração de 100 mg/L de Cd e de 1 cm, na presença de 1.500 mg/L de Zn.

3.2 Avaliação do efeito do pH e absorção/adsorção de Cd, Pb e Zn em extrato de solo

O extrato de solo foi utilizado para verificar o efeito do pH na remoção de Cd, Zn e Pb, pelas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* CCMA 0194, *Pichia fermentans* CCMA 0195, *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136, *Issatchenkia terricola* CCMA 0196 e *Candida xylopsoci* CCMA 0197. As leveduras testadas mostraram alta eficiência na remoção destes elementos traço nos diferentes pHs (Figura 2). Foi possível verificar que as leveduras que mais removeram Cd, Zn e Pb do extrato de solo foram *Pichia fermentans* CCMA 0195 e *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136. Na faixa de pH 7 e pH 5, a levedura *P. fermentans* CCMA 0195 removeu mais Zn, quando comparada com a *P. kudriavzevii* CCMA 0136, com, aproximadamente, 20% em pH 7 e 30% em pH 5. Porém, os dados estatísticos demonstraram que a *P. kudriavzevii* CCMA 0136 apresentou

uma maior remoção dos multimetais com, aproximadamente, 88% de Cd, 35% de Pb e 15% de Zn, em pH 7 e 70% de Cd, 40% de Pb e 18% de Zn, em pH 5. Para tanto, *P. kudriavzevii* (CCMA 0136) destacou-se entre as cinco leveduras testadas.

A partir dos ensaios em extrato de solo também foi realizada a avaliação da acumulação de Cd, Pb e Zn nas células das leveduras (Figura 3). As concentrações iniciais dos elementos traço no extrato de solo eram de 5 mg/L de Cd e Zn e 10 mg/L de Pb. Nos ensaios em extrato de solo, juntamente com os multimetais e as células das leveduras, a mesma estirpe *P. kudriavzevii* CCMA 0136 foi capaz de absorver/adsorver maior quantidade com, aproximadamente, 38% de Cd, 48% de Pb e 15% de Zn, dos três elementos em conjunto.

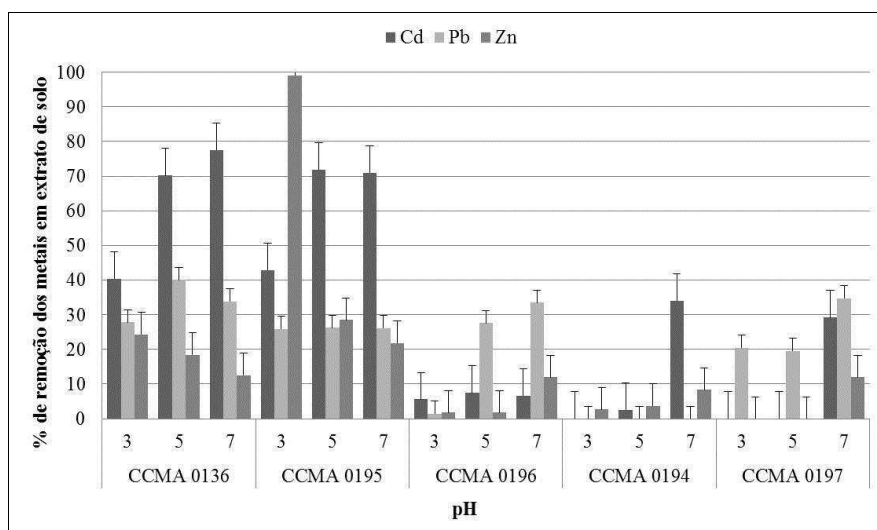


Figura 2 Porcentagem de remoção de Cd, Pb e Zn do substrato com extrato de solo pelas leveduras *S. pombe* CCMA 0194, *P. fermentans* CCMA 0195, *P. kudriavzevii* CCMA 0136, *I. terricola* CCMA 0196, *C. xylopsoci* CCMA 0197 em pH 3,0, 5,0 e 7,0

* Os dados são valores duplicados médios \pm desvio padrão

3.3 Avaliação da *P. kudriavzevii* na matriz do solo contaminado com Cd, Pb e Zn

P. kudriavzevii CCMA 0136 com a célula ativa e inativa foi inoculada no solo e avaliada em microcosmos, juntamente com Cd, Pb e Zn (1,3 e 3 mg/L de Cd; 300 e 450 mg/L de Zn; e 72 e 180 mg/L de Pb), em solo estéril e não estéril (Tabela 1).

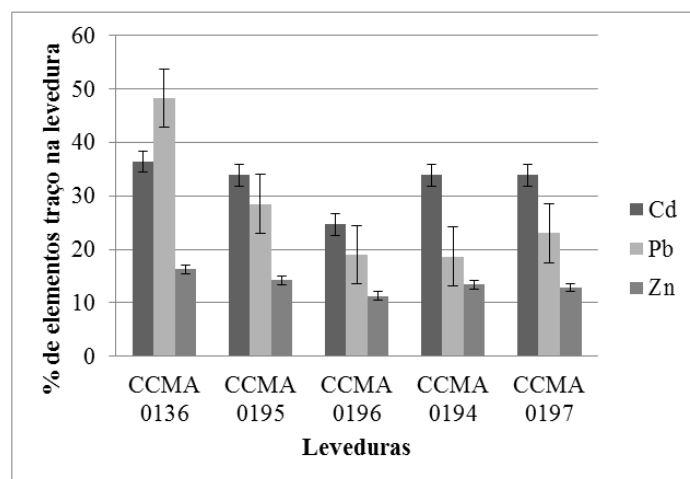


Figura 3 Porcentagem de Cd, Pb e Zn acumulados na biomassa das leveduras crescidas em extrato de solo *S. pombe* CCMA 0194, *P. fermentans* CCMA 0195, *P. kudriavzevii* CCMA 0136, *I. terricola* CCMA 0196, *C. xylopsoci* CCMA 0197

Ao avaliar a quantidade de elementos traço prontamente disponíveis no solo, o zinco foi o mais removido da matriz do solo, chegando a 226 mg/L (Tabela 3). Nas concentrações 1 (300 mg/L) e 2 (450 mg/L), a maior remoção ocorreu em célula inativa, chegando a 226 e 219 mg/L de Zn, respectivamente (Tabela 3c).

A máxima remoção de chumbo do solo foi de, aproximadamente, 62,4 mg/L na concentração 1 (72 mg/L) com célula ativa e 148 mg/L na concentração 2 (180 mg/L) em célula inativa, em solo estéril (Tabela 3b).

Na concentração 1 de Cd (1,3 mg/L), a remoção foi maior em células ativas com 0,94 mg/L de Cd removido e 0,5 mg/L de Cd removido do solo na concentração 2 em célula inativa (Tabela 3a).

Tabela 1 Valores da concentração residual de Cd, Zn e Pb por *P. kudriavzevii* ativa ou inativa em solo estéril ou não estéril, nas concentrações 1,3 e 3 mg/L de Cd, 300 e 450 mg/L de Zn e 72 e 180 mg/L de Pb

a					
Cádmio					
Cd	Quantidade Cd inicial	Ativo		Solo estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativo	Inativo
0	Ausência	0 c A	0 c A	0 c A	0 c A
1	1,3 mg/L	0,69 a B	0,94 a A	0,69 a A	0,51 a B
2	3 mg/L	0,46 b B	0,049 b A	0,46 b B	0,50 b A
		Inativo		Solo não estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativo	Inativo
0	Ausência	0 c A	0 c A	0 c A	0 c A
1	1,3 mg/L	0,51 a B	1,0 a A	0,94 a B	1,0 a A
2	3 mg/L	0,50 b A	0,32 b B	0,049 b B	0,32 b A

b					
Chumbo					
Pb	Quantidade Pb inicial	Ativo		Solo estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativo	Inativo
0	Ausência	0 c A	0 c A	0 c A	0 c A
1	72 mg/L	62,46 b A	61,5 b B	62,46 b A	59,74 b B
2	180 mg/L	126,63 a A	98,17 a B	126,63 a B	148,04 a A
		Inativo		Solo não estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativo	Inativo
0	Ausência	0 c A	0 c A	0 c A	0 c A
1	72 mg/L	59,74 b B	68,57 b A	61,5 b B	68,57 b A
2	180 mg/L	148,04 a B	123,54 a A	98,17 a B	123,54 a A

c					
Zinco					
Zn	Quantidade Zn inicial	Ativo		Solo estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativo	Inativo
0	Ausência	0 c A	0 c A	0 c A	0 c A
1	300 mg/L	137,42 a B	156,12 a A	137,42 a B	226,02 a A
2	450 mg/L	134,22 b A	102,60 b B	134,22 b A	114,88 b B
		Inativo		Solo não estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativo	Inativo
0	Ausência	0 c A	0 c A	0 c A	0 c A
1	300 mg/L	226,03 a B	225,26 a A	156,12 a B	225,26 a A
2	450 mg/L	114,88 b B	219,74 b A	102,60 b B	219,74 b A

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, considerando 5% de significância

3.4 Carbono da biomassa microbiano (Cmic)

Os valores de Cmic produzido no solo dos ensaios em microcosmos foram significativamente menores em solo estéril, quando comparados com os do solo não estéril ($P < 0,05$) (Tabela 4, a). Os valores variaram aproximadamente entre $4-7 \text{ mgCg}^{-1}$ (inativa/estéril) e $60-139 \text{ mgCg}^{-1}$ (ativa/estéril), nas três concentrações de elementos traço utilizadas. Conseqüentemente, no ensaio em que o solo não foi esterilizado, houve maior produção de Cmic, variando, aproximadamente, entre $169-345 \text{ mgCg}^{-1}$ (ativa/não estéril) e $230-890 \text{ mgCg}^{-1}$ (inativa/não estéril).

Dentre as concentrações utilizadas de Cd, Zn e Pb, a que apresentou maior reação e, conseqüentemente, maior produção de Cmic foi a concentração 2 (3 mg/L de Cd, 180 mg/L de Pb e 450 mg/L de Zn). A maior quantidade dos elementos traço acarretou maior produção de Cmic com 139 mgCg^{-1} , em solo estéril e 890 mgCg^{-1} , em solo não estéril.

3.5 Coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$)

Os valores de $q\text{CO}_2$ no solo foram significativamente menores em células inativas e solo estéril ($P < 0,05$) (Tabela 4, d). Em todas as doses de elementos traço, nos diferentes estados da célula e esterilidade do solo, não alcançaram valores menores que $0,003 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ h}^{-1}$.

3.6 Respiração basal (BR) e induzida (SIR)

Os valores significativos estatisticamente para respiração basal e induzida foram de $0,003$ a $0,5 \text{ mgCO}_2 \text{ g}^{-1}$ e de $0,29$ a $6,18 \text{ mgCO}_2 \text{ g}^{-1}$ para respiração induzida do solo, respectivamente ($P < 0,05$) (Tabela 4). Dentre todas

as doses de Cd, Zn e Pb, os valores não ultrapassaram 0,5 mg CO₂^{g⁻¹} para respiração basal (Tabela 4, b). Na respiração induzida (SIR), verificou-se maior respiração, comparada com a respiração basal (Tabela 4, c).

Tabela 4 Atributos biológicos do solo (Cmic, qCO₂, respiração basal e induzida) contaminado com diferentes concentrações de Cd, Zn e PB, utilizando *P. kudriavzevii* ativa ou inativa no tratamento em solo estéril e não estéril

a		Cmic (mgCg⁻¹ solo)			
		Ativas		Solo estéril	
	mg/L	Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	60,61 a B	284,84 a A	60,61 a A	5,75 a A
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	78,78 a A	169,69 a A	78,78 a A	4,24 a A
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	139,39 a B	345,45 a A	139,39 a A	7,57 a A
		Inativas		Solo não estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	5,75 a B	230,30 b A	284,84 a A	230,30 b A
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	4,24 a B	309,09 b A	169,69 a A	309,09 b A
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	7,57 a A	890,90 a B	345,45 a A	890,90 a B
CV: 41,64					

b		Basal (mgCO₂^{g⁻¹})			
		Ativas		Solo estéril	
	mg/L	Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	0,18 a A	0,19 a A	0,18 a A	0,0033 a A
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	0,23 a A	0,4 a A	0,23 a A	0,0066 a A
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	0,23 a A	0,43 a A	0,23 a A	0,0033 a A
		Inativas		Solo não estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	0,0033 a A	0,408 a A	0,19 a A	0,408 a A
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	0,0066 a A	0,272 a A	0,4 a A	0,272 a A
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	0,0033 a B	0,571 a A	0,43 a A	0,571 a A
CV: 115,05					

Tabela 4, conclusão

c **Induzida (mgCO₂ g⁻¹)**

	mg/L	Ativas		Solo estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	6,18 a A	5,28 a A	6,18 a A	0,43 a B
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	4,78 a A	5,14 a A	4,78 a A	0,29 a B
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	0,63 b A	0,844 b A	0,63 b A	0,29 a A
		Inativas		Solo não estéril	
	mg/L	Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	0,43 a B	3,24 a A	5,28 a A	3,24 a B
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	0,29 a B	3,07 a A	5,14 a A	3,07 a B
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	0,29 a A	0,81 b A	0,844 b A	0,81 b A

CV: 39,03

d **(qCo₂ x 10³) (µgC-CO₂ h⁻¹)**

	mg/L	Ativas		Solo estéril	
		Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	3,13 a A	0,59 a B	3,13 a A	0,057 a B
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	3,03 a A	1,33 a A	3,03 a A	0,086 a B
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	1,63 a A	1,93 a A	1,63 a A	0,034 a A
		Inativas		Solo não estéril	
	mg/L	Estéril	Não estéril	Ativas	Inativas
0	Ausência	0,057 a B	2,68 a A	0,59 a A	2,68 a A
1	1.3 Cd; 72 Pb; 300 Zn	0,086 a A	0,97 a A	1,33 a A	0,97 a A
2	3.0 Cd; 180 Pb; 450 Zn	0,034 a A	0,65 a A	1,93 a A	0,65 a A

CV: 100,59

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, considerando 5% de significância

3.6 Avaliação da comunidade fúngica durante os tratamentos em microcosmos

A análise do dendrograma do gel de DGGE para correlação em Dice foi utilizada para comparar a comunidade inicial e final do solo, após a inoculação das células da levedura *P. kudriavzevii* CCMA 0136 no solo, juntamente com os elementos traço Cd, Zn e Pb (Figura 4). Com os perfis dos

fragmentos de DNA no gel de DGGE foi possível verificar que, em todos os ensaios (diferentes concentrações de elementos traço, biomassa ativa ou inativa e esterilidade ou não do solo), considerando os tempos inicial (T1) e final (T5), obtiveram-se 100% de similaridade. Dois grupos distintos foram formados com, aproximadamente, 45% de similaridade. Os perfis do gel oriundo de amostras de solo que continham as maiores concentrações de Cd (3mg/L), Pb (180 mg/L) e Zn (450 mg/L) foram agrupados com, aproximadamente, 65% de similaridade, tendo os ensaios com células inativas apresentado 80% de similaridade. Os perfis sem elementos traço ou na menor concentração (concentração 1) alinharam-se em diferentes posições sem criar um grupo específico e, provavelmente, não influenciam a microbiota indígena.

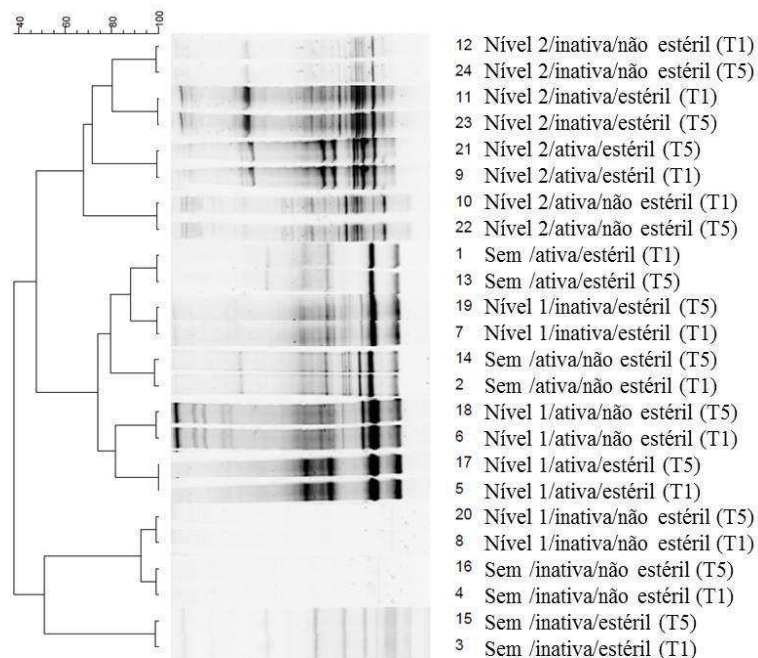


Figura 4 Dendrograma da microbiota fúngica (18S rDNA) presente no solo contaminado com Cd, Zn e Pb. Os níveis de contaminação foram sem Cd, Zn e Pb, nível 1 (Cd 1,3 mg/L, Zn 300 mg/L e Pb 72 mg/L), nível 2 (Cd 3 mg/L, Zn 450 mg/L e Pb 180 mg/L), com biomassa da levedura *P. kudriavzevii* (CCMA 0136) ativa (viável) ou inativa (morta pelo calor), em amostra de solo estéril ou não estéril

*(T1)= tempo inicial

(T5)= tempo final (336 horas)

4 DISCUSSÃO

O estudo das interações entre os elementos traço e leveduras tem sido de interesse científico, no contexto ambiental, no intuito de diminuir ou controlar a poluição (VILLEGAS; AMOROSO; FIGUEROA, 2004), especialmente por elementos traço.

Visando o potencial das leveduras em sobreviver sob condições de estresse com os elementos traço Cd, Pb e Zn, 62 estirpes foram crescidas com estes elementos traço. A tolerância e a bioacumulação a elementos traço, como Cd, Pb e Zn, têm sido relatadas em espécies de *Candida* (LYAS; REHMAN, 2014; REHMAN; SOHAIL; HASNAIN, 2010), *Pichia* (BLAZHENKO, 2014; UBEDA et al., 2014) e *Schizo saccharomyces* (HUANG et al., 2012), o que foi confirmado neste trabalho. Estas espécies de leveduras conseguiram crescer e sobreviver a elevadas concentrações de Cd, Zn e Pb, demonstrando possuir estratégias de adaptação necessária para as funções biológicas (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011). Nas concentrações testadas para Cd, Zn e Pb, as leveduras não conseguiram multiplicar nas maiores concentrações de Cd e Pb, porém, na alta concentração de Zn (1500 mg/L), as estirpes tiveram a capacidade de multiplicação mantida. Este fato pode ser explicado pela possível utilização do Zn para a manutenção do crescimento normal da célula e também no metabolismo (EIDE, 2006). É estimado que mais de 3% das funções do proteoma utilizam o zinco, além de ser essencial como cofator de muitas enzimas (ZHAO; BAI, 2012).

P. kudriavzevii é relatada como uma boa candidata para biocontrole ou biorremediação porque inibe fungos e acumula maior proporção de três elementos traço (Cd, Cr e Pb) (UBEDA et al., 2014). Em processos de biorremediação, outros microrganismos têm sido propostos como tratamento alternativo aos convencionais, pois têm a habilidade de bioacumular Cd, Zn e Pb

(FUJS et al., 2005; HEGGEN et al., 2010; LI; YUAN; HU, 2008; MAHMOUD et al., 2011). Muitas espécies de *Candida* sp. também têm a capacidade de absorver e acumular metais dos ambientes (AMIN; LATIF, 2011).

A maior remoção de Cd e Pb foi apresentada pela levedura *Pichia kudriavzevii* (CCMA 0136) em pH 5 e 7, valores preferíveis, devido à melhor disponibilidade de nutrientes para a planta. Segundo Hoyt e Turner (1975), valores elevados de pH do solo podem acarretar na diminuição da disponibilidade de zinco, cobre, manganês, ferro e boro, causando deficiência nas plantas cultivadas.

Pichia kudriavzevii é capaz de acumular/biosorver mais de um elemento traço. Esta capacidade pode ser devido a uma modificação na parede celular, para melhor se adequar a este estresse causado pelos elementos traço, demonstrando alta capacidade de adsorção ou, até mesmo, a produção de antioxidantes que protegem as células a danos oxidativos (TEMPLE; PERRONE; DAWES, 2005). Isso é confirmado por Ubeda et al. (2014) que comprovaram a capacidade de eliminação de Pb e Cd de 30% e 50%, respectivamente, pela mesma espécie. Neste trabalho demonstrou-se um alto potencial de aplicabilidade da *Pichia kudriavzevii*, uma vez que a remoção destes elementos traço foi maior, tanto em extrato de solo quanto no solo, comparado com o trabalho de Ubeda et al. (2014). Confirma-se, assim, a possível utilidade desta estirpe na biorremediação em solos e lixiviados contaminados com Cd, Pb e Zn.

A utilização de células vivas ou mortas na remoção de elementos traços está em discussão, já que a biomassa viva pode ter grande capacidade de acumulação de elementos traço. Isso ocorre devido ao transporte desses elementos para dentro da célula através da membrana celular (VOLESKY; MAY; HOLAN, 1993). Por outro lado, a biomassa inativa tem facilidade de armazenamento, insensibilidade à toxicidade do elemento traço e a não

necessidade de nutrientes (VOLESKY, 1990). No intuito de verificar se existe diferença entre célula viva e morta em estudos com solo, as duas possibilidades foram empregadas em microcosmos. Quando se compara a capacidade de remoção de Cd e Pb do solo com células metabolicamente ativas, as células inativas foram mais promissoras, pois removeram mais Cd e Pb do solo.

Resultados semelhantes foram verificados por Gomes et al. (2011), Volesky e May-Phillips (1995) e Zhang et al. (2009), em que as leveduras inativas apresentaram maior capacidade de adsorção de elementos traço que as metabolicamente ativas. Na presença de Cd, Pb e Zn, *P. kudriavzevii* demonstrou perda da atividade metabólica e capacidade de proliferação em, aproximadamente, 24 horas (dados não mostrados). Uma grande variedade de potenciais sítios para a complexação de elementos traço, como grupos carboxilato, fosfato, sulfidril e amino, pode estar presente nas paredes das células das leveduras (ZOUBOULIS; MATIS; LAZARIDIS, 2001), explicando a eficiência na adsorção de Cd e Pb pelas células inativas.

A qualidade do solo está relacionada à atividade microbiana, ou seja, a reações biológicas e bioquímicas catalisadas pelos microrganismos. Devido a essas características, os microrganismos do solo são considerados indicadores sensíveis para avaliar o impacto antropogênico sobre os processos biológicos do solo (TURCO; KENNEDY; JAWSON, 1994). A fim de verificar a importância da comunidade microbiana na acumulação de elementos traço, o solo não estéril também foi utilizado. Este estudo mostrou que a microbiota nativa do solo não teve ação direta na remoção de elevadas concentrações de elementos traço, pois as maiores remoções ocorreram em solo estéril, reforçando a ação biorremediadora da levedura testada. As altas concentrações de elementos traço testados podem ter sido tóxicas para a microbiota nativa do solo, podendo causar estresse oxidativo, inibição da função das enzimas e perturbação nas funções das proteínas, gerando a morte celular (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

A remoção de elementos traço por leveduras é afetada por várias propriedades físicas da solução, ou seja, o pH, o potencial redox (Eh), a concentração de íons metálicos e agentes complexantes (orgânicos e inorgânicos) e a afinidade destes agentes de íons de elemento traço (SOARES; SOARES, 2012). A biomassa microbiana do solo, com sua atividade avaliada pela evolução de CO₂, também tem sido utilizada como indicativo da condição ambiental (DE-POLLI; GUERRA, 1997). Valores inferiores de carbono microbiano (Cmic) em solo estéril foram detectados, pois, uma vez que o Cmic está correlacionado com a respiração, houve a diminuição da microbiota do solo como consequência da esterilização e, portanto, uma diminuição da respiração e do Cmic.

Em solos não contaminados com esses elementos, valores abaixo de 100 µg Cg⁻¹ são, geralmente, observados, enquanto, em solo contaminado, os valores de Cmic podem ser de até 1.000 µg Cg⁻¹ de solo (LI et al., 2009). Segundo Leita et al. (1995), a atividade microbiana avaliada por meio da produção de CO₂ pode ser maior em solos contaminados, como consequência do maior consumo de energia dos microrganismos para garantir a sua sobrevivência. Este fato foi verificado neste trabalho: quanto maior a quantidade de elementos traço no solo, maior a respiração e, conseqüentemente, maior Cmic liberado pelos microrganismos.

Segundo Brookes (1995), o qCO_2 pode ser interpretado como "eficiência microbiana". Trata-se da avaliação da energia necessária para a manutenção da atividade metabólica em relação à energia utilizada para síntese de biomassa, ocorrendo, em muitos casos, maior consumo de energia em estados de estresse. Portanto, os resultados obtidos para o qCO_2 indicaram que a aplicação de Cd, Zn e Pb não causou efeito adverso à comunidade microbiana e que ela manteve sua eficiência devido aos baixos valores verificados de qCO_2 . Resultados análogos foram verificados por Banerjee, Burton e Depoe (1997) em solo contaminado

com lodo com altos teores de elementos traço, juntamente microbiota natural do solo.

A contaminação do solo com elemento traço pode também resultar em diminuição da diversidade genética e alteração da estrutura das comunidades microbianas (GANS; WOLINSKY; DUNBAR, 2005). Isso não foi comprovado neste trabalho, pois a população vista nos perfis de DGGE se manteve na fase inicial e final de todos os ensaios em microcosmos contaminado com Cd, Pb e Zn. Burges, Epelde e Garbisu (2015) verificaram alta sensibilidade genética fúngica em ensaios repetidos com solos contaminados com multimetals, demonstrando a capacidade da comunidade em permanecer ou modificar ao longo de ensaios repetidos com multimetals.

Conclui-se que *P. kudriavzevii* CCMA 0136 demonstrou alta capacidade de remoção e acumulação de Cd, Pb e Zn em extrato de solo e em solo. Em solos contaminados com Cd, Zn e Pb, *P. kudriavzevii* CCMA 0136 inativa tem maior capacidade de remover estes elementos traço do solo que as células ativas em altas concentrações, tornando-os indisponíveis. A microbiota nativa do solo não interferiu na remoção de Cd, Zn e Pb do solo contaminado. Nos perfis gerados pelo DGGE não foi possível verificar interferência dos metais na microbiota indígena. A comunidade microbiana inicial e final verificada no DGGE nos ensaios em microcosmos do solo contaminado não modificou ao longo do tempo. A *P. kudriavzevii* (CCMA 0136) demonstrou alto potencial biotecnológico como remediadora de solo contaminado com multimetals (Cd, Zn e Pb).

REFERÊNCIAS

- ALBARRACÍN, V. H.; AMOROSO, M. J.; ABATE, C. M. Bioaugmentation of copper polluted soil microcosms with *Amycolatopsis tucumanensis* to diminish phytoavailable copper for *Zea mays* plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 131-137, Mar. 2010.
- ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 2nd ed. New York: Academic, 1995. p. 464-470.
- AMIN, A.; LATIF, Z. Isolation and characterization of H₂S producing yeast to detoxify mercury containing compounds. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 2, n. 1, p. 517-525, Dec. 2011.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO₂(qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such pH, on the microbial biomass of forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 25, n. 3, p. 393-395, Mar. 1993.
- BANERJEE, M. R.; BURTON, D. L.; DEPOE, S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. **Agriculture, Ecosystems & Environmet**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 241-249, Dec. 1997.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2002. 270 p.
- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, New York, v. 82, n. 8, p. 493-512, Aug. 2008.
- BLAZHENKO, O. V. Glutathione deficiency leads to riboflavin oversynthesis in the yeast *Pichia guilliermondii*. **Current Microbiology**, New York, v. 69, n. 1, p. 10-18, July 2014.
- BOYD, R. S. Ecology of metal hyperaccumulation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 162, n. 3, p. 563-567, May 2004.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelecendo diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2014.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, n. 4, p. 269-279, Dec. 1995.

BURGES, A.; EPELDE, L.; GARBISU, C. Impact of repeated single-metal and multi-metal pollution events on soil quality. **Chemosphere**, Oxford, v. 120, n. 1, p. 8-15, Feb. 2015.

CHENG, H.; HU, Y. Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 158, n. 5, p. 1134-1146, May 2010.

DEFELIPO, B. V.; RIBEIRO, A. C. **Análise química do solo: metodologia**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1997. 26 p.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 10 p.

EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1763, p. 711-722, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Dec. 2011.

FUJS, S. et al. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 45, n. 2, p. 125-135, Apr. 2005.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, New York, v. 309, n. 5739, p. 1387-1390, Aug. 2005.

GOMES, L. H. et al. Cadmium biosorption by immobilized dead yeast cells from bioethanol. **Industries International Journal Environment Research**, Tehran, v. 5, n. 4, p. 833-836, 2011.

HEGGEN, V. M. et al. Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 88, n. 6, p. 1355-1361, Dec. 2010.

HOYT, P. B.; TURNER, R. C. Effect of organic materials added to very acid soils on pH, aluminum, exchangeable NH₄, and crop yields. **Soil Science**, Madison, v. 119, p. 227-237, 1975.

HUANG, J. et al. Yeast HMT1 reduces seed through cadmium dependent phytochelatin vacuolar sequestration in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 158, n. 4, p. 1779-1788, Apr. 2012.

HUSSAIN, S. et al. **Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions**. Donald: Advances in Agronomy, 2009. 45 p.

ILYAS, S.; REHMAN, A. Oxidative stress, glutathione level and antioxidant response to heavy metals in multi-resistant pathogen, *Candida tropicalis*. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 1, p. 4115-4138, Jan. 2014.

JÉZÉQUEL, K.; PERRIN, J.; LEBEAU, T. Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 1323-1331, June 2005.

LEBEAU, T. et al. Cadmium biosorption by free and immobilized microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 291, n. 1/3, p. 73-83, May 2002.

LEITA, L. et al. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass during laboratory incubation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, n. 2/3, p. 103-108, 1995.

LI, Y. T. et al. Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic C, N and P turnover influenced by acid metal stress. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 41, n. 5, p. 969-977, May 2009.

LI, Z.; YUAN, H.; HU, X. D. Cadmium-resistance in growing *Rhodotorula* sp. Y11. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 5, p. 1339-1344, Mar. 2008.

MAHMOUD, M. E. et al. Enhanced biosorptive removal of cadmium from aqueous solutions by silicon dioxide nano-powder, heat inactivated and immobilized *Aspergillus ustus*. **Desalination**, Amsterdam, v. 279, n. 1/3, p. 291-297, Sept. 2011.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiology Research**, Rosemead, v. 165, n. 5, p. 363-375, July 2010.

PŁOCINICZAK, T. et al. The effect of soil bioaugmentation with strains of *Pseudomonas* on Cd, Zn and Cu uptake by *Sinapis alba* L. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, n. 9, p. 1332-1337, May 2013.

REHMAN, A.; SOHAIL, A. M.; HASNAIN, S. J. Cadmium biosorption by yeast, *Candida tropicalis* CBL-1, isolated from industrial wastewater. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 56, n. 5, p. 359-368, Oct. 2010.

REID, B. J.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental Pollution**, Barking, v. 108, n. 1, p. 103-112, Apr. 2000.

RÖLING, W. F. M.; VERSEVELD, H. W. van. Natural attenuation: what does the subsurface have in store? **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 53-64, Dec. 2002.

SOARES, E. V.; SOARES, H. V. M. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as green technology: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 19, n. 4, p. 1066-1083, May 2012.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 319-326, June 2005.

TESSIER, A. P.; CAMPBELL, G. C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, New York, v. 51, p. 844-851, 1979.

TURCO, F. R.; KENNEDY, A. C.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 73-90. (Special Publication, 35).

TYAGI, M.; FONSECA, M. M.R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 1, p. 231-241, Aug. 2011.

UBEDA, J. F. et al. Bio-prospecting of distillery yeasts as bio-control and bioremediation agents. **Current Microbiology**, New York, v. 68, n. 5, p. 594-602, May 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3050 B**. Washington, 1998. Disponível em: <<http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/3050b.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, Aug. 2001.

VILLEGAS, L.; AMOROSO, M. J.; FIGUEROA, L. I. C. de. Selection of tolerant heavy metal yeasts from different polluted sites. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 249-256, June 2004.

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 7, n. 3, p. 311-316, June 1996.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. In: _____. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 3-5.

VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z. R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 41, n. 8, p. 826-829, Apr. 1993.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 797-806, Jan. 1995.

WACKETT, L. P.; HERSHBERGER, C. D. **Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds**. Washington: ASM, 2001. 10 p.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 195-226, Mar./Apr. 2009.

WYSOCKI, R.; TAMAS, M. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 34, n. 6, p. 925-951, Nov. 2010.

ZHANG, Y. et al. Biosorption of Pb²⁺ by *Saccharomyces cerevisiae* in static and dynamic adsorption tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 83, n. 5, p. 708-712, Aug. 2009.

ZHAO, X.; BAI, F. Zinc and yeast stress tolerance: micronutrient plays a big role. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 176-183, Apr. 2012.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; LAZARIDIS, N. K. Removal of metal ions from simulated wastewater by *Saccharomyces* yeast biomass: combining biosorption and flotation processes. **Separation Science and Technology**, New York, v. 36, n. 3, p. 349-365, 2001.

ARTIGO 2

Normas do periódico *Environmental Science and Pollution Research*

Artigo publicado no periódico indexado:

Environmental Science and Pollution Research (2015)

DOI 10.1007/s11356-015-4326-9

**Impact of multi-metals (Cd, Pb and Zn) exposure on the physiology of the
yeast *Pichia kudriavzevii***

RESUMO

A contaminação metálica do ambiente é frequentemente associada com a presença de dois ou mais metais. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o impacto de uma mistura de metais (Cd, Pb e Zn) sobre a fisiologia da levedura não convencional *Pichia kudriavzevii*. As células incubadas com 5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb e 5 mg/l Zn, durante 6 horas, induziram a perda da atividade metabólica (avaliada por coloração FUN-1) e a capacidade de proliferação (avaliada por um ensaio clonogénico), com uma pequena perda de integridade da membrana (medida pelo ensaio de exclusão de azul de tripano). A coloração das células de levedura com branco calcoflúor revelou que nenhuma modificação do padrão de deposição de quitina ocorreu durante a exposição à mistura de metais. Estendendo-se por 24 horas a exposição das células de levedura à mistura de metal, provocou-se uma perda da integridade da membrana, que foi acompanhada pelo vazamento de componentes intracelulares. Foram também observadas acentuada perda da atividade metabólica e perda da capacidade de proliferação. A análise do impacto de um único metal demonstrou que, sob as condições estudadas, o metal Pb foi responsável pelo efeito tóxico observado na mistura de metal.

Palavras-chave: células mortas, metais pesados, integridade da membrana, inibição da atividade metabólica, toxicidade de metais, sobrevivência de levedura.

ABSTRACT

Metal contamination of the environment is frequently associated to the presence of two or more metals. This work aimed to study the impact of a mixture of metals (Cd, Pb and Zn) on the physiology of the nonconventional yeast *Pichia kudriavzevii*. The incubation of yeast cells with 5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb and 5 mg/l Zn, for 6 h, induced a loss of metabolic activity (assessed by FUN-1 staining) and proliferation capacity (evaluated by a clonogenic assay), with a small loss of membrane integrity (measured by trypan blue exclusion assay). The staining of yeast cells with calcofluor white revealed that no modification of chitin deposition pattern occurred during the exposure to metals mixture. Extending for 24 h the exposure of yeast cells to metal mixture, provoked a loss of membrane integrity, which was accompanied by the leakage of intracellular components. A marked loss of metabolic activity and loss of proliferation capacity was also observed. The analysis of the impact of single metal showed that, under the conditions studied, Pb was the metal responsible for the toxic effect observed in the metal mixture.

Keywords: cell dead; heavy metals; membrane integrity; metabolic activity inhibition; metals toxicity; yeast survival

1 Introduction

Heavy metal pollution is a worldwide problem mainly due the toxic effects of the metals on the biological systems. On the contrary of organic pollutants, metals are not degraded or destroyed over the time. In addition, they can be accumulated through the food chain originating serious ecological and health problems.

Cadmium is found in nature as ores, associated with other elements such as zinc, lead and copper. Cadmium is primarily used in batteries (silver-cadmium and nickel-cadmium), painting pigments, electroplating and stabilizers of plastics (ATSDR 2012; Naja and Volesky 2010). Cadmium can be found in air, water or soil due to non-ferrous metal mining and refining activities, or due to the production and use of phosphate fertilizers; the combustion of fossil fuel as well as waste incinerations contributes to the release of cadmium in the environment (ATSDR 2012). Cd is considered to be of major concern for human health according to World Health Organization and is classified as human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (Nair et al. 2013). Although the mechanisms of Cd toxicity are not completely elucidated, it is believed that the major effects include oxidative stress, which might result in the damage of different organs such as kidney, liver and lungs (Nair et al. 2013). In yeast cells, the intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS) originate oxidative damage, such as lipid peroxidation (Howlett and Avery 1997) and DNA damage (Avery 2001) and cell dead by apoptosis (Nargund et al. 2008). Cd induce endoplasmic reticulum stress (ER) as consequence of Cd accumulation in the ER (Gardarin et al. 2010). It was also described that high concentration of Cd induce a sudden boost in cytosolic Ca, which can initiate defence responses and increase Cd tolerance (Ruta et al. 2014).

Although lead occurs naturally, the high levels that can be found in the environment come mainly from human activities. In fact, lead compounds and

lead alloys have many applications and can be found, for example, in pipes and storage batteries in cars or in pigments in paints, dyes and ceramic glazes (ATSDR 2007; Naja and Volesky 2010). Lead found in soils arises from lead that falls to the ground from air (in the countries where lead is used in gasoline), or due to chipping of lead-based paint from houses and bridges, or from pesticides (ATSDR 2007; Rossi 2008). Like Cd, Pb is a non-essential element since has no known biological roles. Pb is classified as priority pollutant by the US Environmental Protection Agency (US-EPA 2006) and can cause, in humans, blood and brain disorders (ATSDR 2007). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Pb inhibit assimilation of nutrients (Chen and Wang 2007) and metabolic activity (Van der Heggen et al. 2010), decrease the intracellular level of reduced glutathione (Perez et al. 2013), induce oxidative stress (Bussche and Soares 2011; Sousa and Soares 2014), DNA damage (Cui and Tang 2000; Yu et al. 2009; Yuan and Tang 1999), loss of proliferation capacity (Soares et al. 2003; Suh et al. 1999) and cell dead displaying phenotypic markers of apoptosis (Bussche and Soares 2011).

Zinc is one of the most widespread elements in the Earth's crust. It is an essential element, being required in small amounts for normal cell growth. Zn has been associated at least 300 enzymatic reactions, as co-factor. Consequently, this element plays an important role in a multitude of physiological processes. Examples of zinc proteins are: metalloproteases, carboxypeptidases and zinc finger proteins, which include DNA or RNA binding proteins (Bleackley and MacGillivray 2011). Zinc has also been shown to act as signalling molecule as Ca (Yamasaki et al. 2007). The uptake of Zn in *S. cerevisiae* is mainly mediated by two Zn transporters: Zrt1p, a high affinity transported, active in Zn deficient cells (Zhao and Eide 1996a) and Zrt2p, a low affinity transported, active in Zn replete cells (Zhao and Eide 1996b). In the presence of high Zn concentration, Zrt1p is removed from the cell surface to prevent the uptake of excess Zn (Gitan

et al. 2003). In the presence of high levels of zinc, yeast cells store excess zinc in the vacuole in order to meet metabolic need, in case of zinc deficiency, and prevent zinc toxicity (Cyert and Philpott 2013). Zrc1p and Cot1p, located in vacuole membrane, are the transporters involved in Zn vacuole storage (MacDiarmid et al. 2000). When in excess, Zn affects membrane integrity and induces the release of K^+ (Mowll and Gadd 1983). Zinc is commonly used to prevent the corrosion of other metals (such as iron), in a process called galvanization, or combined with other metals to form alloys such as brass (copper and zinc). Zinc, combined with other elements, has many applications such as to make paints, wood preserving or in drug industry as sun blocks or deodorants. Zinc can enter the environment through air, water and soil as a consequence of both natural processes and human activities. The levels of zinc in soils increase due to the disposal of zinc wastes from metal manufacturing industries, coal ash from electric utilities as well as from fertilizers (ATSDR 2005).

Yeast cells have been proposed, as alternative to conventional techniques, for the bioremediation of heavy metals (Soares and Soares 2012). This type of biomass has the ability to remove a wide range of metals and can be obtained at low cost as by-product of fermentation industry (Soares and Soares 2013; Wang and Chen 2009). Recently, it was described that the yeast *Pichia kudriavzevii* (previously named as *Issatchenkia orientalis*), seems to be a new alternative for heavy metals bioremediation due to the higher metal removal capacity (Ubeda et al. 2014).

Heavy metals removal by yeast cells can be carried out by two main mechanisms: a passive process, called biosorption and a metabolism-dependent process, known as bioaccumulation. The last process only occurs in metabolic active (live) cells and is attributed to the passage of the metals through the cell membrane (Soares and Soares 2012). Bioaccumulation could be desirable for

heavy metal removal (Mapolelo and Torto 2004). However, metals toxicity can affect the efficiency of metal removal by live biomass.

In most cases, the contamination of a given area is not limited to the presence of only one metal but, in a general way, occurs due to the presence of two or more metals. Thus, it is important to know not only the behaviour of individual heavy metals (e.g., Cd, Pb and Zn), but also possible interactions between them. In the present work, the toxic impact caused by multi-metals (Cd, Zn and Pb) on the non-conventional yeast *P. kudriavzevii* will be evaluated and discussed. Additionally, the toxic impact of single metal was also evaluated. As far as we know, this is the first time that the toxic impact of metals is evaluated in *P. kudriavzevii* yeast cells.

2 Material and Methods

2.1 Yeast, media and growth conditions

A strain of *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 (former name UFLA CHY 18.4) was used. This strain was previously selected for the ability to grow and it bioaccumulate high amounts of mixed metals Cd, Pb and Zn (data not shown). CCMA 0136 was used in this work. The strain was isolated from cocoa beans from Brazil as previously described (Pereira et al. 2012). The gene sequence has been deposited in GenBank under the accession number KJ468031.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ468031>) and belong to collection of cultures of Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras (Minas Gerais, Brazil) (CCMA).

The strain was maintained at 4 °C on YPD agar slants [10 g/l yeast extract (Difco-BD), 20 g/l peptone (Difco-BD), 20 g/l dextrose (Merck) and 20 g/l agar (Merck)].

Pre-cultures were prepared in 10 ml of YPD broth in 100-ml Erlenmeyer flasks. Cells were incubated at 25 °C on an orbital shaker at 150 rpm for 8–10 h.

Cultures in the exponential growth phase were obtained by inoculating 40 or 100 ml of YPD broth in 100 or 250-ml Erlenmeyer flasks, respectively, with pre-cultures and then grown overnight ($OD_{600} \sim 0.5$) under the same conditions as the pre-culture.

2.2 Preparation of soil extract

Soil was suspended in water (1 kg/l) and heated at 100 °C for 2 h. Subsequently, the suspension was centrifuged, filtered through paper filter and then through a 0.45 µm pore-size filter.

2.3 Exposure of yeast cells to metal stress

Cells in the exponential growth phase were harvested by centrifugation (2,500xg, 5 min), washed twice and re-suspended in deionised water at $\sim 1 \times 10^8$ cells/ml. Cells were suspended in soil extract or in 10 mmol/l [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] MES pH buffer (Sigma-Aldrich), pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml. Unless stated otherwise, individual metals or a mixture of metals were added at a final concentration: cadmium, 5 mg/l; lead, 10 mg/l; zinc, 5 mg/l. Cells suspensions were shaken in 100-ml Erlenmeyer flasks at 150 rpm at 25 °C. The following stock standard solutions (Merck) were used: 1000 mg/l $CdCl_2$; 2000 mg/l ($Pb(NO_3)_2$); 2000 mg/l $Zn Cl_2$.

Cell concentration was determined spectrophotometrically at 600 nm after appropriate dilution of the samples. A calibration curve (absorbance versus number of cells) was previously made.

2.4 Measurement of cell proliferation capacity by colony-forming units (CFU) count

Samples were taken (two replicates) at different intervals of time, serially diluted with sterile deionised water and plated on YPD agar (two

replicates of the convenient dilutions). The colonies were counted after 1–2 days of incubation at 25 °C. The viability (CFU %) was calculated using the number of CFU/ml at zero time as reference (100 %).

2.5 Leakage of UV₂₆₀-absorbing compounds

For the measurement of the leakage of cell content (UV₂₆₀-absorbing materials), cell suspensions were centrifuged (2,500xg, 10 min), the supernatants were carefully removed and the optical density at 260 nm determined using a quartz cuvette. Buffer solutions with the same metal concentrations were used as blank.

2.6 Microscopy

Membrane integrity was evaluated by staining yeast cells with trypan blue (TB). Cells were washed twice with deionised water and suspended in 10 mmol/l MES buffer, pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml. Yeast suspensions were incubated with TB solution (Aldrich), at final concentration of 0.2 % (w/v), at room temperature, for 20 min. Cells were analysed by light microscopy. For each sample, at least three replicates of 200 cells (>600 cells) were scored in randomly selected fields. Unstained cells were scored as retain plasma membrane integrity (trypan blue negative cells), whereas cells with disrupted membrane appeared blue (trypan blue positive cells).

Metabolic activity was assessed using the probe [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide] FUN-1. Thus, cells were washed with deionised water and then with 10 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) (Sigma-Aldrich), pH 7.2, containing 2 % (w/v) glucose and resuspended in the same buffer at 1×10^7 cells/ml. Subsequently, cells were stained with FUN-1 (Molecular Probes, Invitrogen) as previously described (Van der Heggen et al.

2010). Cells were examined using an epifluorescence microscope equipped with a HBO-100 mercury lamp and a filter set I3 (excitation filter BP 450- 490, dichromatic mirror 510 and suppression filter LP 515) from Leica. For each sample, at least 600 cells were scored in randomly selected microscope fields.

Yeast cell wall was staining using calcofluor white M2R. Therefore, cells were washed twice and resuspended in deionised water. Calcofluor white M2R (Sigma) was added at a final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ and the cells were incubated in the dark at room temperature for 30 min. After staining, cells were washed twice, resuspended in deionised water and examined using an epifluorescence microscope equipped with a filter set A (excitation filter BP 340–380, dichromatic mirror 400 and suppression filter LP 425), from Leica.

All images were acquired with a Leica DC 300F camera, using a N plan $\times 100$ objective, and were processed using Leica IM 50-Image manager software.

2.7 Reproducibility of the results

All experiments were repeated, independently, three to eight times. The data reported are the mean \pm standard deviation (SD), presented with 95% confidence.

3 Results

3.1 Multiple metals disturbs membrane integrity in a time-dependent manner

The effect of the simultaneous presence of Cd, Pb and Zn on the membrane integrity of the yeast *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 was evaluated by two methodologies: dye-exclusion assay with trypan blue (TB) and assessment of the leakage of UV₂₆₀-absorbing materials.

When exposed for 3 h to the action of metals mixture, the majority (>97 %) of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 yeast cells were able to excluded TB, and thus remained unstained (TB negative cells), which suggest that membrane

integrity was not affected. Yeast cell population exposed to metal mixture for 6 h, displayed ~88 % of TB negative cells. These results suggested that the loss of membrane integrity of cell population started after 3 h of contact of yeast cells with metals mixture. Increasing the exposure time to 24 h originated the permeabilization (disruption) of plasma membrane in the majority of yeast population. At this time, only ~35 % of cell population remained as TB negative cells. Yeast cells incubated in MES pH buffer, in the absence of metals (control), remained with intact membrane (>99 % TB negative cells) (Fig. 1a).

In another approach, membrane integrity was evaluated by the release of UV₂₆₀-absorbing compounds. These compounds are principally constituted by nitrogen compounds derived from intracellular nucleotides and related molecules (Delisle and Phaff 1961). The amount of UV₂₆₀ absorbing materials released by *P. kudriavzevii* cells CCMA 0136, exposed to the metals mixture, for 6 h, was similar to the control cells (Fig. 1b). Yeast cells exposed for 24 h to multi-metals released UV₂₆₀ absorbing materials (Fig. 1b). This leakage of UV₂₆₀ absorbing compounds was only observed when the majority of cell population displayed a disrupted cell membrane (Fig. 1). As a positive control, *P. kudriavzevii* cells were treated with Cu, an ion known by its rapid effect on yeast membrane integrity (Ohsumi et al. 1988; Soares et al. 2003). As expected, a fast and pronounced leakage of UV₂₆₀ absorbing compounds were observed as consequence of plasma-membrane permeabilization (Fig. 1b).

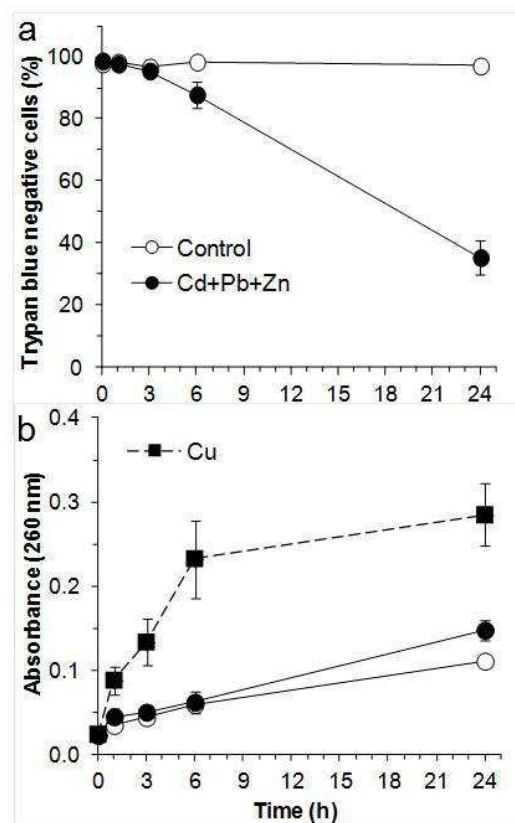


Figure 1 Effect of multi metals on the membrane integrity of *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Yeast cells were suspended in 10 mmol/l MES pH buffer (pH 6.8) in the absence (control) or in the presence of a mixture of metals comprised by 5 mg/l cadmium, 10 mg/l lead and 5 mg/l zinc. (a) Assessment of membrane integrity by microscopic determination of cells excluding trypan blue (TB) (TB negative cells). The data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments. (b) Leakage of UV₂₆₀-absorbing cellular components. Copper (13 mg/l) was used as positive control. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

The results obtained suggest that the mixture of Cd, Pb and Zn, induce the disruption of membrane integrity in a time-dependent manner. However, metals mixture seems not has as immediate target, the plasma membrane, as the

case of copper. These results prompted us to evaluate other physiological effects of the mixture of the heavy metals on the yeast *P. kudriavzevii*.

3.2 The loss of proliferation capacity and metabolic activity in yeast cells exposed to multiple metals is an early event

The ability of a single cell to divide and form a colony (colony-forming unit, CFU) on the surface of a rich-medium plates, such as YPD (clonogenic assay), is typically used to evaluate toxic effects (Mirisola et al. 2014). The exposure of yeast cells to a mixture of Cd, Pb and Zn induced a progressive loss of cell proliferation (Fig. 2a). The exposure to metals stress for 6 h, provoked a loss of ~50 % of cell proliferation capacity. When incubated with metals for 24 h, < 20 % of cell population retained the proliferation capacity (Fig. 2a).

The fluorescent probe FUN-1 has been used to distinguish between metabolically active and inactive yeast cells (Millard et al. 1997). In this context, FUN-1 has been used in the assessment of the toxic impact of organic and inorganic compounds on yeast metabolic activity (Fiolka et al. 2012; Parisi-Duchene et al. 2006; Van der Heggen et al. 2010). Before metals treatment, >97 % yeast cells were metabolically active and thus able to process and concentrate FUN-1 in the vacuole, as orange-red cylindrical intravacuolar structures (CIVS, FUN-1 positive cells) (Fig. 2c). Yeast cells metabolically inactive (FUN-1 negative cells), showed a green cytoplasmatic fluorescence without CIVS (Fig 2c). The exposure of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 cells to the metals mixture originated a loss of metabolic activity, since cell population, progressively, become unable to process FUN-1 (Fig. 2b). After 6 h of metals exposure, ~40 % of cells were FUN-1 positive. After 24 h of metals exposure only ~1 % of cells were FUN-1 positive. The loss of metabolic activity (assessed by the staining with FUN-1) accompanied the loss of proliferation capacity evaluated through

the clonogenic assay (Fig. 2a,b). A loss <10 % of FUN-1 positive cells were observed in the control, after 24 h of incubation in buffer in the absence of metals. Probably, the starvation induced by the long (24 h) incubation in buffer medium can explain this result. In fact, FUN-1 processing is a metabolic-dependent process (Millard et al. 1997).

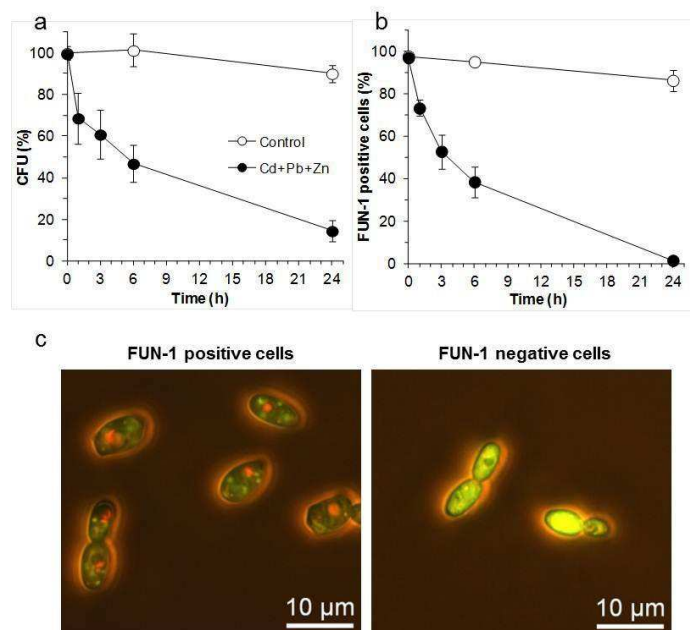


Figure 2 Influence of multi metals on proliferative capacity and metabolic activity of *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Yeast cells were suspended in 10 mmol/l MES pH buffer (pH 6.8) in the absence (control) or in the presence of metals mixture, reported in Fig. 1. (a) Quantification of yeast survival using a clonogenic assay (colony-forming units, cfu, on YPD agar). The data represent the mean (\pm SD) of eight independent experiments. (b) Evaluation of the metabolic activity of yeast cells, by fluorescence microscopy, after staining with FUN-1; the data represent the mean (\pm SD) of five independent experiments. (c) Microphotographs illustrative of FUN-1 stained cells. FUN-1 positive cells: cells metabolically active with cylindrical intravacuolar structures - CIVS (orange-red structures); FUN-1 negative cells: metabolically inactive cells, green stained, without CIVS

3.3 Cell wall was not modified by the exposure to multi-metals

The impact of the exposure of multi-metals on cell wall of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 was assessed using calcofluor white (CFW), a specific chitin dye (Costa-de-Oliveira et al. 2013; Pringle 1991). Cell walls of untreated cells (control) of *P. kudriavzevii*, stained with CFW, displayed a weak fluorescence, while the septa (junction between the mother cell and the buds-daughter cells) displayed a bright fluorescence (Fig. 3; arrow). These results suggest that septa are chitin-rich regions. Chitin seems to be almost exclusively located in the scar formed between the daughter and mother cell. Replicative aged yeast cells (i.e, cells that undergone several divisions) (Longo et al. 2012), which can be assessed by counting the number of budding scars, also displayed a faint surface fluorescence (Fig. 3). Cells incubated with a mixture of metals for 6 h retain the normal morphology. In addition, displayed a typical faint fluorescence on their surface and presented visible bud scars (photos not shown). These observations suggest that the exposure to metals mixture up to 6 h did not induce cell morphology modification or redistribution of chitin through the cell wall in *P. kudriavzevii*.

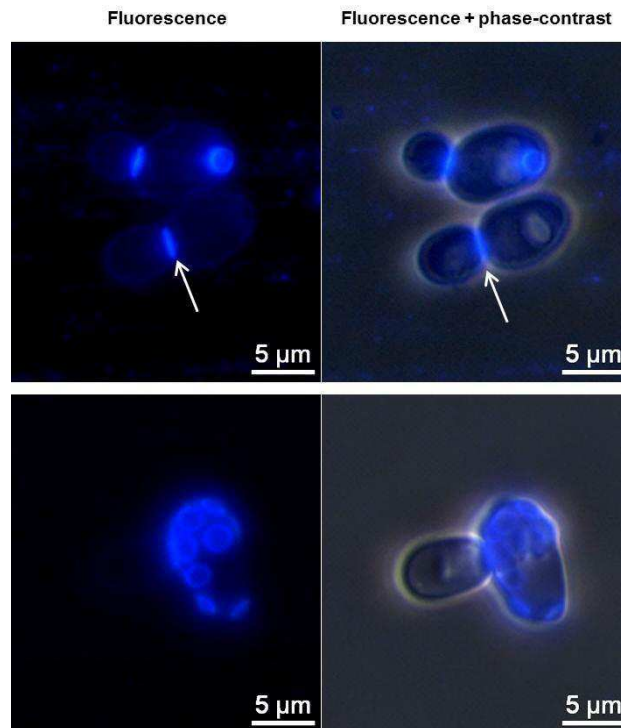


Figure 3 Visualization of the cell wall of *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Microphotographs illustrative of calcofluor white stained cells. Arrow indicates the chitin-enriched bud neck

3.4 Pb is the metal responsible for the toxic effects

In order to identify who was(were) the metal(s) responsible for the toxic effect, yeast cells were exposed to a single metal in the same concentration used in the mixture. As it can be seen in Fig. 4, in the concentration used, Cd and Zn were not toxic to *P. kudriavzevii* CCMA 0136 cells, since no loss of membrane integrity or proliferation capacity occurred over a period of 24 h. Pb, induced a loss of membrane integrity and cell proliferation capacity (Fig. 4) in a similar pattern to induced by metals mixture (Fig. 1a and 2a). Together, these results suggest that, under the concentrations studied, Pb was the metal responsible for the toxic effect of the mixture.

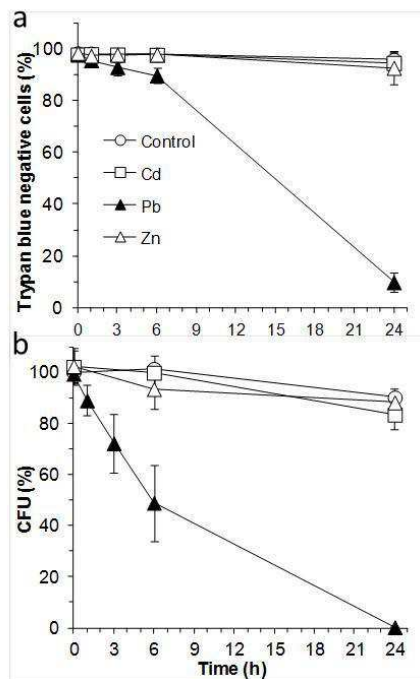


Figure 4 Impact of single metals on the physiology of *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Yeast cells were suspended in 10 mmol/L MES pH buffer (pH 6.8) in the absence (control) or in the presence of 5 mg/l cadmium or 10 mg/l lead or 5 mg/l zinc. (a) Assessment of membrane integrity using the trypan blue assay; the data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments. (b) Quantification of yeast viability using a clonogenicity assay; the data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

3.5 Survival and metabolic activity of yeast cells exposed to multi-metals in soil extract is similar to observed in buffer

In order to test, in a future, the feasibility of using biomass of *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 in the bioremediation of soil contaminated with heavy metals, the toxic impact of the mixture of heavy metals was evaluated in soil extract. As it can be seen in Fig. 5a, a similar trend of loss of proliferation capacity was observed in soil extract (Fig. 5a) and in buffer solution (Fig 2a).

The decrease, over time, of FUN-1 positive cells (Fig. 5b) accompanied the decline of proliferation capacity (Fig. 5a), and are consistent with the decrease observed in buffer solution (Fig. 2b). These results show that even in soil extract, metals exert a toxic impact.

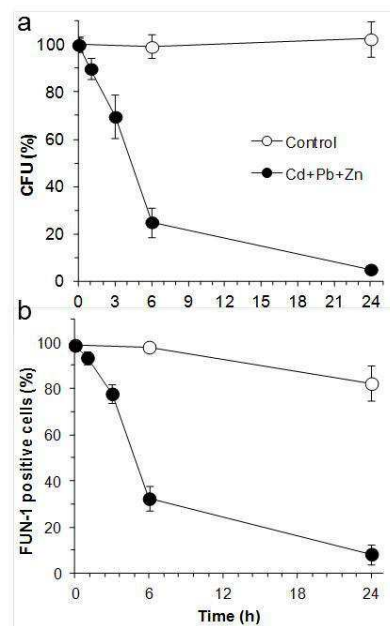


Figure 5 Impact of multi metals, present in soil extract, on the physiology of *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Yeast cells were suspended in soil extract in the absence (control) or in the presence of a mixture of metals, reported in Fig. 1. (a) Quantification of yeast cells viability using a clonogenic assay; the data represent the mean (\pm SD) of six independent experiments. (b) Evaluation of metabolic activity by cell staining with FUN-1; the data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments

4 Discussion

The yeast *P. kudriavzevii* has been isolated from different food a fruit sources, such as cocoa beans, as the strain used in the present work (Pereira et al. 2012). This yeast has a biotechnological potential for bio-ethanol (Dhaliwal et al. 2011) production, in agriculture practices as bio fertilizer (Chan et al. 2012) or in the bioremediation of heavy metals (Ubeda et al. 2014).

The efficiency of heavy metals bioremediation by a metabolism-dependent process is influenced by the impact of the heavy metals on yeast cells. It is described that for several metals, such as Cu, plasma membrane is the first and one of the main targets of toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This metal originated the disruption of membrane integrity with the consequent release of UV₂₆₀-absorbing compounds (Ohsumi et al. 1988; Soares et al. 2003). In the present work, it was observed that the exposure of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 up to 6h, to a mixture of 5 mg/l cadmium, 10 mg/l lead and 5 mg/l zinc, originated a small loss of membrane integrity, without an important leakage of UV₂₆₀-compounds, comparatively to control cells (Fig. 1). The majority of cell population exposed for 6 h to metals mixture loss proliferation capacity and the ability to process the FUN-1 (Fig. 2).

This means that the exposure for 6 h to the simultaneous action of Cd, Pb and Zn, induced in *P. kudriavzevii* cells a physiological state usually defined as “viable but not culturable” (Davey and Hexley 2011; Davey and Kell 1996): cells retained membrane integrity but were not able to form colonies on solid media. In fact, ~88 % of cell population retained the membrane integrity, but only ~50 % was able to proliferate and 40 % of cells were FUN-1 positive (Fig. 1a and Fig. 2). The exposure for 24 h to the action of multi-metals induced a loss of membrane integrity in the majority of cell population, with the leakage of intracellular components (Fig. 1), which resembles a necrotic scenario (Eisenberg et al. 2010). At this time (24 h), a dramatic loss of proliferation

capacity and the ability of yeast cells to process FUN-1 occurred (Fig. 2). Together, these results indicate that target(s) of metals mixture, in *P. kudriavzevii*, had an intracellular localization. The disruption of membrane integrity, observed after 24 h of metals exposure was most likely the consequence of the intracellular disorder.

It was described that *Candida krusei* (*P. kudriavzevii*) isolates from soil sediments, with different levels of environmental pollution, had different chitin content and chitin synthase activities. Isolates coming from the most polluted areas (receiving discharges from petroleum refinery or places contaminated with industrial and domestic effluents) displayed the highest chitin content (Romero et al. 2000). In the present work, no abnormal pattern of chitin deposition or increase of chitin content on yeast cell wall was observed in cells exposed to metals mixture, up to 6 h, comparing with non-exposed cells. In both types of cells (metals treated and non-treated) chitin remained mainly in the scars, which suggest that the exposure to metals mixture did not induce alteration of yeast cell wall.

The evaluation of the individual impact of the three metals on membrane integrity and proliferation capacity of *P. kudriavzevii* yeast cells strongly indicates that Pb is the main element responsible for the toxic impact of the mixture. Cd and Zn, in the concentrations tested, were not toxic to *P. kudriavzevii* yeast cells (Fig. 4). The exposure of yeast cells to Pb for 6 h induced a loss of proliferation capacity with a small loss of membrane integrity, similarly to described in *S. cerevisiae* cells (Bussche and Soares 2011).

The media composition, namely the complexation capacity, can affect the metals toxicity. In fact, metal toxicity is correlated with the available metal (i.e., the free and labile metal) concentration and not with the total amount of metal in solution (Huebert and Shay 1992; Sunda and Guillard 1976). Thus, the characteristics of the media where the cells are suspended, namely, the pH and

the presence of organic or inorganic ligands (which can complex metals), can affect the amount of available metal, and thus, influence metal toxicity (Angle and Chaney 1989). The buffer here used (MES) does not complex Cd, Pb or Zn (Soares et al. 1999a; Soares et al. 1999b). This means that the total metal concentration is equal to the fraction of metal available, and consequently, all the toxic effects can be correlated with the total concentration of metal added. The loss of proliferation capacity and metabolic activity induced by metals mixture displayed the same trend when cells were suspended in buffer (Fig. 2) or in soil extract (Fig. 5). Most likely, soil extract used presented low complexing properties, which can explain the similar toxic effects observed in both media (buffer and soil extract).

In conclusion, *P. kudriavzevii* yeast cells exposed to a metals mixture (Cu, Pb and Zn) up to 6h retained membrane integrity, but presented a loss of metabolic activity and proliferation capacity. The exposure to metals mixture for 24 h, induced a loss of membrane integrity with the leakage of intracellular components, which was accompanied by a deep disturbance of metabolic activity and proliferation capacity. The exposure of yeast cells to single metals revealed that, in the concentrations tested, Pb was the metal responsible by the toxic effects. The information obtained about the impact of metals mixture on yeast physiology can be useful for further research about metals tolerance mechanisms in *P. kudriavzevii* and in the use of this yeast in the bioremediation of wastewaters or soils contaminated with heavy metals.

Acknowledgments

The authors thank the FCT Strategic Project PEst-OE/EQB/LA0023/2013. Vanessa A. Mesquita gratefully acknowledges the grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank Dr. Rosane Freitas Schwan responsible from CCMA to offer the yeast strain.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

References

- Angle JS, Chaney RL (1989) Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. *Appl Environ Microbiol* 55:2101-2104
- ATSDR (2005) Toxicological profile for zinc. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). U.S. Department of Health and Human Services – Public Health Service
- ATSDR (2007) Toxicological profile for lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). U.S. Department of Health and Human Services – Public Health Service
- ATSDR (2012) Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). U.S. Department of Health and Human Services – Public Health Service
- Avery SV (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* 49:111-142
- Bleackley MR, MacGillivray RTA (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals* 24:785-809
- Bussche JV, Soares EV (2011) Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:679-687
- Chan GF, Gan HM, Ling HL, Rashida NAA (2012) Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryot Cell* 11:1300-1301
- Chen C, Wang JL (2007) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:683-687
- Costa-de-Oliveira S, Silva AP, Miranda IM, Salvador A, Azevedo MM, Munro CA, Rodrigues AG, Pina-Vaz C (2013) Determination of chitin content in fungal cell wall: an alternative flow cytometric method. *Cytom Part A* 83A:324-328

- Cui QH, Tang CC (2000) Effects of lead and selenium on yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) telomere. *Environ Sci Health Part A-Toxic/Hazard Subst Environ Eng* 35:1663-1671
- Cyert MS, Philpott CC (2013) Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193:677-713
- Davey HM, Hexley P (2011) Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ Microbiol* 13:163-171
- Davey HM, Kell DB (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev* 60:641-696
- Delisle AL, Phaff HJ (1961) The release of nitrogenous substances by brewer's yeast. *Proc Am Soc Brew Chem*:103-118
- Dhaliwal SS, Oberoi HS, Sandhu SK, Nanda D, Kumar D, Uppal SK (2011) Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. *Bioresour Technol* 102:5968-5975
- Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Buttner S, Tavernarakis N, Madeo F (2010) Necrosis in yeast. *Apoptosis* 15:257-268
- Fiolka MJ, Grzywnowicz K, Chlebiej K, Szczuka E, Mendyk E, Keller R, Rzymowska J (2012) Anti-*Candida albicans* action of the glyco-protein complex purified from metabolites of gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from earthworms *Dendrobaena veneta*. *J. Appl Microbiol* 113:1106-1119
- Gardarin A, Chedin S, Lagniel G, Aude JC, Godat E, Catty P, Labarre J (2010) Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Mol Microbiol* 76:1034-1048
- Gitan RS, Shababi M, Kramer M, Eide DJ (2003) A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* 278:39558-39564

- Howlett NG, Avery SV (1997) Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol* 63:2971-2976
- Huebert DB, Shay JM (1992) The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca* L. *Arch Environ Contam Toxicol* 22:313-318
- Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B (2012) Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab* 16:18-31
- MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 19:2845-2855
- Mapolelo M, Torto N (2004) Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Talanta* 64:39-47
- Millard PJ, Roth BL, Thi HPT, Yue ST, Haugland RP (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 63:2897-2905
- Mirisola MG, Braun RJ, Petranovic D (2014) Approaches to study yeast cell aging and death. *FEMS Yeast Res* 14:109-118
- Mowll JL, Gadd GM (1983) Zinc uptake and toxicity in the yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 129:3421-3425
- Nair AR, DeGheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuypers A (2013) Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? *Int J Mol Sci* 14:6116-6143
- Naja GM, Volesky B (2010) Toxicity and sources of Pb, Cd, Hg, Cr, As and radionuclides in the environment. In: Wang LK, Chen JP, Hung YT, Shammam NK (eds) *Handbook on Heavy Metals in the Environment*. Taylor & Francis and CRC Press, Boca Raton, FL, pp 13-61
- Nargund AM, Avery SV, Houghton JE (2008) Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis* 13:811-821

- Ohsumi Y, Kitamoto K, Anraku Y (1988) Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J Bacteriol* 170:2676-2682
- Parisi-Duchene E, Reibel C, Grawey I, Heller R, Mazurier I, de Briel DA, Moskovtchenko P (2006) Rapid antifungal susceptibility testing of fluconazole and amphotericin B by flow cytometry using FUN-1: a preliminary study. *J Mycol Med* 16:126-133
- Pereira GVD, Miguel M, Ramos CL, Schwan RF (2012) Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Appl Environ Microbiol* 78:5395-5405
- Perez RR, Sousa CA, Vankeersbilck T, Machado MD, Soares EV (2013) Evaluation of the role of glutathione in the lead-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* 67:300-305
- Pringle JR (1991) Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol* 194:732-735
- Romero MC, Gatti ME, Cordoba S, Cazau MC, Arambarri AM (2000) Physiological and morphological characteristics of yeasts isolated from waste oil effluents. *World J Microbiol Biotechnol* 16:683-686
- Rossi E (2008) Low level environmental lead exposure--a continuing challenge. *Clin Biochem Rev* 29:63-70
- Ruta LL, Popa VC, Nicolau I, Danet AF, Iordache V, Neagoe AD, Farcasanu IC (2014) Calcium signaling mediates the response to cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett* 588:3202-3212
- Soares EV, Hebbelinck K, Soares HMVM (2003) Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can J Microbiol* 49:336-343
- Soares EV, Soares H (2012) Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environ Sci and Pollut R* 19:1066-1083

- Soares EV, Soares HMVM (2013) Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6667-6675
- Soares H, Pinho SC, Barros M (1999a) Influence of *n*-substituted aminosulfonic acids with a morpholinic ring pH buffers on the redox processes of copper or zinc ions: a contribution to speciation studies. *Electroanalysis* 11:1312-1317
- Soares HMVM, Conde PCFL, Almeida AAN, Vasconcelos MTSD (1999b) Evaluation of *n*-substituted aminosulfonic acid pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Anal Chim Acta* 394:325-335
- Sousa CA, Soares EV (2014) Mitochondria are the main source and one of the targets of Pb (lead)-induced oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5153-5160
- Suh JH, Yun JW, Kim DS (1999) Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng* 21:383-387
- Sunda WG, Guillard RRL (1976) Relationship between cupric ion activity and toxicity of copper to phytoplankton. *J Mar Res* 34:511-529
- Ubeda JF, Maldonado M, Briones AI, Gonzalez FJ (2014) Bio-prospecting of distillery yeasts as bio-control and bio-remediation agents. *Curr Microbiol* 68:594-602
- US-EPA (2006) National recommended water quality criteria. United States Environmental Protection Agency (US-EPA). Office of Water, Science and Technology (4304T)
- Van der Heggen M, Martins S, Flores G, Soares EV (2010) Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:1355-1361
- Wang JL, Chen C (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv* 27:195-226
- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T (2007) Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol* 177:637-645

- Yu SS, Qin W, Zhuang GQ, Zhang XE, Chen GJ, Liu WF (2009) Monitoring oxidative stress and DNA damage induced by heavy metals in yeast expressing a redox-sensitive green fluorescent protein. *Curr Microbiol* 58:504-510
- Yuan XF, Tang CC (1999) DNA damage and repair in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells exposed to lead. *J Environ Sci Health Part A-Toxic/Hazard Subst Environ Eng* 34:1117-1128
- Zhao H, Eide D (1996a) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2454-2458
- Zhao H, Eide D (1996b) The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:23203-23210

ARTIGO 3

Normas do periódico *Water, Air & Soil Pollution*

Artigo submetido no periódico indexado:

Water, Air & Soil Pollution

Multi-metals (Cd, Pb and Zn) induces oxidative stress in the yeast *Pichia kudriavzevii*

RESUMO

As células de levedura *Pichia kudriavzevii* expostas, durante 6 horas, à ação de multimetais (Cd, Pb e Zn) acumulam espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS), aferida por meio da oxidação da sonda de 2', 7'- dihidrofluoresceína diacetato. A progressiva perda de integridade da membrana (monitorada utilizando-se iodeto de propídio) foi observada em células tratadas com multimetais. Uma abordagem cinética permitiu observar que o desencadeamento da acumulação intracelular de ROS coincidiu com o início da perda de integridade da membrana. Estes resultados sugerem que a ruptura da integridade da membrana pode ser atribuída ao estresse oxidativo. A exposição de células de levedura a um só metal mostrou que, nas concentrações testadas, Pb era o metal responsável pela indução do estresse oxidativo. As células de levedura quando expostas ao antioxidante (ácido ascórbico) e aos multimetais não acumularam ROS intracelularmente, porém a perda da capacidade de proliferação foi verificada. Em conjunto, os dados obtidos indicam que a acumulação intracelular de ROS contribuiu para a toxicidade do metal e, conseqüentemente, para a ruptura da integridade da membrana. No entanto, outros mecanismos devem ser estudados quanto aos efeitos tóxicos dos metais sobre as células de levedura de *Pichia kudriavzevii*.

Palavras-chave: antioxidante, ácido ascórbico, toxicidade aos metais pesados; integridade da membrana, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio (ROS) de produção.

ABSTRACT

Cells of the yeast *Pichia kudriavzevii* exposed for 6 h to the action of multi-metals (Cd, Pb and Zn) accumulated intracellular reactive oxygen species (ROS), evaluated through the oxidation of the probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. A progressive loss of membrane integrity (monitored using propidium iodide) was observed in multi-metals treated cells. A kinetic approach allowed observe that the triggering of intracellular ROS accumulation coincided in the onset of loss of membrane integrity. These results suggest that the disruption of membrane integrity can be attributed to the oxidative stress. The exposure of yeast cells to single metal showed that, under the concentrations tested, Pb was the metal responsible by the induction of oxidative stress. Yeast cells coexposed to an anti-oxidant (ascorbic acid) and multi-metals did not accumulate intracellular ROS, but loss proliferation capacity. Together, the data obtained indicated that intracellular ROS accumulation contributed to metal toxicity, namely for the disruption of membrane integrity. However, other mechanisms should be underline to the metals toxic effect on the yeast cells of *Pichia kudriavzevii*.

Keywords: antioxidant, ascorbic acid, heavy metals toxicity; membrane integrity, oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) production.

1 Introduction

Heavy metals are one of the most important environmental contaminants. The chronic exposure of humans to heavy metals leads to a variety of diseases which include, neurodegenerative disorders and dysfunction of vital organs (Jomova and Valko 2011). Some metals are considered human carcinogens (for instance, As, Cd, Cr and Ni) (IARC 2012) or probable carcinogens (Pb) by the International Agency for Research of Cancer (IARC 2006).

Metals toxicity has been attributed mainly due to their capacity to induce oxidative stress, originated from toxic levels of reactive oxygen species (ROS). The diatomic molecule of oxygen is relatively not reactive since the two unpaired electrons, present in the other shell, have the same spin. However, if one of these electrons is excited and changes its spin, originates singlet oxygen (O^1), which is a powerful oxidant. Molecular oxygen can accept one electron being reduced to superoxide anion (O_2^-), which is the main ROS produced in vivo. The dismutation of O_2^- (which can occur spontaneously or catalyzed by the action of the enzyme superoxide dismutase) originates hydrogen peroxide (H_2O_2), which is an oxidant with the ability to attack thiols. Hydrogen peroxide can be reduced to water by peroxidases. In the presence of transition metals, H_2O_2 originates the hydroxyl radical (OH^\cdot) one of the strongest oxidants. Hydroxyl radical reacts, indiscriminately with bio molecules of all classes (Herrero et al. 2008; Bartosz 2009).

Intracellular accumulation of ROS, metal-induced, can occur by several direct or indirect mechanisms. Metals, like Fe, Co, Cr and Cu, can undergo redox-cycling reactions. In the case of redox-inactive metals, like Cd, Hg and Pb, may induce oxidative stress by different indirect mechanisms, such as: displace of redox-active metals from cellular binding sites, inhibition of specific enzymatic antioxidant defences and depletion of pools of antioxidant molecules

such as reduced glutathione (Stohs and Bagchi 1995; Avery 2001; Wysocki and Tamás 2010). ROS metal-induced can produce deterioration of biological molecules, such as lipid peroxidation (Howlett and Avery 1997), depletion of protein sulphhydryl (Chrestensen et al. 2000) and DNA damage (Serero et al. 2008). Oxidative stress damage metal-induced may cause yeast cell death (Liang and Zhou 2007; Nargund et al. 2008; Bussche and Soares 2011; Sousa and Soares 2014).

The presence of heavy metals in soil, surface and ground water constitutes an important environmental problem. Most frequently, metal pollution occurs as a form of multi-metals. This is the case of areas in the vicinity of mining and smelting sites (Li et al. 2014) or electroplating industries (Machado et al. 2010). The present work, aims to contribute for the elucidation of the mechanisms of toxicity associated with the exposure of the yeast *Pichia kudriavzevii* to multi-metals (Cd, Pb and Zn). Specifically, the impact of multi-metals on the intracellular ROS level was addressed. In addition, the influence of single metal on ROS production was also investigated. The effect of ascorbic acid on the mitigation of oxidative stress and toxicity was evaluated.

2 Material and Methods

2.1. Yeast, media and growth

In this work, a strain of *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 (former name UFLA CHY 18.4) was used. This strain was previously selected for the ability to grow and it bioaccumulate high amounts of mixed metals Cd, Pb and Zn (data not shown). The strain was isolated from cocoa beans as previously described (Pereira et al. 2012). The gene sequence has been deposited in GenBank under the accession number KJ468031.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ468031>) and belong to collection of

cultures of Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras (Minas Gerais, Brazil) (CCMA).

The strain was maintained at 4 °C on YPD agar slants [10 g/l yeast extract (Difco-BD), 20 g/l peptone (Difco-BD), 20 g/l dextrose (Merck) and 20 g/l agar (Merck)]. Yeast pre-cultures were prepared in YPD broth. Cells were incubated at 25 °C on an orbital shaker at 150 rpm for 8–10 h. Cultures in the exponential growth phase were obtained by inoculating YPD broth with pre-cultures and then grown overnight ($OD_{600} \sim 0.5$) under the same conditions as the pre-cultures.

2.2 Exposure of yeast cells to metal stress

Exponential-phase cells were harvested by centrifugation (2,500xg, 5 min), washed twice and re-suspended in deionised water at $\sim 1 \times 10^8$ cells/ml. Subsequently, cells were suspended in 10 mmol/l [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] MES pH buffer (Sigma-Aldrich), pH 6.8.

In the assessment of the influence of ascorbic acid (AA) on intracellular ROS level and cell viability, cells were suspended in 100 mmol/l MES pH buffer, pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml, with 10 mmol/l AA (Merck) in the dark. Although AA in solution can undergo oxidation, it was described that at pH 7.0 (closed to the pH value used), the percentage of non-degraded AA, after 6 h, was higher than 80% (Gallarate et al. 1999). The pH of buffer solution did not change during the incubation with AA.

Metals mixture or individual metals were added at a final concentration: cadmium, 5 mg/l; lead, 10 mg/l; zinc, 5 mg/l. Cells suspensions, at 1×10^7 cells/ml, were shaken in 100-ml Erlenmeyer flasks at 150 rpm at 25 °C. The following stock standard solutions (Merck) were used: $CdCl_2$ 1000 mg/l; $(Pb(NO_3)_2)$ 2000 mg/l; $Zn Cl_2$ 2000 mg/l.

2.3 Detection of intracellular ROS production

Intracellular ROS production was monitored with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA; Sigma). Cells were suspended at 1×10^7 cells/ml in MES buffer (10 mmol/l or 100 mmol/l in the case of the assay with AA, pH 6.8) and incubated at 25 °C for 20 min with 20 μ mol/l H₂DCFDA (final concentration) before metals treatment. Yeast cells were subsequently exposed to metals mixture (in the absence or presence of 10 mmol/l AA) or individual metals and placed in quadruplicate in a 96-well flat microplate (Orange Scientific, Belgium), 200 μ l per well. The fluorescence intensity was measured (relative fluorescence units, RFU) at defined intervals of time reported in the figures in a microplate reader at a fluorescence excitation of 485/14 nm and an emission of 535/25 nm. Fluorescence was corrected (subtracting cell, buffer and dye autofluorescence) and normalized considering the cell concentration.

2.4 Assessment of membrane integrity

Plasma membrane integrity was assessed by staining the cells with propidium iodide (PI). Cell samples were washed twice with deionised water and suspended in 10 mmol/l MES buffer, pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml. Yeast suspensions were placed in a final concentration of 3 μ mol/l PI (Sigma) for 5 minutes at room temperature. Cells were examined under an epifluorescence microscope. For each sample, at least three replicates of 200 cells (>600 cells) were scored in randomly selected fields.

2.5 Fluorescence microscopy

Cells stained with H₂DCFDA or PI, as described above, were observed using an epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with an HBO 100 mercury lamp and the following filter sets from Leica: GFP

(excitation filter BP 470/40, dichromatic mirror 500 and suppression filter BP 525/50) for H₂DCFDA and I3 (excitation filter BP 450–490, dichromatic mirror 510 and suppression filter LP 515) for PI.

The images were acquired with a Leica DC 300 F camera (Leica Microsystems, Switzerland) using a 100× oil immersion N plan objective and processed using Leica IM 50- Image manager software.

2.6 Measurement of cell viability by CFU count

At time intervals samples were taken (two replicates), serially diluted with sterile deionised water and plated on YPD agar (two replicates of the convenient dilutions). The colonies were counted after 1–2 days of incubation at 25 °C. No further colonies appeared after that incubation time. The % viability was calculated using the number of colony-forming units (CFU)/ml at zero time as reference (100%).

2.7 Reproducibility of the results

All experiments were repeated, independently, three to five times. The data reported are the mean values ± standard deviation (SD), presented with 95% confidence.

3 Results

3.1 The exposure to multi-metals induces oxidative stress in *Pichia kudriavzevii*

Intracellular ROS accumulation in yeast cells was assessed using the probe H₂DCFDA. The nonfluorescent compound H₂DCFDA easily penetrates the plasma membrane and, once inside the cell, is hydrolysed to H₂DCF by non-specific esterases. In the presence of hydrogen peroxide, H₂DCF is oxidized to the high fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (Tarpey et al. 2004). Cells not exposed to metals mixture (control) remained unstained (Fig. 1a). Conversely,

cells incubated in the presence of a metals mixture comprised by 5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb and 5 mg/l Zn for 3 h exhibited a strong green fluorescence, which indicated that cells contained substantial amounts of ROS (Fig. 1a).

The kinetic of the intracellular ROS in yeast cells not exposed (control) or exposed to metals mixture was carried out. As it can be seen in Fig 1b, the level of intracellular ROS, in yeast cells of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 increased markedly after two hours of exposure to metals mixture about $\sim 10 \times 10^3 / 10^7$ cells per unit of relative fluorescence (RFU). After 6 hours of metals exposure mixture to the cells, higher levels of ROS production was observed with some $130 \times 10^3 / 10^7$ cell per RFU. As expected, the level of intracellular ROS in non-treated cells remained low during the 6 h period (Fig. 1b).

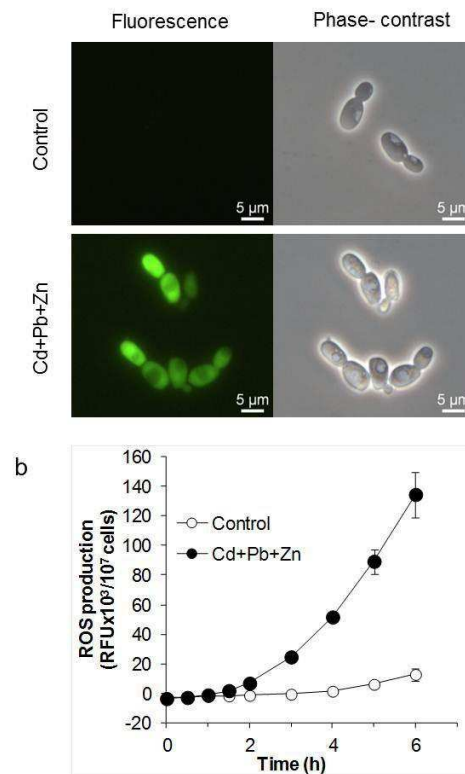


Figure 1 Reactive oxygen species (ROS) production in *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 exposed to multi-metals. a - Visualization by fluorescence microscopy of intracellular accumulation of ROS using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Cells were pre-incubated with H₂DCFDA and subsequently exposed to metals mixture, comprised by 5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb and 5 mg/l Zn (Cd+Pb+Zn). Control: cells incubated in the absence of metals. b - Kinetic of ROS production. Cells were pre-loaded with H₂DCFDA and subsequently incubated in the presence of metals mixture (Cd+Pb+Zn) or in the absence of metals (control). This is a typical example of an experiment performed three times. Each point represents the mean (\pm SD) of four fluorescent readings

Lipids of plasma membrane are one of the targets of intracellular ROS. Extensive lipid peroxidation has been correlated with the loss of membrane integrity and cell death (Avery 2011). Membrane integrity was assessed, during the exposure of yeast cells to metals mixture, through PI excluding assay. Cells retained membrane integrity excluded PI (PI negative cells). Cells with disrupted membrane were penetrated by PI and displayed an orange fluorescence (Fig. 2a). A slow loss of membrane integrity was observed during the exposure of yeast cells to metals mixture. After 3 and 6 h of metals exposure, ~6 and 18%, respectively, of cell population lost the membrane integrity (Fig. 2b). Interestingly, the comparison of intracellular ROS accumulation (Fig 1b) and loss of membrane integrity (Fig 2b) allowed verify that the loss of membrane integrity started after the enhancement of intracellular ROS accumulation (3 h) and increased with the raise of intracellular ROS level (6 h).

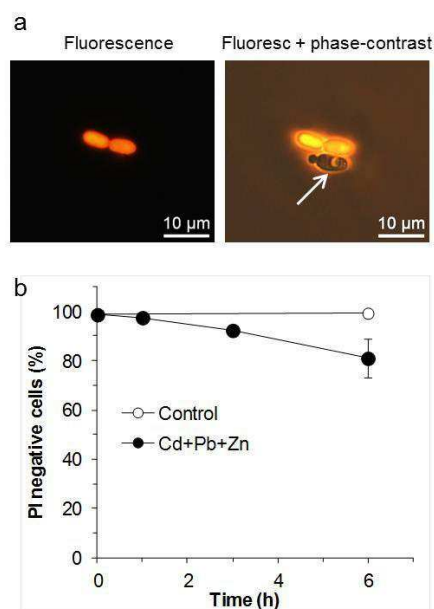


Figure 2 Membrane integrity of the yeast *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 exposed to multi-metals. a – Microphotographs illustrative of cells with intact membrane and thus excluding propidium iodide (PI) (PI negative cell, arrow); cells with disrupted membrane presented an orange fluorescence (PI positive cells). b – Assessment of membrane integrity by microscopic determination of PI negative cells. Cells were exposed to metals mixture, comprised by 5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb and 5 mg/l Zn (Cd+Pb+Zn) and subsequently stained with PI. Control: cells incubated in the absence of metals. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

In order to elucidate what is (are) the metal(s) responsible by the oxidative stress, cells of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 were exposed to a single metal, in the same concentration used in the mixture. As it can be seen in Fig. 3, Cd and Zn, at the concentrations used, did not induce ROS production. The intracellular accumulation of ROS was observed in the presence of Pb, in a similar pattern to the metals mixture (Fig. 3). These results allowed to verify that, with the concentrations used, Pb was the responsible for the oxidative stress observed.

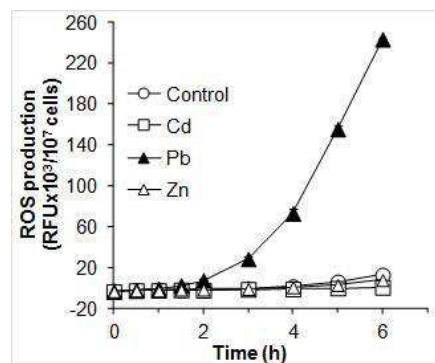


Figure 3 Kinetic of ROS production in *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 exposed to different metals. Cells were pre-loaded with H₂DCFDA and subsequently exposed to 5 mg/l Cd or 10 mg/l Pb or 5 mg/l Zn. Control: cells incubated in the absence of metal. This is a typical example of an experiment performed three times. Each point represents the mean (\pm SD) of four fluorescent readings

3.2. Ascorbic acid impairs oxidative stress but not the toxicity metal-induced

If toxicity metal-induced is attributed to intracellular ROS accumulation, the decrease of ROS to physiological levels would mitigate metal mixture toxicity. In order to test this possibility, yeast cells were exposed to acid ascorbic (AA), a known ROS scavenger (Arrigoni and De Tullio 2002), in the presence or absence of metals mixture. As expected, the presence of AA was able to maintain yeast cells, exposed to metals mixture, with the same amount of intracellular ROS than the non-treated cells (control) (Fig. 4a). However, the presence of the anti-oxidant was unable to block the toxic effect of metal mixture and, consequently, the loss of proliferation capacity (Fig. 4b). Thus, about 50% of the proliferation capacity was lost after 6 hours of exposure of the cells in the mixture of metals.

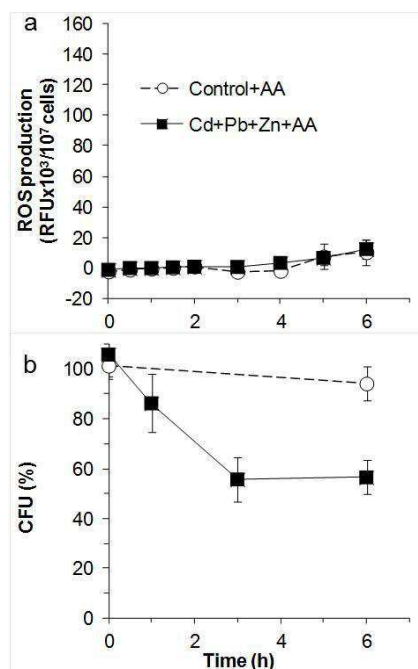


Figure 4 Impact of ascorbic acid on the kinetic of ROS production and proliferation capacity of *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 exposed to metals mixture. Cells were incubated with 10 mmol/l ascorbic acid and metals mixture (Cd+Pb+Zn+AA) or with 10 mmol/l ascorbic acid without metals (control+AA). a- Intracellular ROS evaluated with H₂DCFDA. This is a typical example of an experiment preformed three times. Each point represents the mean (\pm SD) of four fluorescent readings. b - Yeast survival assessed using a clonogenic assay (colony-forming units, cfu, on YPD agar). The data represent the mean (\pm SD) of five independent experiments

4 Discussion

The works found in the literature generally described the impact of a single metal on cells. Taking into account that metal pollution usually occurs as a consequence of the presence of multi-metals, a more realistic approach would be the study of the simultaneous impact of various metals on the cell.

Oxidative stress is one of the most common mechanisms for metal caused cell damage because of generated ROS (Avery 2001). Cd and Pb, non-essential metals, are cellular toxicants that increase ROS in yeast cells of *S. cerevisiae* (Nargund et al. 2008; Muthukumar and Nachiappan 2010; Sousa and Soares 2014). On the other hand, Zn, an essential metal for almost all organisms, is not redox active under physiological conditions (Cuajungco and Lees 1997; Fraústo da Silva and Williams 2001). However, when in excess, Zn is toxic to the cells (Wei et al. 2001). In the present work, using the probe H₂DCFDA, it was possible to detect intracellular ROS accumulation in *P. kudriavzevii* CCMA 0136 yeast cells exposed to multi-metals (Cd, Pb and Zn) (Fig. 1). The evaluation of the impact of single metal on the induction of oxidative stress showed that Pb was the responsible for the induction of intracellular ROS accumulation. Cd and Zn, under the concentration tested, did not induce intracellular ROS accumulation (Fig. 3).

Oxidative damage is usually associated with the peroxidation reactions in membrane lipids, resulting in the loss of membrane integrity (Howlett and Avery 1997; Avery 2011). The simultaneous kinetic study of intracellular ROS accumulation and plasma membrane integrity allowed to verify that the disruption of membrane integrity of in *P. kudriavzevii* CCMA 0136 yeast cells, exposed to metal mixture coincided with the triggering of ROS accumulation (Fig 1b and 2b). These results suggest that the loss of membrane integrity observed can be due to the intracellular accumulation of ROS.

The role of ROS multi-metals induced on the cells of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 yeast cells was further investigated using an anti-oxidant (ascorbic acid) (Arrigoni and De Tullio 2002). The presence of AA was effective to prevent ROS induction by metal mixture, but unable to prevent the loss of yeast cells to divide and form a colony (Fig. 4). The loss of proliferation capacity in the presence of AA followed the same pattern observed in the absence of AA

(unpublished results). Together, these results strongly suggest that toxic effects induced by the presence of metal mixture can not be, primarily, attributed to the oxidative stress, since the loss of proliferation capacity precedes the enhance of intracellular ROS accumulation.

In conclusion, *P. kudriavzevii* CCMA 0136 yeast cells exposed for 6 h to the simultaneous action of multi-metals (Cd, Pb and Zn) accumulated intracellularly ROS. The oxidative stress seems to be the responsible for the disruption of plasma membrane, since the triggering of loss of membrane integrity coincided with the onset of intracellular ROS accumulation. The analyses of the action of single metals allowed determine that, under the concentration used, Pb was the metal responsible for the intracellular ROS accumulation. Besides the loss of membrane integrity, other toxic mechanisms, not directly associated with oxidative stress, should underline the toxicity multi-metals induced, since a loss of proliferation capacity was observed in the absence of intracellular ROS accumulation.

References

- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1569, 1-9.
- Avery, S. V. (2001). Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv. Appl. Microbiol.*, 49, 111-142.
- Avery, S. V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*, 434, 201-210.
- Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, 77, 1303-1315.
- Bussche, J. V., & Soares, E. V. (2011). Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 679-687.
- Chrestensen, C. A., Starke, D. W., & Mieryl, J. J. (2000). Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 275, 26556-26565.

- Cuajungco, M. P., & Lees, G. J. (1997). Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 4, 137-169.
- Fraústo da Silva, J. J. R., & Williams, R. J. P. (2001). *The biological chemistry of the elements - the inorganic chemistry of life* (2nd ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M., & Bovo, S. (1999). On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics*, 188, 233-241.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1780, 1217-1235.
- Howlett, N. G., & Avery, S. V. (1997). Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2971-2976.
- IARC. (2006). *Inorganic and organic lead compounds* (Vol. 87). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC).
- IARC. (2012). *Arsenic, metals, fibres, and dusts-a review of human carcinogens* (Vol. 100C). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283, 65-87.
- Li, Y., Wang, H., Wang, H., Yin, F., Yang, X., & Hu, Y. (2014). Heavy metal pollution in vegetables grown in the vicinity of a multi-metal mining area in Gejiu, China: total concentrations, speciation analysis, and health risk. *Environ Sci Pollut Res*, 21, 12569-12582.
- Liang, Q. L., & Zhou, B. (2007). Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol. Biol. Cell.*, 18, 4741-4749.
- Machado, M. D., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. M. (2010). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: application to the treatment of real electroplating effluents containing multielements. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, 1353-1360.
- Muthukumar, K., & Nachiappan, V. (2010). Cadmium-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 47, 383-387.
- Nargund, A. M., Avery, S. V., & Houghton, J. E. (2008). Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis*, 13, 811-821.
- Pereira, G. V. D., Miguel, M., Ramos, C. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to

- develop a defined starter culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 5395-5405.
- Serero, A., Lopes, J., Nicolas, A., & Boiteux, S. (2008). Yeast genes involved in cadmium tolerance: identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. *DNA Repair*, 7, 1262-1275.
- Sousa, C. A., & Soares, E. V. (2014). Mitochondria are the main source and one of the targets of Pb (lead)-induced oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5153-5160.
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 321-336.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 286, R431-R444.
- Wei, J. P. J., Srinivasan, C., Han, H., Valentine, J. S., & Gralla, E. B. (2001). Evidence for a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism. *J. Biol. Chem.*, 276, 44798-44803.
- Wysocki, R., & Tamás, M. J. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 925-951.

ARTIGO 4

Normas do periódico *Waste Management*

Artigo em submissão para publicação no periódico indexado:

Waste Management

Multi-metals (Cd, Pb and Zn) induce toxicity in the yeast *Pichia kudriavzevii*: impact of cell metabolic state

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a influência do estado metabólico da levedura *Pichia kudriavzevii* na suscetibilidade a metais (5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb e 5 mg/l Zn). As células expostas à mistura de metais na presença de 25 mmol/l de glicose mostraram maior perda de integridade da membrana e capacidade de proliferação, comparativamente com as células incubadas na ausência de glicose. A glicose aumentou os efeitos tóxicos de Cd e Pb, respectivamente. A intensificação da toxicidade dos metais pesados induzidos pela susceptibilidade a glicose foi atenuada pela presença simultânea de um inibidor mitocondrial respiração (azida de sódio; NaN₃). As células empobrecidas de ATP, devido ao tratamento das células da levedura com o análogo de glicose não metabolizado 2-desoxi-D-glicose, apresentaram um aumento da susceptibilidade à mistura de metais pesados. A pré-incubação das células de levedura com íons de Ca não aliviaram a toxicidade induzida pelos metais pesados. Em conclusão, a susceptibilidade de *Pichia kudriavzevii* a metais pesados é influenciada pelo estado metabólico das células.

Palavras-chave: azida de sódio, 2-desoxi-D-glucose (2-DOG), metais pesados de toxicidade, integridade da membrana, capacidade de proliferação, viabilidade, levedura.

ABSTRACT

This work aims to examine the influence of the metabolic state of the yeast *Pichia kudriavzevii* on the susceptibility to metals (5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb and 5 mg/l Zn). Cells exposed to metals mixture in the presence of 25 mmol/l glucose displayed a higher loss of membrane integrity and proliferation capacity, comparatively to cells incubated in the absence of glucose. Glucose increased marginal and highly Cd and Pb toxic effects, respectively. The heightening of heavy metals susceptibility glucose-induced was attenuated by the simultaneous presence of a mitochondrial respiration inhibitor (sodium azide; NaN₃). ATP-depleted cells, due to the treatment of yeast cells with the nonmetabolisable glucose analog 2-deoxy-D-glucose, presented an increased susceptibility to heavy metals mixture. Pre-incubation of yeast cells with Ca ions did not alleviate heavy metals induced toxicity. In conclusion, the susceptibility of *Pichia kudriavzevii* to heavy metals is deeply influenced by the metabolic state of the cells.

Keywords: sodium azide; 2-deoxy-D-glucose (2-DOG); heavy metals toxicity; membrane integrity; proliferation capacity; viability; yeast

1 Introduction

Heavy metal pollution is a worldwide problem. Industrial activities, such as mining, metal processing and electroplating, produce solid wastes and/or wastewaters streams containing multi-metals (Machado et al. 2010; Li et al. 2014). The release of these solid wastes or effluents originates the metallic contamination of soil, surface and ground water.

In the last decades, considerable effort has been done in the search of new processes (to the conventional physic-chemicals) for the bioremediation of matrix contaminated with heavy metals. In this context, yeast cells has been suggested as a promissory biomass for a low cost technology (Soares and Soares 2012). Recently, the yeast *Pichia kudriavzevii* was described as a new alternative for heavy metals bioremediation due to the high metal removal capacity (Ubeda et al. 2014). Metal removal by yeast cells can occur by two main mechanisms: surface-accumulation (called biosorption) and metabolic-dependent process (designated as bioaccumulation). The latter process implies the passage of the metals through cell membrane of viable cells, by different mechanisms, and is influenced by the metabolic state of the cell (Soares and Soares 2013).

Zinc is an essential metal since acts as catalytic or structural cofactor in many different proteins (Eide 2006). Uptake of Zn in the yeast *S. cerevisiae* is mediated, mainly, by two specific transporters: Zrt1p (the high affinity transporter active in Zn deficient cells) and Zrt2p (the low affinity transporter active in Zn replete cells) (Zhao and Eide 1996a; Zhao and Eide 1996b). Zinc transport by Zrt1p is energy dependent (Zhao and Eide 1996b). Other two plasma membrane Zn transporters (Fet4p and Pho84p) are involved in Zn uptake by the yeast *S. cerevisiae*. The transporter Fet4p, involved in the low affinity uptake of iron, copper as well as zinc (Waters and Eide 2002). Zn uptake by the

Pho84 high affinity phosphate transporter was also suggested (Jensen et al. 2003).

Non-essential elements, like Cd and Pb, have no known biological functions being toxic at relatively low concentrations. It is assumed that for non-essential elements, there would be no specific uptake mechanisms. Alternatively, these metal ions would enter in yeast cells via uptake systems for essential cations. This is the case of the divalent metal transporter (DMT1), which belongs to the family of natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) (Gunshin et al. 1997; Au et al. 2008). In mammal cells, DMT1 (also called DCT1 or Nramp2) has been associated with the transport of a variety of divalent metals including Fe, Mn, Co, Cu, Ni and also with Cd and Pb uptake (Gunshin et al. 1997; Bressler et al. 2004). Yeast cells overexpressing DMT1 displayed an increased Pb uptake (Bannon et al. 2002). Yeast cells of *S. cerevisiae* expressed three known DMT1 orthologues: Smf1p, Smf2p and Smf3p, encoded by *SMF1*, *SMF2* and *SMF3* genes, respectively (Au et al. 2008). In *S. cerevisiae*, Smf1p and Smf2p transport Mn, Cu, Co and Cd ions (Liu et al. 1997).

The present work aimed to examine the influence of the metabolic state of the yeast *Pichia kudriavzevii* on the susceptibility to the action of heavy metals (Cd, Pb and Zn). Therefore, the influence of glucose, sodium azide (mitochondrial respiratory inhibitor) and ATP depletion on metals-induced toxicity was studied. In addition, the influence of the presence of Ca ions on heavy metals induced toxicity was evaluated.

2 Material and Methods

2.1 Yeast, media and growth conditions

In this work, a strain of *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 (former name UFLA CHY 18.4) was used. The strain was isolated from cocoa beans as

previously described (Pereira et al. 2012). The gene sequence has been deposited in GenBank under the accession number KJ468031.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KJ468031>) and belong to collection of cultures of Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras (Minas Gerais, Brazil) (CCMA). This strain was previously selected for the ability to grow and it bioaccumulate high amounts of mixed metals Cd, Pb and Zn (data not shown).

The strain was maintained at 4 °C on YPD agar slants [10 g/l yeast extract (Difco-BD), 20 g/l peptone (Difco-BD), 20 g/l glucose (Merck) and 20 g/l agar (Merck)]. Yeast pre-cultures were prepared in YPD broth. Cells were incubated at 25 °C on an orbital shaker at 150 rpm for 8–10 h. Cultures in the exponential growth phase were obtained by inoculating YPD broth with pre-cultures and then grown overnight ($OD_{600} \sim 0.5$) under the same conditions as the pre-cultures.

2.2 Exposure of yeast cells to metal stress

Exponential-phase cells were harvested by centrifugation (2,500xg, 5 min), washed twice and re-suspended in deionised water at $\sim 1 \times 10^8$ cells/ml. Cells were placed at 1×10^7 cells/ml in 10 mmol/l [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] MES buffer (Sigma-Aldrich), pH 6.8. In the assessment of the influence of glucose on metals toxicity, cells were suspended in 10 mmol/l MES, pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml, with 25 mmol/l glucose. Glucose addition to yeast cells induces the acidification of the medium, mainly because of the action of the plasma-membrane H^+ -ATPase (Serrano 1983). However, previous control experiments, with cells plus 25 mmol/l glucose (with or without metals) have shown a modification of pH values by less than 0.05 units (data not shown), which means that MES pH buffer, at a concentration of 10 mmol/l, is effective in buffering the solution.

Metals mixture or individual metals were added at a final concentration: cadmium, 5 mg/l; lead, 10 mg/l; zinc, 5 mg/l. Cells suspensions were shaken in 100-ml Erlenmeyer flasks at 150 rpm at 25 °C. The following stock standard solutions (Merck) were used: 1000 mg/l CdCl₂; 2000 mg/l Pb(NO₃)₂; 1959 mg/l ZnCl₂.

2.3 Treatment of yeast cells with metabolic inhibitors and calcium ions

Cells were ATP depleted as previously described (Millard et al. 1997). Briefly, 1×10^7 cells/ml were resuspended in filter-sterilized (0.45 µm pore size) 0.5% (w/v) 2-deoxy-D- glucose (2-DOG) (Sigma-Aldrich) in 10 mmol/l MES, pH 6.8. Cell suspensions were shaken at 150 rpm for 16 h at 25°C, pelleted by centrifugation, washed two times with deionized water, resuspended in 10 mmol/l MES, pH 6.8 and subsequently placed in the absence (control) or presence of metals mixture.

In the study of the effect of sodium azide (NaN₃), cells were suspended at 1×10^7 cells/ml in 10 mmol/l MES, pH 6.8, with 25 mmol/l D-glucose and 20 mmol/l NaN₃ (Sigma-Aldrich), and were preincubated for 10 min before adding the metals mixture.

To study the influence of calcium ions on toxicity induced by heavy metals, cells were suspended in 10 mmol/l MES, pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml and preincubated with 0.5 mmol/l CaCl₂, for 1 min, before adding the metals mixture.

2.4 Assessment of membrane integrity

Membrane integrity was evaluated by staining yeast cells with trypan blue (TB). Cells were washed twice with deionised water and suspended in 10 mmol/l MES, pH 6.8, at 1×10^7 cells/ml. Yeast suspensions were incubated with TB solution (Aldrich), at final concentration of 0.2 % (w/v), at room

temperature, for 20 min. Cells were analysed by light microscopy. For each sample, at least three replicates of 200 cells (>600 cells) were scored in randomly selected fields. Unstained cells were scored as retain plasma membrane integrity (TB negative cells), whereas cells with disrupted membrane appeared blue (TB positive cells).

2.5 Measurement of cell viability by CFU count

At time intervals samples were taken (two replicates), serially diluted with sterile deionised water and plated on YPD agar (two replicates of the convenient dilutions). The colonies were counted after 1–2 days of incubation at 25 °C. No further colonies appeared after that incubation time. The % viability was calculated using the number of colony-forming units (CFU)/ml at zero time as reference (100 %). Viability higher than 100 % was considered as 100 %.

2.6 Reproducibility of the results

All experiments were repeated, independently, at least three times. The data reported are the mean values \pm standard deviation (SD), presented with 95% confidence.

3 Result

3.1 Glucose enhances metals toxicity

The influence of glucose on the toxic impact of the heavy metals mixture comprised by 5 mg/l Cd, 10 mg/l Pb and 5 mg/l Zn was evaluated. For this purpose, cells were incubated in MES buffer at pH 6.8 with 25 mmol/l glucose, before the addition of metals mixture. A fast loss of membrane integrity (Fig 1a) and proliferation capacity (Fig. 1b) occurred in the presence of glucose. After 6 h of metals exposure, in the absence of glucose, ~ 90 % of cells displayed intact membrane (TB negative cells), while in the presence of glucose

the % of TB negative cells dropped to ~40 % (Fig 1a). A similar pattern was observed in the proliferation capacity of the yeast evaluated through the ability of cells to form colonies on the surface of solid medium. After 6h of metals exposure, in the presence of glucose only ~8 % of the cells remained viable, while in the absence of glucose ~47 % of the cells displayed proliferation capacity (Fig. 1b). Cells incubated for 6 h in MES buffer at pH 6.8 in the absence of metals, in the presence or absence of glucose, did not loss membrane integrity (Fig. 1a; data not shown for cells incubated in the absence of glucose for a pictorial clarity). A similar observation was obtained regarding to the proliferation capacity (Fig 1b; data not shown for cells incubated in the absence of glucose).

The effect of glucose in the toxicity induced by each metal of the mixture was examined. Cells incubated with Pb, in the presence of glucose, loss membrane integrity and the proliferation capacity (Fig. 2) in a similar pattern observed with metals mixture (Fig. 1). Cells treated with Cd, in the presence of glucose, did not loss membrane integrity and displayed a small (<20 %) loss of proliferation capacity (Fig. 2). Cells exposed to Zn, in the presence of glucose, did not loss membrane integrity and proliferation capacity (Fig. 2).

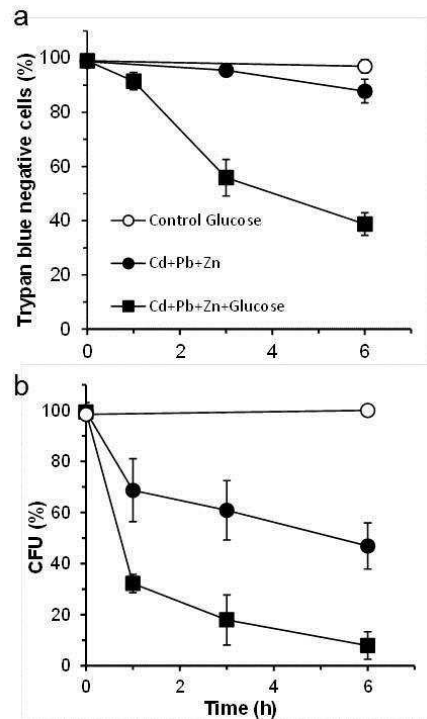


Figure 1 Effect of glucose on the toxicity-induced by heavy metals mixture on the yeast *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Cells were exposed to a metals mixture in the absence (Cd+Pb+Zn) or presence of 25 mmol/l glucose (Cd+Pb+Zn+Glucose). As a control (control glucose), cells were incubated in 25 mmol/l glucose, in the absence of metals. (a) Assessment of membrane integrity by microscopic determination of cells excluding trypan blue (TB) (TB negative cells). The data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments. (b) Quantification of yeast survival using a clonogenic assay (colony-forming units, cfu, on YPD agar). The data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments

These results evidences that the presence of glucose enhances the toxic effect of the metals mixture on the yeast *P. kudriavzevii* CCMA 0136 (Fig. 1). In the metals concentration used, glucose increases, particularly, Pb toxic effect (Fig. 2).

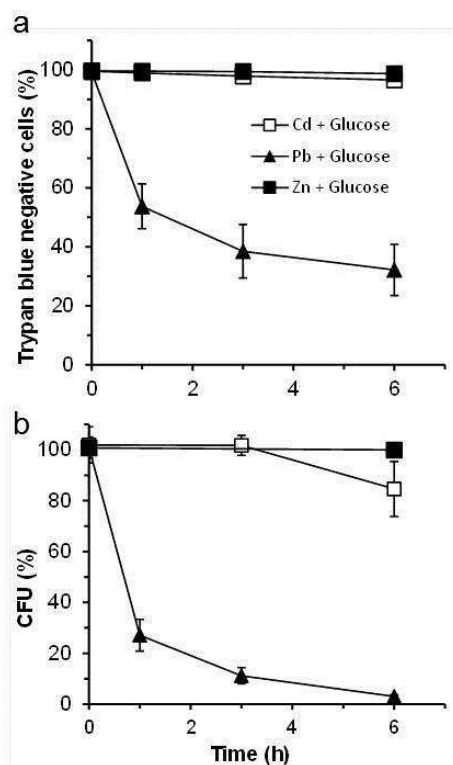


Figure 2 Effect of glucose on the toxicity-induced by single metals on the yeast *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Cells were exposed to individual metals in the presence of 25 mmol/l glucose. (a) Assessment of membrane integrity by microscopic determination of TB negative cells. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments. (b) Quantification of yeast survival using a clonogenic assay. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

3.2 Sodium azide (NaN_3) alleviates metals toxicity

The influence of sodium azide (an inhibitor of mitochondrial electron transport chain), on the susceptibility of yeast cells of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 to metals was evaluated. For this purpose, yeast cells were co-exposed to 20 mmol/l NaN_3 and metals mixture. After 6 h of contact with the metals, the population co-exposed to NaN_3 presented approximately the double of cells with

intact membrane, comparatively to the population exposed to metals in the absence of NaN_3 (Fig 3a). In the same way, cells incubated with NaN_3 and metals mixture for 6 h, displayed a higher viability comparatively to cells exposed to metals in the absence of NaN_3 (Fig. 3b). These results shows that sodium azide alleviate heavy metals toxic effect (Fig. 3).

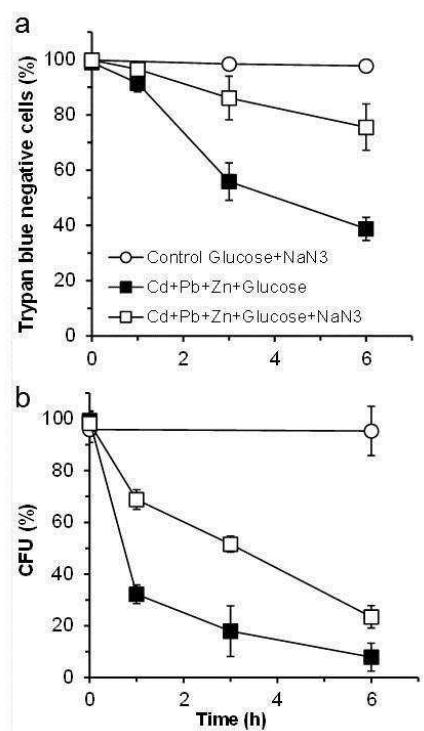


Figure 3 Influence of sodium azide (NaN_3) on the toxicity-induced by heavy metals mixture on the yeast *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Cells were exposed to a metals mixture in the presence of 25 mmol/l glucose without (Cd+Pb+Zn+Glucose) or with 20 mmol/l NaN_3 (Cd+Pb+Zn+Glucose+ NaN_3). As a control, cells were incubated in 25 mmol/l glucose and 20 mmol/l sodium azide, in the absence of metals (Control glucose+ NaN_3). (a) Assessment of membrane integrity by microscopic determination of TB negative cells. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments. (b) Quantification of yeast survival using a clonogenic assay. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

A similar behaviour was observed in the presence of Pb. The cell population simultaneously exposed to NaN_3 and Pb displayed a high % of cells with intact membrane and proliferation capacity, comparatively to cells incubated in the absence of sodium azide (Fig. 4).

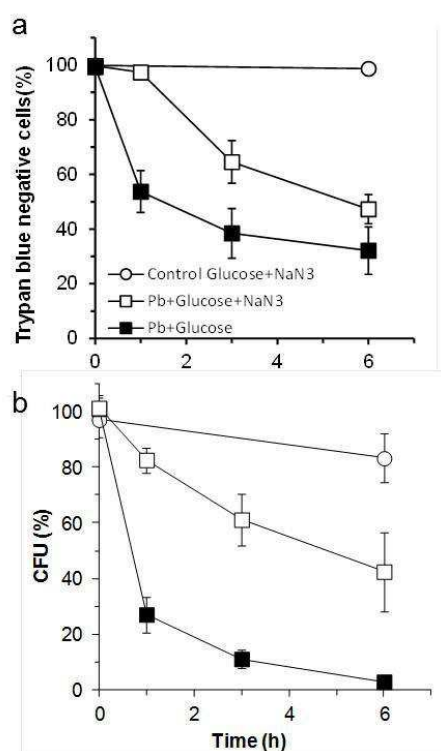


Figure 4 Influence of sodium azide (NaN_3) on the toxicity-induced by lead (Pb) on the yeast *P. kudriavzevii* CCMA 0136. Cells were exposed to 10 mg/l Pb in the presence of 25 mmol/l glucose without (Pb+Glucose) or with 20 mmol/l sodium azide (Pb+Glucose+ NaN_3). As a control, cells were incubated in 25 mmol/l glucose and 20 mmol/l sodium azide, in the absence of metals (Control glucose+ NaN_3). (a) Assessment of membrane integrity by microscopic determination of TB negative cells. The data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments. (b) Quantification of yeast survival using a clonogenic assay. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

Together, these results suggest that the toxicity provoked due to the presence of metals mixture (and particularly Pb) is an energetic-dependent process, since the abolishment of phosphorylation oxidative enhanced the cell viability in the presence of metals mixture (Fig. 3) or Pb (Fig. 4).

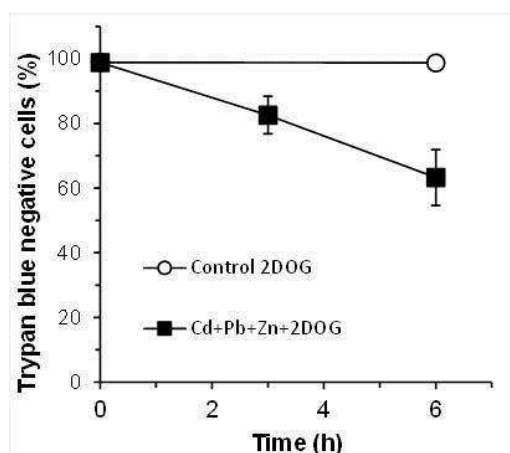


Figure 5 Loss of membrane integrity of the yeast *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 pre-treated with 2-DOG and then exposed to a mixture of heavy metals. Cells were incubated for 16 h with 0.5 % (w/v) 2-DOG and subsequently washed and exposed to metals mixture in MES buffer (Cd+Pb+Zn+2DOG). Control: cells incubated for 16 h with 0.5 % (w/v) 2-DOG and then washed and resuspended in MES buffer in the absence of heavy metals. Membrane integrity was assessed by microscopic determination of TB negative cells. The data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments

3.3 ATP depleted cells are more susceptible to the toxic action of the metals

In natural environments, yeast cells are exposed to extreme variations in nutrient availability, namely in their source of carbon/energy (Petti et al. 2011). In order to test the effect of energy depletion (ATP) on the yeast susceptibility to the heavy metals, cells of *P. kudriavzevii* CCMA 0136 were treated overnight with 2-deoxy-D-glucose (2-DOG). 2-DOG is a nonmetabolisable glucose analogue which induces ATP depletion (Millard et al. 1997). Cells treated with

2-DOG and subsequently suspended in MES buffer, in the absence of metals, retained membrane integrity (control) (Fig. 5) and proliferation capacity (data not shown). However, 2-DOG treated cells, exposed to metals mixture for 6 h, displayed a higher loss of membrane integrity (Fig. 5) and proliferation capacity (data not shown), comparatively to cells not exposed to 2-DOG (Fig. 1).

3.4 Ca ions do not reduce metals toxicity

Divalent ions can protect against heavy metals toxicity by different mechanisms: 1) competition with heavy metals uptake, reducing their intracellular levels; 2) by modification of microbial electrostatic properties making their surface less negative and increasing K_m for cation uptake; or 3) stabilization of yeast plasma membrane (Borst-Pauwels 1981; Collins and Stotzky 1992). Therefore, it was investigated the impact of calcium ions on the alleviation of heavy metals-induced loss of membrane integrity of the yeast *P. kudriavzevii* CCMA 0136. With this aim, yeast cells were preincubated with 0.5 mmol/l Ca and subsequently exposed to heavy-metals mixture. As it can be seen in Fig. 6, the presence of Ca ions did not impair the loss of membrane integrity heavy-metals-induced. After 6 h of metals exposure, the % of cells with membrane disrupted was similar in the presence or absence of Ca^{2+} (Fig. 6). Similarly, after 24 h of incubation with heavy metals mixture, ~60 % of cells displayed membrane disrupted, independently of being placed in the absence or presence of Ca^{2+} (Fig. 6).

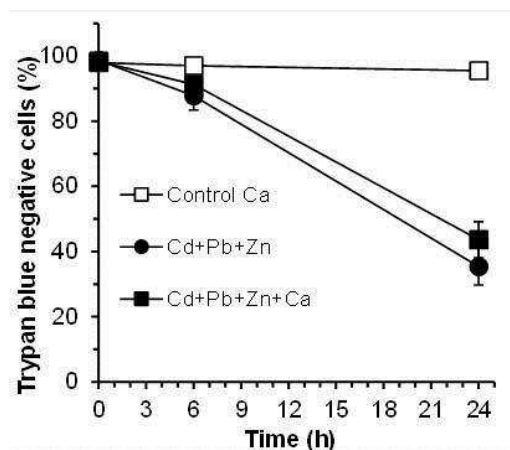


Figure 6 Loss of membrane integrity of the yeast *Pichia kudriavzevii* CCMA 0136 co-exposed to heavy metals and calcium ions. Cells were exposed to 0.5 mmol/l CaCl_2 in the absence (control Ca) or presence of metals mixture (Cd+Pb+Zn+Ca). Cells were also exposed to metals mixture in absence of Ca (Cd+Pb+Zn). Assessment of membrane integrity by microscopic determination of TB negative cells. The data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments

4 Discussion

In the present work, it was shown that the presence of energy source (glucose) enhanced the toxicity of a metal mixture constituted by Cd, Pb and Zn. In the presence of glucose, metals mixture induced a higher reduction of proliferation capacity (CFU) and membrane integrity (TB negative cells) (Fig. 1), probably as a consequence of the enhancement of metal accumulation. The study of the influence of glucose on the toxicity induced by each metal of the mixture did not show any increase of toxicity for 5 mg/l Zn, despite intracellular Zn accumulation to be a metabolic-dependent process in yeasts (White and Gadd 1987; Eide 2006). The fact that 25 mmol/l glucose did not enhance the toxicity of 5 mg/l Zn can be attributed to a high tolerance of the yeast *P. kudriavzevii* to this essential metal. In the case of Cd and Pb, a moderate and a high increase of toxicity, respectively, was observed (Fig. 2). The presence of a metabolizable

substrate, probably, enhanced Cd and Pb bioaccumulation which provoked an increase of toxic effects in yeast cells (Fig. 2). These observations are compatible with the possibility of Cd and Pb could be transported by the divalent metal transporter (DMT1). It is described that DMT1 mediates active transport of a broad range of divalent cations, including essential (for example, Fe and Mn) and non-essential (such as Cd and Pb) metals (Gunshin et al. 1997). Sodium azide (NaN_3) inhibits cytochrome oxidase and thus impairs mitochondrial function (Rikhvanov et al. 2002). The presence of NaN_3 alleviated the toxicity induced by metal mixture (Fig. 3). A similar effect was observed for Pb-induced toxicity (Fig. 4). The attenuation of metals mixture and Pb toxic effects due to the diminishing of energy production by glucose metabolization is in agreement with the possibility raised above about the uptake of metals by an active transport, which requires an energy source. In fact, cells treated with NaN_3 are restricted to non-oxidative pathways for ATP synthesis (Rikhvanov et al. 2002). Interestingly, yeast cells pre-incubated with 2-DOG and subsequently exposed to metal mixture displayed an increased susceptibility to toxic effects of the metals (Fig. 5). 2-DOG is a glucose analogue that is actively taken up by hexose transports and phosphorylated but not subsequently full metabolized (Ralser et al. 2008), originating cell ATP depletion. ATP-depleted cells can not actively accumulated Cd, Pb or Zn. Thus, it would be expected that this cells would be less sensitive to metals-mixture toxic effects. However, the opposite effect (high susceptibility) was observed (Fig 5), indicating that ATP depletion affected some cellular functions important for yeast survival under heavy metal stress.

It is known that Ca reduces the rates of intracellular Cd uptake (Norris and Kelly 1977), protects cell membrane from disruption by Cd (Borst-Pauwels 1981), conferring protection against Cd toxicity in *S. cerevisiae* (Kessels et al. 1985). Similarly, Ca inhibits Zn uptake (Fuhrmann and Rothstein 1968).

However, in the present work, no protection in the loss of membrane integrity metals-induced was observed (Fig. 6). Most likely, Ca had no effect on the toxicity induced by Pb (the main metal responsible by the toxicity of the mixture) in *P. kudriavzevii*. Similarly, the absence of Ca protection against Pb-induced toxicity was observed in *S. cerevisiae* (Soares et al. 2003).

In conclusion, the present work showed that the metabolic state of *P. kudriavzevii* yeast cells strongly influenced the susceptibility to heavy metals. Thus, the presence of glucose enhanced the loss of membrane integrity and proliferation capacity metals-induced. Impair of energy production, due to the presence of sodium azide, alleviated heavy metals toxicity. Ca ions did not protect against the toxicity induced by Cd or Pb ions. ATP-deprived yeast cells were more susceptible to heavy metals stress. This information about the influence of the metabolic state of yeast cells on metals sensitivity might be useful in further use of *P. kudriavzevii* in the bioremediation of different matrixes (soils, sediments or wastewaters) loaded with heavy metals.

Acknowledgments

The authors thank the FCT Strategic Project PEst-OE/EQB/LA0023/2013. Vanessa A. Mesquita gratefully acknowledges the grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank Dr. Rosane Freitas Schwan responsible from CCMA to offer the yeast strain.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

References

- Au C, Benedetto A, Aschner M (2008) Manganese transport in eukaryotes: The role of DMT1. *Neurotoxicology* 29:569-576
- Bannon DI, Portnoy ME, Olivi L, Lees PSJ, Culotta VC, Bressler JP (2002) Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295:978-984
- Borst-Pauwels GWFH (1981) Ion transport in yeast. *Biochim Biophys Acta* 650:88-127
- Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannon D (2004) Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *AnnNY AcadSci* 1012:142-152
- Collins YE, Stotzky G (1992) Heavy-metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay-minerals. *Appl Environ Microbiol* 58:1592-1600
- Eide DJ (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1763:711-722
- Fuhrmann G-F, Rothstein A (1968) The transport of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} into yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 163:325-330
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488
- Jensen LT, Ajua-Alemanji M, Culotta VC (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by *PHO84* also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem* 278:42036-42040
- Kessels BGF, Belde PJM, Borstpauwels G (1985) Protection of *Saccharomyces cerevisiae* against Cd^{2+} toxicity by Ca^{2+} . *J Gen Microbiol* 131:2533-2537
- Li Y, Wang H, Wang H, Yin F, Yang X, Hu Y (2014) Heavy metal pollution in vegetables grown in the vicinity of a multi-metal mining area in Gejiu,

- China: total concentrations, speciation analysis, and health risk. *Environ Sci Pollut Res* 21:12569-12582
- Liu XF, Supek F, Nelson N, Culotta VC (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *J Biol Chem* 272:11763-11769
- Machado MD, Soares EV, Soares HMVM (2010) Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: application to the treatment of real electroplating effluents containing multielements. *J Chem Technol Biotechnol* 85:1353-1360
- Millard PJ, Roth BL, Thi HPT, Yue ST, Haugland RP (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 63:2897-2905
- Norris PR, Kelly DP (1977) Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 99:317-324
- Pereira GVD, Miguel M, Ramos CL, Schwan RF (2012) Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Appl Environ Microbiol* 78:5395-5405
- Petti AA, Crutchfield CA, Rabinowitz JD, Botstein D (2011) Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E1089-E1098
- Ralser M, Wamelink MM, Struys EA, Joppich C, Krobitsch S, Jakobs C, Lehrach H (2008) A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17807-17811
- Rikhvanov EG, Varakina NN, Rusaleva TM, Rachenko EI, Voinikov VK (2002) Sodium azide reduces the thermotolerance of respiratively grown yeasts. *Curr Microbiol* 45:394-399
- Serrano R (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma-membrane ATPase. *FEBS Lett* 156:11-14

- Soares EV, Hebbelinck K, Soares HMVM (2003) Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can J Microbiol* 49:336-343
- Soares EV, Soares H (2012) Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 19:1066-1083
- Soares EV, Soares HMVM (2013) Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6667-6675
- Ubeda JF, Maldonado M, Briones AI, Gonzalez FJ (2014) Bio-prospecting of distillery yeasts as bio-control and bio-remediation agents. *Curr Microbiol* 68:594-602
- Waters BM, Eide DJ (2002) Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* 277:33749-33757
- White C, Gadd GM (1987) The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 133:727-737
- Zhao H, Eide D (1996a) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2454-2458
- Zhao H, Eide D (1996b) The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:23203-23210

BRENNAN, R. J.; SCHIESTL, R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeasts. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 356, n. 2, p. 171-178, Sept. 1996.

SOARES, E. V. et al. Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 6, p. 836-841, Mar. 2002.

SOARES, E. V.; HEBBELINCK, K.; SOARES, H. M. V. M. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, n. 5, p. 336-343, May 2003.