



RAYSSA PEREIRA VICENTIN

**REMOÇÃO E ALOCAÇÃO DE METAIS
PESADOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
NODULÍFERAS DA ESPÉCIE *Cupriavidus necator***

LAVRAS – MG

2017

RAYSSA PEREIRA VICENTIN

**REMOÇÃO E ALOCAÇÃO DE METAIS PESADOS POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NODULÍFERAS DA ESPÉCIE *Cupriavidus necator***

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.

Prof. Dr. Eduardo Alves

Orientador

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientadora

LAVRAS – MG

2017

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

Vicentin, Rayssa Pereira.

Remoção e alocação de metais pesados por bactérias diazotróficas
nodulíferas da espécie *Cupriavidus necator* / Rayssa Pereira Vicentin.

– Lavras : UFLA, 2016.

92 p. : il.

Orientador: Eduardo Alves.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Bioacumulação. 2. Toxicidade. 3. Isoterma. I. Alves, Eduardo.
II. Título.

RAYSSA PEREIRA VICENTIN

**REMOÇÃO E ALOCAÇÃO DE METAIS PESADOS POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NODULÍFERAS DA ESPÉCIE *Cupriavidus necator***

**REMOVAL AND ALLOCATION OF HEAVY METALS BY NODULE
DIAZOTROPHIC BACTERIA OF THE *Cupriavidus Necator* SPECIES**

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 obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 05 de setembro de 2016.

Dra. Adriana Maria de Aguiar Accioly	Embrapa/CNPMPF
Profa. Dra. Caroline Miranda Biondi	UFRPE
Profa. Dra. Zuy Maria Magriotis	UFLA
Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira	UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

LAVRAS – MG

2017

*Ao meu avô Ermínio Pereira, por todo seu carinho e dedicação, patriarca de
uma família unida, honesta e batalhadora.*

*Aos meus pais Erlani Pereira e Odorides Vicentin, por todo incentivo, carinho e
apoio nos momentos mais difíceis.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer, providenciar e realizar todas as coisas necessárias a execução deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento necessário à execução da tese.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por toda formação prestada, e aos Departamentos de Solos e Fitopatologia, pela viabilização para execução do projeto da tese.

Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Alves e minha coorientadora professora Dra. Fatima Maria de Souza Moreira, por toda orientação, paciência, dedicação e perseverança na condução do trabalho.

Aos funcionários da UFLA, em especial ao Manoel, Marlene e Rose pela solicitude, carinho e dedicação no trabalho.

Aos amigos Jessé Valentim dos Santos, Claudia R. G. Labory, Amanda Monique da Costa e Daniela Pedroso, pela contribuição direta nos trabalhos e escrita da tese.

Aos amigos Elaine Martins, Patrícia Freitas, Juliana Costa, Kaliane Araújo, Sílvia Maria, Wesley Rangel e Paula Rose pelo apoio, companheirismo e amizade devota dentro e fora do laboratório, e as demais amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo.

Aos amigos tão especiais e cativantes do laboratório de Microscopia Eletrônica: Silvino, Bruno, Tamara, Elisa, Aline, Eloisa, Janaira, Fabiano e Glauco.

Aos queridos amigos Maruzanete Melo, Camila Lage, Larissa Bitencourt, Camila Nicolli e Elizabeth Isaac, por proporcionar uma convivência tão fraterna e familiar quando morávamos juntos.

Aos amados amigos Manu, Nath e Todys, Arinaldo, Rosimar, Fábio e Diogo, pelos momentos incomparáveis de muita alegria e companheirismo.

Aos inúmeros amigos e educadores que, ao longo da minha vida, contribuíram na minha formação acadêmica.

A toda a minha família, por todo amor, formação moral e apoio sem os quais não teria conseguido.

E a toda sociedade brasileira.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Bactérias do gênero *Cupriavidus* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e tolerar altas concentrações de metais pesados. Neste trabalho, as estirpes de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659, UFLA 01-663 e UFLA 02-71 foram testadas quanto a sua capacidade de tolerar e remover cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) em meio líquido. Estudos com microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram realizados com o intuito de visualizar alterações de padrão de crescimento, produção de exopolissacarídeos e alocação de metais na biomassa das células. Foram realizados experimentos de cinética e isoterma de biossorção dos metais citados acima com células vivas e mortas da estirpe UFLA 01-659, assim como o ajuste dos dados aos modelos de Langmuir e Freundlich. O estudo da alocação dos metais na biomassa de células vivas em experimento de biossorção foi realizado por microscopia eletrônica de transmissão. Das estirpes testadas a estirpe de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 apresentou maiores valores de concentração mínima inibitória (de 5 mM de Cd, 4,95 mM de Cu e 14,66 mM de Zn) e remoção de metais (9,0, 4,6 e 3,2 mg L⁻¹ de Cd, Cu e Zn, respectivamente). A presença dos metais induziu a formação de biofilme e a diminuição do tamanho de células que se organizaram de forma agregada, com variação desse comportamento entre estirpes e metais. Em comparação à literatura, os índices alcançados com Cd foram os mais expressivos. A alocação dos metais removidos em meio de cultura se deu na membrana e na parede das células (todos os metais), e no interior da célula (Cu e Zn). As biossorções dos metais sofreram pouquíssima correlação com o tempo de incubação. O aumento da concentração de todos os metais induziu a um aumento em sua biossorção, com ajuste dos dados ao modelo de Freundlich (P<0,001). A biomassa de *C. necator* UFLA 01-659 realizou remoção de aproximadamente 52% de Cd em solução e menores valores para zinco e cobre (36 e 20%) nos experimentos de biossorção. Apenas a biossorção de cobre apresentou diferença entre células vivas e mortas, provavelmente em razão da alocação desse metal entre a parede e a membrana citoplasmática. Cobre e zinco também foram alocados no interior da célula, diferente de cádmio. Em razão da estirpe *C. necator* UFLA 01-659 apresentar alta capacidade de remoção dos metais Cd, Cu e Zn por meio da incorporação em sua biomassa e pela adsorção na parede e membrana plasmática em meio de cultura líquido e em experimentos de biossorção, esta estirpe pode ser considerada promissora na biorremediação de metais pesados *ex situ*.

Palavras-chave: UFLA 01-659. Cádmio. Cobre. Zinco. Biorremediação. Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

Bacteria of the *Cupriavidus* genus are capable of fixating atmospheric nitrogen and tolerate high concentrations of heavy metals. In this work, the strains of *Cupriavidus necator* UFLA 01-659, UFLA 01-663 and UFLA 02-71 were tested regarding their capacity for tolerating and removing cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc (Zn) in liquid medium. Studies with scan and transmission electron microscopy were conducted in order to visualize growth standards, exopolysaccharide production and allocation of metals in the cellular biomass. Kinetic and biosorption isotherm experiments were conducted with live and dead cells from strain UFLA 01-659 regarding the aforementioned metals. The data were adjusted to the Langmuir and Freundlich models. The metal allocation study with live biomass cells, in biosorption experiment, was conducted by transmission electron microscopy. Of the tested strains, UFLA 01-659 presented the highest values of minimum inhibiting concentration (of 5 mM of Cd, 4.95 mM of Cu and 14.66 mM of Zn) and metal removal (9.0, 4.6 and 3.2 mg L⁻¹ of Cd, Cu and Zn, respectively). The presence of metals induced the formation of biofilms and the decrease in cell size, which were organized in an aggregated manner, with variation of this behavior between strains and metals. In comparison to literature, the indexes reaches with Cd were the most expressive. The allocation of the metals removed in culture medium occurred in the membrane and cell walls (all metals), and in the interior of the cell (Cu and Zn). Metal biosorption had very few correlations with the time of incubation. The increase in the concentration of all metals induced an increase in its biosorption, with the data adjusted to the Freundlich model (P<0.001). The biomass of *C. necator* UFLA 01-659 removed approximately 52% of Cd in solution, and lower values for zinc and copper (36 and 20%) on the biosorption experiments. Only copper biosorption presented difference between live and dead cells, probably due to the allocation of this material between the wall and cytoplasmic membrane. Copper and zinc were also allocated in the interior of the cell, differently from cadmium. Due to the *C. necator* strain UFLA 01-659 presenting high capacity for the removal of the metals Cd, Cu and Zn by means of incorporation to its biomass and by absorption to the wall and plasmatic membrane in liquid culture medium. In biosorption experiments, this strain can be considered promising in the *ex situ* bioremediation of heavy metals.

Keywords: UFLA 01-659. Cadmium. Copper. Zinc. Bioremediation. Electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Ilustração dos dois principais mecanismos de remoção de metais pesado, a bioacumulação e a adsorção na superfície celular.....26

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Biomassa das estirpes bacterianas na ausência de metais (controle) e na presença dos metais Cd (1 mM), Cu e Zn (2mM) em meio de cultura LB líquido. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).54
- Figura 2 Metal removido do meio de cultura e teores de metais pesados na biomassa nas estirpes LMG 19424^T, UFLA 01-659, UFLA 01-663 e UFLA 02-71 cultivadas em meio de cultura LB líquido suplementado com Cd (1mM), Cu e Zn (2 mM).....56
- Figura 3 Eletromicrografia de varredura da biomassa microbiana das estirpes LMG 19424T (A, B, C e D) e UFLA 01-659 (E, F, G e H) em diferentes tratamentos do experimento de remoção de metais (A e E – controle, B e F – Cd, C e G – Cu, D e H - Zn).....58
- Figura 4 Eletromicrografia de varredura da biomassa das estirpes UFLA 01-663 (A, B, C e D) e UFLA 02-71 (E, F, G e H) em diferentes tratamentos do experimento de remoção de metais (A e E – controle, B e F – Cd, C e G –Cu, D e H - Zn).....59
- Figura 5 Eletromicrografia de transmissão da estirpe UFLA 01-659 após o experimento de remoção de metais nos tratamentos: controle

sem a presença de metais (A), Cd na concentração de 1 mM (B), Cu (C) e Zn (D) na concentração de 2 mM. Setas indicam os locais mais contrastados onde houve acúmulo dos metais.60

ARTIGO 2

- Figura 1 Cinética de bioadsorção de cádmio, cobre e zinco (100 mg L^{-1} em solução) por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* UFLA 01-569.....79
- Figura 2 Isotermas de bioadsorção de cádmio, cobre e zinco (representadas por gráfico de barras) e porcentagem de remoção de metais (representada por gráfico de linhas) por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 em diferentes concentrações dos metais em solução.80
- Figura 3 Dados originais e estimados pelo modelo de Freundlich da bioadsorção de cádmio, cobre e zinco por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 em função da concentração de equilíbrio dos metais.....83
- Figura 4 Eletromicrografia de transmissão de células da estirpe de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 submetidas a experimentos de bioadsorção de cádmio (B), cobre (C) e zinco (D), e o controle negativo (A) sem a presença de metais.....84

LISTAS DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Tolerância de cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) determinado pela concentração mínima inibitória (CMI) para o crescimento de bactérias resistentes a metais pesados relatados em artigos científicos.	23
---	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 Concentração mínima inibitória de cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) para o crescimento de diferentes estirpes de <i>Cupriavidus</i> spp. em meio de cultura LB líquido.....	53
---	----

ARTIGO 2

Tabela 1 Constantes do modelo de Freundlich para biossorção dos metais cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) por células vivas e mortas de <i>Cupriavidus necator</i> (UFLA 01-659).	82
--	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Metais pesados e o meio ambiente	19
2.2	Diversidade de bactérias encontradas em ambientes contaminados por metais pesados	20
2.3	Tolerância de bactérias à metais pesados	22
2.3.1	Mecanismos de resistência bacteriana a metais pesados	24
2.4	Remoção de metais pesados por bactérias e sua alocação	25
2.5	Tratamento <i>ex sito</i> de resíduos líquido contaminados por metais pesados por bactérias	28
2.6	Bactérias diazotróficas e a biorremediação	29
3	Considerações gerais	33
	REFERÊNCIAS	35
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	43
	ARTIGO 1 - TOLERÂNCIA E ACÚMULO DE Cd, Cu E Zn POR <i>Cupriavidus necator</i>	43
1	INTRODUÇÃO	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1	Estirpes utilizadas e obtenção de inóculo para os experimentos com meio líquido	48
2.2	Concentração mínima inibitória (CMI)	48
2.3	Remoção de metais pesados	49
2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
2.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	50
2.6	Análises estatísticas	51
3	RESULTADOS	52
3.1	Concentração mínima inibitória	52
3.2	Remoção de metais pesados	53
3.3	Microscopia eletrônica das células de <i>Cupriavidus</i> cultivadas com metais pesados	56
4	DISCUSSÃO	61
5	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ARTIGO 2 - BIODISSORÇÃO DE CÁDMIO, COBRE E ZINCO POR <i>Cupriavidus necator</i> (UFLA 01-659)	69
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73

2.1	Preparo do biossorbato	73
2.2	Cinética de biossorção de metais.....	73
2.3	Isotermas de biossorção de metais	73
2.4	Microscopia eletrônica de transmissão	74
2.5	Cálculos de dados e análise estatística	74
2.5.1	Cinética e isoterma de biossorção de metais pesados	74
2.5.2	Ajuste dos dados aos Modelos de Langmuir e Freundlich	75
3	RESULTADOS	77
3.1	Cinéticas de biossorção de metais pesados	77
3.2	Isoterma de biossorção de metais pesados e ajuste dos dados aos modelos de Langmuir e Freundlich	77
4	DISCUSSÃO.....	85
4.1	Capacidade de biossorção de metais e sua modelagem	85
4.2	Alocação de metais <i>versus</i> capacidade de biossorção	86
5	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados, quando em excesso, são poluentes encontrados em diversos ambientes naturais (solos, corpos d'água) e resíduos de sistemas de produção, e diversas técnicas que realizam a remoção e imobilização desses metais pesados são utilizadas na recuperação de ambientes contaminados.

Certas plantas e bactérias são empregadas no tratamento de solos e rejeitos de mineração contaminados por metais pesados (CHEN et al., 2014; LI; RAMAKRISHNA, 2011; SAADANI et al., 2016). A inoculação de bactérias em espécies vegetais, muitas vezes acarreta a uma maior eficiência na remoção de metais pesados por fitoextração, podendo reduzir o efeito tóxico dos metais na planta e desempenhar atividade de promoção de crescimento vegetal (DELL'AMICO; CAVALCA; ANDREONI, 2008; GOU; CHI, 2014; ONTAÑON et al., 2014).

Na simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN), além das vantagens citadas acima, ocorre a entrada de nitrogênio no sistema solo-planta (MAHIEU et al., 2011), o que pode levar a uma recuperação mais rápida de áreas contaminadas. Bactérias BFNN do gênero *Cupriavidus* são relatadas na literatura como resistentes a metais pesados e capazes de induzir a uma maior fitoextração de metais pesados por leguminosas (CHEN et al., 2008; KLONOWSKA et al., 2012; MONCHY et al., 2007).

As estirpes de BFNN da espécie *Cupriavidus necator* utilizadas neste trabalho foram obtidas em trabalhos prévios, a partir de nódulos das espécies vegetais *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala* inoculada com amostras de solo (não contaminado) coletadas próximas a *Sesbania virgata* (FLORENTINO et al., 2009; FLORENTINO et al., 2012; SILVA et al., 2012). Parte desses isolados apresentou considerável tolerância aos metais pesados

cádmio, cobre, chumbo e zinco em meio de cultura Luria-Bertani sólido, e alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) nos trabalhos de Ferreira et al. (2012).

Dentre as simbioses bactéria/leguminosas testadas por Ferreira et al. (2012), as simbioses entre a estirpe *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 com as espécies vegetais *Leucaena leucocephala* e *Mimosa pudica*, e a simbiose entre a estirpe UFLA 02-71 com *Mimosa caesalpinifolia* apresentaram maior sucesso (produção de biomassa na parte aérea e acúmulo de nitrogênio) em experimentos em casa de vegetação com substrato estéril não contaminado por metais pesados.

Posteriormente, essas estirpes de *Cupriavidus necator* (UFLA 01-659 e UFLA 02-71) em simbiose com as espécies vegetais citadas no parágrafo acima, foram estudadas em experimento com solo contaminado, apresentando resultados positivos na fitoextração de cádmio e zinco, e confirmando sua eficiência na FBN na presença de metais (FERREIRA et al., 2013). Outra vantagem dessas estirpes de *Cupriavidus necator* é sua capacidade de estabelecer simbiose com diversas espécies de leguminosas. Além das espécies vegetais já citadas ao longo do texto, também realizam simbiose com *Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata* (SILVA et al., 2012).

Contudo, não é conhecida a capacidade de remoção de metais pesados por essas estirpes de *Cupriavidus necator* sem a presença de plantas, e nem os mecanismos envolvidos neste processo. Tendo em vista que na literatura já foram apresentadas estirpes de bactérias do gênero *Cupriavidus* com alta capacidade de remoção de metais pesados isoladamente (CHEN et al., 2008; KLONOWSKA et al., 2012), estudos com a finalidade de esclarecer a contribuição direta dessas estirpes de *Cupriavidus necator* se fazem necessários para se estabelecer seu potencial para a biorremediação.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de remoção de cádmio, cobre e zinco por estirpes de *Cupriavidus necator* em meio

de cultura líquido e em experimentos de bio-sorção, assim como a alocação desses metais em sua biomassa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados e o meio ambiente

Os metais pesados apresentam ocorrência natural nos solos e a sua concentração, geralmente baixa, é determinada pelo material de origem e pelos fatores e processos de formação do solo, sendo bastante variável em diversas regiões. Por exemplo, os valores médios dos metais cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) encontrados naturalmente em Cuba, foram de 1,2, 83,7 e 90,7 mg kg⁻¹, respectivamente (ALFARO et al., 2015). Na Itália, foram registrados teores nos solos de até 0,65 mg kg⁻¹ de cádmio, 13 mg kg⁻¹ de Cu e 76 mg kg⁻¹ de Zn (BINI et al., 2011). No Brasil, no estado de Minas Gerais foram observados valores médios de 0,5, 30,9 e 13,1 mg kg⁻¹ desses mesmos elementos (CAIRES, 2009).

Frequentemente é relatado o incremento dos teores de metais pesados nos solos, em decorrência das atividades antrópicas como atividade de mineração e deposição de resíduos urbanos e industriais (HUANG; LIU, 2013; SANTOS et al., 2016). Em sistemas agrícolas, o reuso de águas servidas na irrigação, o uso de resíduos industriais, adubos e defensivos agrícolas, tais como fungicidas, são considerados como responsáveis pelo acúmulo de metais pesados nos solos (CHOPRA; PATHAK, 2013; MACIEL et al., 2013; MACKIE; MÜLLER; KANDELER, 2012).

Esses incrementos podem alcançar níveis tóxicos, prejudicando o desenvolvimento do ecossistema. No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) determina que áreas que apresentam um solo com valores superiores a 3 mg kg⁻¹ de Cd, 200 mg kg⁻¹ de Cu e 450 mg kg⁻¹ de Zn são declaradas como áreas contaminadas sob investigação e não devem ser utilizadas para a prática agrícola.

O acúmulo de metais pesados nos solos de determinados ambientes representa um importante risco de entrada ^{desses} elementos na cadeia trófica pela absorção por plantas e demais organismos vivos. Em concentrações elevadas os metais pesados causam toxidez às plantas (COUTINHO; BARBOSA, 2007) e podem diminuir ou até impedir o crescimento de microrganismos (CHANDER et al., 2001; CHIEN et al., 2008).

2.2 Diversidade de bactérias encontradas em ambientes contaminados por metais pesados

A contaminação do meio ambiente por metais pesados afeta a diversidade da comunidade bacteriana, mudando completamente a sua estrutura (GOLEBIEWSKI et al., 2014; PALMOROTH et al., 2007). Geralmente a diversidade de bactérias diminui quando há a entrada de metais pesados. Alguns grupos de bactérias parecem não ser afetados, enquanto outros podem até sofrer um aumento de sua abundância, em razão da tolerância a metais pesados que tais grupos apresentam e a diminuição da competição no habitat (BERG et al., 2012; SHEIK et al., 2012; VIGLIOTTA et al., 2016).

Em estudos de diversidade associada a solo contaminado com metais pesados (cobre, chumbo, zinco, cádmio e bário) verificou-se a ocorrência de bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Oxalobacter*, e do filo *Gammaproteobacteria*, e estas apresentaram alta similaridade genética com bactérias registradas em outros ambientes contaminados, indicando que há uma seleção por parte do ambiente a tais microrganismos (PALMOROTH et al., 2007).

O índice de diversidade de Shannon de bactérias da rizosfera de plantas de milho diminuiu com a adição dos metais pesados Cu e Zn. Dos grupos detectados no solo sem contaminação (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Flavobacterium*, *Cryseobacterium*, *Dyella*, *Rahnella*,

Enterobacter, *Agrobacterium* e *Serratia*), neste trabalho, apenas o grupo *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Pseudomonas* continuaram a ser observados no solo com contaminação, com diminuição da frequência de indivíduos (VIGLIOTTA et al., 2016).

A abundância relativa de vários grupos de bactérias foi afetada pela biodisponibilidade de cobre em amostras de solo. Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Cloroflexi e Planctomycetes apresentaram correlação negativa entre a sua abundância relativa e a biodisponibilidade de cobre, enquanto que Acidobacterias apresentaram um leve aumento. A abundância relativa dos grupos Actinobacteria e Firmicutes não apresentou correlação com a biodisponibilidade de cobre (BERG et al., 2012).

Em solos não contaminados foi verificada uma maior frequência do domínio Actinobacteria seguida do domínio Proteobacteria por pirosequenciamento, entretanto, quando esse solo apresentava contaminação por arsênio e cromo o inverso ocorria. A frequência dos demais domínios (Bacteroidetes, Acidobacteria, Firmicutes, Gemmatimodadetes e Planctomycetes) foi semelhante entre os solos com e sem contaminação (SHEIK et al., 2012).

Entretanto, em solos com alto nível de poluição de zinco e chumbo (até 2002 mg kg⁻¹ de Zn e 1378 mg kg⁻¹ de Pb) a riqueza de espécies e a diversidade da comunidade bacteriana registrada foi semelhante ou ligeiramente inferior ao relatado anteriormente, na literatura, em áreas não contaminadas (GOLEBIEWSKI et al., 2014). No entanto, foi verificada uma correlação negativa entre os teores de zinco biodisponível e a riqueza e diversidade de espécies. Cádmio, chumbo e cromo não apresentaram correlação com esses índices, e o autor atribuiu esse fato a menor concentração (Cd) e menor toxicidade (Pb e Cr) dos metais (GOLEBIEWSKI et al., 2014).

Embora os grupos que persistem em ambientes com metais pesados sejam variáveis em cada local, pode se dizer que os filos Acidobacterias, Firmicutes (em especial bactérias do gênero *Bacillus*) e Proteobacterias (gênero *Pseudomonas*) são os mais recorrentes. Actinobacterias apresentam variações controversas.

2.3 Tolerância de bactérias à metais pesados

Algumas bactérias apresentam capacidade de se desenvolver na presença de metais pesados, e podem ser ditas tolerantes quando a concentração mínima inibitória (CMI) de metais pesados para o seu crescimento é elevada (Tabela 1). Alguns metais são mais tóxicos que outros, e os níveis de CMI são bastante variados entre as espécies (GOU et al., 2015; LUO et al., 2011; PEPI et al., 2016).

Esses valores de CMI também sofrem variação em função da forma em que a bactéria é exposta ao metal (meio líquido ou sólido). Em geral, bactérias toleram maiores concentrações de metais pesados em meio de cultura sólido comparativamente ao líquido (ABSKHARON et al., 2010).

Na Tabela 1, são apresentados alguns valores de CMI para diferentes estirpes tolerantes a cádmio, cobre e zinco (metais utilizados nos experimentos da tese). Pode-se notar que cádmio é tolerado em menores concentrações e zinco é menos tóxico, salvo algumas exceções (NAVARRO-NOYA et al., 2012; PEPI et al., 2016).

A estirpe de *Burkholderia metalliresistens*, dentre as relatadas nos diversos artigos, foi a que apresentou maior valor de CMI em meio sólido, e esses índices foram bastante superiores aos já relatados na literatura. Entretanto, não há uma metodologia padrão para a determinação de CMI, e essas estirpes sofrem variação principalmente em função da composição do meio de cultura.

Tabela 1 - Tolerância de cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) determinado pela concentração mínima inibitória (CMI) para o crescimento de bactérias resistentes a metais pesados relatados em artigos científicos.

3

Gênero da estirpe	Meio de cultura/Consistência	CMI (mM)			Referência
		Cd	Cu	Zn	
<i>Bacillus</i> sp.	YEPG-NaCl/líquido	2,2	2,36	0,75	Pepi <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus</i> sp.	Ágar-nutriente/sólido	8	8	ND*	Kumari <i>et al.</i> (2015)
<i>Burkholderia metalliresistens</i>	SMN agar/sólido	17,79	2,36	38,24	Gou <i>et al.</i> (2015)
<i>Paenibacillus graminis</i> BR 35	PY/líquido	ND	4	2	Navarro-Noya <i>et al.</i> (2012)
<i>Azospirillum lipoferum</i> KYR B2	PY/líquido	ND	2	1	Navarro-Noya <i>et al.</i> (2012)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> KYR C5	PY/líquido	ND	2	4	Navarro-Noya <i>et al.</i> (2012)
<i>Cupriavidus necator</i>	LB/Sólido	5	12,5	12,5	Ferreira <i>et al.</i> (2012)
Diversos isolados de solo	Agar-nutrientes/sólido	1,78	12,59	12,24	Alam <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp.	BSM/sólido	ND	5	6	Li & Ramakrishna (2011)
<i>Serratia marcescens</i> LKR01	TLP/sólido	2	2	5	Luo <i>et al.</i> (2011)
<i>E. coli</i>	Meio mínimo com tris/líquido	4,45	1,57	10,7	Abskharon <i>et al.</i> (2010)
<i>E. coli</i>	Meio mínimo com tris/sólido	6	2,35	13	Abskharon <i>et al.</i> (2010)
<i>Arthrobacter</i> sp. YAH27	SLP/sólido	0,45	5,5	6,15	He <i>et al.</i> (2010)
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	LB/sólido	2,5	5,0	7,5	Chen <i>et al.</i> (2008)
<i>Alcaligenes eutrophus</i> X58441	TLP/Sólido	10	5	20	Abou-Shanab <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhizobium galegae</i> AY509214	TLP/Sólido	2,5	10	5	Abou-Shanab <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhizobium etli</i> AY460185	TLP/Sólido	5	10	5	Abou-Shanab <i>et al.</i> (2007)
Diferentes gêneros de rizóbio	YMA/Sólido	0,53	0,94	12,24	Matsuda <i>et al.</i> (2002)
<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Azorhizobium</i> sp.	YMA/Sólido	> 0,36	> 0,63	12,24	Trannin <i>et al.</i> (2001)

* ND - Não determinado.

Fonte: Dados do autora (2016).

2.3.1 Mecanismos de resistência bacteriana a metais pesados

A presença de metais pesados induz à respostas fisiológicas nas bactérias. Em estudos com estirpes resistentes a metais pesados têm-se observado vários mecanismos de resistência que envolvem a desintoxicação de metais. Esses mecanismos variam entre extrusão dos metais da célula e maior produção de compostos associados à resistência a metais pesados (polissacarídeos, proteínas e antioxidantes).

Em estudos com *Cupriavidus metallidurans* foi demonstrado que os genes de resistência a metais pesados apresentavam-se nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30, e estes codificam proteínas da membrana, transposases truncadas, proteínas de transferência conjugativa e muitas proteínas desconhecidas (MONCHY et al., 2007). Já, a desintoxicação de zinco realizada pela estirpe *Marinobacter adhaerens* HP15 se dá mediante a atuação de bombas de efluxo codificada por dois *operons* CzcCBA. Entretanto, esses *operons* não estão envolvidos na tolerância de cádmio e cobalto, indicando que os mecanismos de desintoxicação são variáveis em função do metal (STAHL et al., 2015).

O arranjo das células pode ser afetado pela presença de metais e a formação de biofilme também tem sido correlacionada. Em resposta à presença de cobre no meio de cultura, a estirpe *Pantoea agglomerans* YS19 realizou a formação de agregados de células e biofilme, e baixa frequência de células dispersas (YU et al., 2016).

Além da formação de biofilme, a produção de exopolissacarídeos apresentou papel importante na resistência de metais pesados apresentada por *Pseudomonas* sp. EJ01, comprovada por mutante da estirpe incapaz de produzir biofilme e por uma maior produção de exopolissacarídeos na presença de cádmio (CHIEN; LIN; WU, 2013).

A glutationa, um antioxidante hidrossolúvel, foi relacionada à tolerância de cádmio no trabalho de Bianucci, Fabra e Stella (2011), em que doses elevadas (30 μ M) desse metal induziram a um aumento de sua produção em estirpes de *Bradyrhizobium* sp (NLH25 e MOD31). Além disso, observou-se que quando a estirpe de *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 sofreu mutação que impedia a produção de glutationa, esta perdeu a capacidade de ser cultivada na presença de cádmio, indicando que esse composto é um importante agente envolvido na tolerância de cádmio.

Em experimentos com estirpe resistente (*Cupriavidus metallidurans* CH34) e sensível (*Pseudomonas putida* mt2) à cádmio, verificou-se uma maior produção de glutationa reduzida na estirpe *Cupriavidus metallidurans* CH34, assim como uma maior atividade da catalase dentre as enzimas antioxidantes estudadas (SHAMIM; REHMAN, 2015).

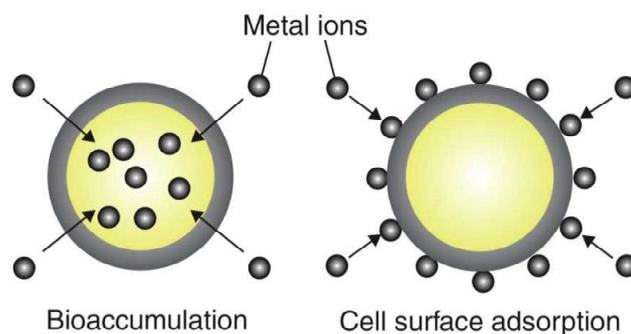
Sideróforos são outros compostos relacionados à tolerância de metais pesados. Uma maior sensibilidade a metais tóxicos foi observada em estirpes mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* que eram incapazes de produzir sideróforos. Além disso, foi observado um aumento na produção de sideróforos em razão da presença e aumento da concentração de cobre e níquel em meio de cultura (BRAUD et al., 2010). A indução da produção de sideróforos pela presença de cádmio também foi observada no cultivo da estirpe *Enterobacter* sp. EG16 (CHEN et al., 2016).

2.4 Remoção de metais pesados por bactérias e sua alocação

Estudos de bactérias resistentes a metais pesados têm sido realizados com o intuito de avaliar a sua utilização na biorremediação de ambientes contaminados, por meio da remoção de metais pesados. Na literatura, são relatados alguns trabalhos com bactérias com alta capacidade de remoção, realizada pela adsorção (ligação fraca entre metal e a face externa da biomassa

bacteriana) e incorporação do metal na célula bacteriana (bioacumulação) conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração dos dois principais mecanismos de remoção de metais pesado, a bioacumulação e a adsorção na superfície celular.



Fonte: Yang, Chen e Wang (2015).

Em experimentos de isotermas de biossorção submete-se a biomassa bacteriana a soluções com concentrações conhecidas de metais pesados e, após determinado tempo de incubação avalia-se a quantidade de metais removidos da solução, que pode se dar tanto por adsorção (células vivas e mortas) como por bioacumulação (células vivas). Tal técnica é importante para estabelecer condições ótimas de pH, agitação, concentração de sorbato e do metal em solução, e cinética.

A biossorção de mercúrio por bactérias marinhas variou em função da concentração inicial do metal alvo e da dosagem da biomassa, assim como do tipo e da concentração de outros íons (sódio, magnésio e potássio) presentes, alcançando índices de 133 mg g^{-1} de mercúrio na biomassa (DENG; WANG, 2012).

Bacillus cereus KTSMBNL43 apresentou capacidade máxima de remoção de 82% do cádmio presente inicialmente em solução (200 mg L^{-1}) em

isotermas de biossorção. A concentração inicial de cádmio, o pH da solução com metal, a temperatura de incubação e o tempo de contato da bactéria com o metal foram fatores que influenciaram na biossorção (ARIVALAGAN et al., 2014).

A importância da manutenção da estrutura das células tem sido demonstrada em experimentos com células vivas e mortas. *Burkholderia cepacia* e *Chryseomonas luteola* apresentam maior biossorção de Ni por células mortas, no entanto, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* não apresentam tal variação (AL-GHEETHI et al., 2014).

Experimentos com meio de cultura com a adição de metais pesados também têm sido realizados com o intuito de estudar o potencial de remoção de metais pesados por bactérias, concomitante a seu cultivo. O consórcio de várias bactérias resistentes a metais pesados isoladas de rio contaminado, por exemplo, apresentou capacidade de remoção de 450 mg g⁻¹ de cobre em sua biomassa seca (CARPIO et al., 2016).

Em meio de cultura suplementado com 400 mg L⁻¹ de chumbo, cádmio e níquel, separadamente, a estirpe de *Enterobacter cloacae* B1 foi capaz de remover 95,25 %, 64,17% e 36,77% dos respectivos metais citados (BANERJEE et al., 2015). Isolados de *Avena sativa* e *Plantago lanceolata* realizaram a remoção de 30% dos 500 mg L⁻¹ de cobre presente no meio de cultura líquido (ANDREAZZA et al., 2012).

Li e Ramakrishna (2011), estudando oito isolados de *Pseudomonas* sp. obtiveram altos índices de remoção dos metais pesados (Cu, Zn e Pb) em meio Luria-Bertani, com destaque para os isolados TLC 3-3.5-1 e TLC 6-6.5-4 que apresentaram a acumulação de 0,55 e 0,83 mg g⁻¹ de Cu, 15,88 e 2,48 mg g⁻¹ de Zn, e 44,71 e 75,05 mg g⁻¹ de Pb na biomassa seca de células.

Na remoção desses metais, ocorrem interações físicas, ligação a grupos químicos e complexação de metais intra e extracelularmente (BABU et al., 2015; CHEN et al., 2016). Os grupos carboxila e hidroxila foram os

responsáveis pela bioadsorção do cobre a biomassa de um consórcio de bactérias em meio de cultura (CARPIO et al., 2014). Na bioadsorção de Zn por consórcio de bactérias os grupos amina, carboxila, hidroxila e fosfato é que foram os responsáveis pela ligação com o metal (CARPIO et al., 2016), assim como na bioadsorção de cádmio por *Pseudomonas* sp. LKS06 (HUANG; LIU, 2013).

Nos trabalhos de Chen et al. (2016), foi observado que cerca de 70% do cádmio removido do meio de cultura pela estirpe *Enterobacter* sp. EG16 estaria acumulado intracelularmente, e que a adsorção e troca iônica contribuiriam com 11% cada, ao passo que apenas 9 % estariam complexados. Entretanto, em isotermas de bioadsorção, bactérias marinhas apresentaram cerca de 70% do mercúrio removido adsorvido na superfície da célula, e foi observado que grupos carboxílicos apresentavam um importante papel na ligação (DENG; WANG, 2012).

2.5 Tratamento *ex situ* de resíduos líquido contaminados por metais pesados por bactérias

A capacidade de remoção de metais pesados pela biomassa bacteriana tem sido utilizada no tratamento de água ou resíduos líquidos contaminados, e a eficiência desse processo tem sido observada, por meio de elevadas porcentagem de remoção de metais.

Em trabalhos com o tratamento de efluente secundário de estação de tratamento de esgoto foi obtida a remoção de 87,63% de cádmio, 74,61% de cobre, 58,32% de níquel, 61,9% de chumbo e 94,26% de zinco a partir da adição de 55 mg de biomassa seca de bactérias em 50 mL do efluente (AL-GHEETHI et al., 2014).

Utilizando diversas estirpes, Naz et al. (2016) obtiveram melhor eficiência na remoção de metais com a estirpe de *Pseudomonas* sp., em que foi

possível a remoção de 37% de chumbo, 32% de níquel, 29% de cobre e 32% de cromo presente em efluente.

No tratamento de água contaminada por metais em biorreatores, Carpio et al. (2014) obteve a remoção do cobre presente na água de forma mais eficiente na utilização de biofilme bacteriano associado com carvão ativado (47%) do que apenas com carvão ativado (17%).

No trabalho de Chatterjee, Bhattacharjee e Chandra (2010), a bactéria termofílica *Geobacillus thermodenitrificans* foi capaz de remover em melhor eficiência o ferro (43,94%), seguido do cromo (39,2%) e cádmio (35,88%), e em menor taxa o chumbo, cobre, cobalto e zinco em tratamento de águas residuais industriais, demonstrando que as taxas de remoção são diferenciadas entre os metais.

2.6 Bactérias diazotróficas e a biorremediação

Algumas bactérias denominadas diazotróficas são capazes de fixar nitrogênio atmosférico rompendo a ligação tripla entre átomos de nitrogênio com o complexo enzimático “nitrogenase” mediante gasto energético (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esse grupo de bactérias também pode ser encontrado em ambientes contaminados com metais pesados (BAHAR; MEGHARAJ; NAIDU, 2016; DASHTI et al., 2015; MOREIRA et al., 2008).

Ambientes contaminados geralmente apresentam uma baixa densidade de microrganismos (OLIVEIRA et al., 2010) e mudanças na estrutura da comunidade bacteriana associadas ou não a diminuição da riqueza de espécies (BERG et al., 2012; GOLEBIEWSKI et al., 2014; SHEIK et al., 2012). Dessa forma, bactérias com várias funções ecológicas podem facilitar o processo de reabilitação e biorremediação de áreas contaminadas, ou no tratamento de resíduos.

De um modo geral, a contaminação dos solos com metais pesados acarretam na diminuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN), entretanto algumas bactérias apresentam a capacidade de fixar nitrogênio em altas taxas mesmo em situação de contaminação (FERREIRA et al., 2013; KUPPUSAMY et al., 2016).

Independente da presença de plantas, algumas bactérias fixam nitrogênio livremente nos solos. A estirpe *Trabulsiella* sp. MTS-6 se mostrou capaz de fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfatos em ensaios em meio de cultura, e é o primeiro relato desse gênero com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos na presença da contaminação de metais pesados cádmio, cobre, zinco e chumbo (KUPPUSAMY et al., 2016). Esse gênero foi relatado anteriormente por Chou et al. (2007), isolando bactérias do intestino de cupins, sem citar relação com a fixação biológica de nitrogênio.

Diversas classes de bactérias diazotróficas, entre elas, Gammaproteobacteria (*Serratia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*), Firmicutes (*Bacillus*) e Actinobacteria (*Cellulosimicrobium*, *Brevibacterium*) foram isoladas de solo multicontaminado por metais pesados, utilizando meio semissólido sem nitrogênio, na presença de mercúrio (OLIVEIRA et al., 2010), demonstrando que há uma considerável diversidade de bactérias diazotróficas em ambientes contaminados.

A tolerância a metais pesados também é observada por outro grupo de bactérias diazotróficas denominadas *associativas* (que se desenvolvem na rizosfera de plantas). Isolados do gênero *Azospirillum* foram obtidos de solo e raízes de gramíneas de ambiente contaminado por indústria processadora de zinco e apresentaram alta tolerância a cádmio e zinco *in vitro* (MOREIRA et al., 2008). Em outro trabalho, isolado de bactéria diazotrófica associativa (*Herbaspirillum* sp. GW103) apresentou alta tolerância a arsênio, cobre, zinco e

chumbo, com potencial de aumento da taxa de lixiviação de cobre em solo contaminado em tratamento *ex situ* (GOVARTHANA et al., 2014).

Outro grupo de bactérias diazotróficas é capaz de estabelecer simbiose com leguminosas, formando estruturas nas raízes das plantas denominadas de nódulos. Nesse sistema, a planta consegue aproveitar quase todo o nitrogênio fixado pela bactéria. Tais bactérias são denominadas bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN) segundo Moreira e Siqueira (2006).

A utilização dessa simbiose leguminosa/bactéria na fitorremediação tem a vantagem de elevar os teores de nitrogênio do solo (FERREIRA et al., 2013). Entretanto, é imprescindível que os organismos envolvidos na simbiose tenham pleno desenvolvimento em ambientes contaminados.

BFNN das espécies *Cupriavidus taiwanensis* e *Rhizobium mesoamericanum* foram isolados de *Mimosa pudica* em ocorrência espontânea em solo naturalmente rico nos metais pesados manganês, ferro, níquel, cromo e cobalto. Dentre as estirpes avaliadas pelos autores, as estirpes de *Cupriavidus taiwanensis* apresentaram maior tolerância aos metais cádmio, zinco e níquel que as do gênero *Rhizobium* (KLONOWSKA et al., 2012).

Em experimento com *Lolium multiflorum* Lam. e *Glycine max* (L.), a inoculação da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. YL-6 diminuiu a toxicidade de cádmio nas plantas e induziu a uma maior acumulação do metal em *L. multiflorum* e menor em *G. max* (GOU; CHI, 2014). Já, a inoculação da estirpe *Cupriavidus taiwanensis* TJ208 induziu a uma maior eficiência na absorção dos metais cádmio, cobre e chumbo por plantas de *Mimosa pudica* (CHEN et al., 2008).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Bactérias tolerantes a metais pesados podem apresentar potencial para a biorremediação pela remoção de metais pesados em práticas *ex situ*. Entretanto, a variação que ocorre entre diferentes estirpes quanto ao potencial de remoção de metais pesados por sua biomassa, assim como a capacidade de remoção de cada metal pesado em particular, faz necessário o estudo aprofundado dos processos de bioremediação por bactérias para que o mesmo se torne viável e eficiente.

Estirpes de bactérias diazotróficas resistentes a metais pesados, em especial o gênero *Cupriavidus*, são organismos promissores no processo de biorremediação, em razão da sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, promover o crescimento de plantas e induzir o aumento da fitoextração de metais pesados pelas plantas.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I.; BERKUM, P.; ANGLE, J. S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 360-367, June 2007.
- ABSKHARON, R. N. N. et al. The role of antioxidants enzymes of *E. coli* ASU3, a tolerant strain to heavy metals toxicity, in combating oxidative stress of copper. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 241-247, Feb. 2010.
- ALAM, M. Z.; ALUMAD, S.; MALIK, A. Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 178, n. 1-4, p. 281-291, July 2011.
- ALFARO, M. R. et al. Background concentrations and reference values for heavy metals in soil of Cuba. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 1, p. 4198-4207, Jan. 2015.
- AL-GHEETHI, A. A. S. et al. Biosorption of heavy metals and cephalexin from secondary effluents by tolerant bacteria. **Clean Technologies Environmental Policy**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 137-148, Jan. 2014.
- ANDREAZZA, R. et al. Characterization of copper-resistant rhizosphere bacteria from *Avena sativa* and *Plantago lanceolata* for copper bioreduction and biosorption. **Biological Trace Element Research**, London, v. 146, n. 1, p. 107-115, Apr. 2012.
- ARIVALAGAN, P. et al. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 71, p. 728-735, Oct. 2014.
- BABU, A. G. et al. Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil. **Journal of Environmental Management**, London, v. 151, p. 160-166, Mar. 2015.
- BAHAR, M. M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Oxidation of arsenite to arsenate in growth medium and groundwater using a novel arsenite-oxidizing diazotrophic bacterium isolated from soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Dordrecht, v. 106, p. 178-182, Jan. 2016.

BANERJEE, G. et al. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. **Water Air Soil Pollut**, Oxford, v. 226, p. 91-99, Apr. 2015.

BERG, J. et al. Selection for Cu-tolerant bacterial communities with altered composition, but unaltered richness, via long-term Cu exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 20, p. 7438-7446, Oct. 2012.

BIANUCCI, E.; FABRA, A.; STELLA, C. Cadmium accumulation and tolerance in *Bradyrhizobium* spp. (Peanut microsymbionts). **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 1, p. 96-100, Jan. 2011.

BINI, C. et al. Background levels of trace elements and soil geochemistry at regional level in NE Italy. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 109, n. 1-3, p. 125-133, Apr. 2011.

BRAUD, A. et al. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. **Environmental Microbiology Reports**, Bimonthly, v. 2, n. 3, p. 419-425, June 2010.

CAIRES, S. M. **Determinação dos teores naturais de metais pesados em solos do Estado de Minas Gerais como subsídio ao estabelecimento de Valores de Referência de Qualidade**. 2009. 304 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CARPIO, I. E. M. et al. Biostimulation of metal-resistant microbial consortium to remove zinc from contaminated environments. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 550, p. 670-675, Apr. 2016.

CARPIO, I. E. M. et al. Copper removal using a heavy-metal resistant microbial consortium in a fixed-bed reactor. **Water Research**, New York, v. 62, p. 156-166, Oct. 2014.

CHANDER, K. et al. Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, . n. 4, p. 241-247, 2001.

CHATTERJEE, S. K.; BHATTACHARJEE, I.; CHANDRA, G. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, n. 1-3, p. 117-125, Mar. 2010.

CHEN, L. et al. Comparative study of metal resistance and accumulation of lead and zinc in two poplars. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 151, n. 4, p. 390-405, Aug. 2014.

CHEN, W. M. et al. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 2-3, p. 364-371, Mar. 2008.

CHEN, Y. et al. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp. Strain EG16 under cadmium stress. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, n. 6, p. 1734-1744, Mar. 2016.

CHIEN, C. C.; LIN, B. C.; WU, C. H. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 78, p. 132-137, Sept. 2013.

CHIEN, C. et al. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 20, n. 3, p. 359-363, 2008.

CHOPRA, A. K.; PATHAK, C. Enrichment and translocation of heavy metals in soil and *Spinacea oleracea* grown in sugar mill effluent irrigated soil. **Sugar Tech**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 77-83, Mar. 2013.

CHOU, J. H. et al. *Trabulsiella odontotermitis* sp. Nov., isolated from the gut of the termite *Odontotermes formosanus* Shiraki. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 4, 696-700, Apr. 2007.

COUTINHO, H. D.; BARBORA, A. R. Fitorremediação: considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, Lisboa, v. 15, n. 1, p. 103-117, June 2007.

DASHTI, N. et al. Olive-pomace harbors bacteria with the potencial for hydrocarbon-biodegradation, nitrogen-fixation and mercury-resistance: promising material for waste-oil-bioremediation. **Journal of Environmental Management**, London, v. 155, p. 49-57, May 2015.

DELL'AMICO, E.; CAVALCA, L.; ANDREONI, V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 1, p. 74-84, Jan. 2008.

DENG, X.; WANG, P. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. **Bioresource Technology**, Barking, v. 121, p. 342-347, Oct. 2012.

FERREIRA, P. A. A. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 85-95, jan. 2012.

FERREIRA, P. A. A. et al. Leguminous plants inoculated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soil amended with calcium silicate. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 2055-2066, Nov. 2013.

FLORENTINO, L. A. et al. Physiological and symbiotic diversity of *Cupriavidus necator* strains isolated from nodules of Leguminosae species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 4, p. 247-258, jul./ago. 2012.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soil but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, set./out. 2009.

GASIM, M. B. et al. Flux of nutrients and heavy metals from the Melai River sub-catchment into Lake Chini, Pekan, Pahang, Malaysia. **Environmental Earth Sciences**, Heidelberg, v. 68, n. 3, p. 889-897, May 2013.

GOŁĘBIEWSKI, M. et al. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 67, n. 3, p. 635-647, Apr. 2014.

GOU, J. K. et al. *Burkholderia metalliresistens* sp. Nov., a multiple metal-resistant and phosphate-solubilizing species isolated from heavy metal-polluted soil in Southeast China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 107, n. 6, p. 1591-1598, June 2015.

GOU, J.; CHI, J. Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. And *Glycine max* (L.) Merr. In Cd-contaminated soil. **Plant Soil**, The Hague, v. 375, n. 1, p. 205-214, Feb. 2014.

GOVARTHANAN, M. et al. Bioleaching characteristics, influencing factors of Cu solubilization and survival of *Herbaspirillum* sp. GW103 in Cu contaminated mine soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 109, p. 42-48, Aug. 2014.

HE, L. Y. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 49-55, Jan. 2010.

HUANG, W.; LIU, Z. M. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm Kinetic characteristic and mechanism studies. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, Amsterdam, v. 105, p. 113-119, May 2013.

KLONOWSKA, A. et al. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metals-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 618-635, Sept. 2012.

KUMARI, D. et al. Multiple metal-resistant bacteria and fungi from acidic copper mine tailings of Xinjiang, China. **Environmental Earth Sciences**, Heidelberg, v. 74, n. 4, p. 3113-3121, Aug. 2015.

KUPPUSAMY, S. et al. Kinetics of PAH degradation by a new acid-metal-tolerant *Trabulsiella* isolated from the MGP site soil and identification of its potential to fix nitrogen and solubilize phosphorous. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 307, p. 99-107, Apr. 2016.

LI, K.; RAMAKRISHNA, W. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 189, n. 1-2, p. 531-539, May 2011.

LOPES, G. et al. Binding intensity and metal partitioning in soils affected by mining and smelting activities in Minas Gerais, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, Bimonthly, v. 22, n. 17, p. 13442-13452, Sept. 2015.

LUO, S. L. et al. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. **Chemosphere**, Oxford, v. 85, n. 7, p. 1130-1138, Nov. 2011.

MACIEL, C. A. C. et al. Distribuição espacial de cobre, zinco e níquel em um Latossolos após quinze anos da aplicação de lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 4, p. 528-537, jan. 2013.

MACKIE, K. A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of copper in vineyards - a mini review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 167, p. 16-26, Aug. 2012.

MAHIEU, S. et al. *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, and efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailing highly contaminated by Zn, Pb and Cd. **Plant Soil**, The Hague, v. 342, n. 1, p. 405-417, May 2011.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 343-355, mar. 2002.

MONCHY, S. et al. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 20, p. 7417-7425, Oct. 2007.

MOREIRA, F. M. S. et al. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p.749-761, dez. 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: _____. **Microbiologia e bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora da UFLA, 2006. Cap. 9, p. 449-542.

NAVARRO-NOYA, Y. E. et al. Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 52-60, Nov. 2012.

NAZ, T. et al. Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas* species isolated from sugar industry. **Toxicology and Industrial Health**, Princeton, v. 32, n. 9, p. 1619-1627, Sept. 2016.

OLIVEIRA, A. et al. Mercury tolerant diazotrophic bacteria in a long-term contaminated soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 154, n. 3-4, p. 359-363, Jan. 2010.

ONTAÑÓN, O. M. et al. Rhizoremediation of phenol and chromio by the synergistic combination of a native bacteria strain and *Brassica napus* hairy roots. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 88, p. 192-198, Mar. 2014.

PALMOROTH, M. R. T. et al. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, n. 6, p. 769-782, Dec. 2007.

PENHA, H. G. V. et al. Nutrient accumulation and viability and crop yields following long-term application of pig slurry in a Brazilian Cerrado soil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 101, n. 2, p. 259-269, Mar. 2015.

PEPI, M. et al. A *Bacillus* sp. Isolated from sediments of the Sarno River mouth, Gulf of Naples (Italy) produces a biofilm biosorbing Pb(II). **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 562, p. 588-595, Aug. 2016.

SAADANI, O. et al. *In situ* phytostabilisation capacity of three legumes and their associated plant growth promoting bacteria (PGPBs) in mine tailing of northern Tunisia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 130, p. 263-269, Aug. 2016.

SANTOS, J. V. et al. Biological attributes of rehabilitated soil contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, Bimonthly, v. 23, n. 7, p. 6735-6748, Apr. 2016.

SHAMIM, S.; REHMAN, A. Antioxidative enzyme profiling and biosorption ability of *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2 under cadmium stress. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 55, n. 3, p. 374-381, Mar. 2015.

SHEIK, C. S. et al. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e40059, 2012.

SILVA, K. et al. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 3, p. 175-182, May 2012.

STAHL, A. et al. *Marinobacter adhaerens* HP15 harbors two CzcCBA efflux pumps involved in zinc detoxification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 108, n. 3, p. 649-658, Sept. 2015.

TRANNIN, I. C. B. et al. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre “*in vitro*”. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 305-316, abr./jun. 2001.

VIGLIOTTA, G. et al. Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize. **Journal of Environmental Management**, London, v. 179, p. 93-102, Sept. 2016.

YANG, T.; CHEN, M. L.; WANG, J. H. Genetic and chemical modification of cells for selective separation and analysis of heavy metals of biological or environmental. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 66, p. 90-102, Mar. 2015.

YU, X. et al. Indole affects the formation of multicellular aggregate structures in *Pantoea agglomerans* YS19. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 62, n. 1, p. 31-37, 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - TOLERÂNCIA E ACÚMULO DE CD, CU E ZN POR
Cupriavidus necator

VICENTIN, Rayssa Pereira; VALENTIM DOS SANTOS, Jessé; LABORY,
Cláudia Regina Gontijo; DA COSTA, Amanda Monique; MOREIRA, Fatima
Maria de Souza; ALVES, Eduardo

ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

Resultados preliminares em experimentos *in vitro* com solos multicontaminados e meio sólido indicaram que bactérias diazotróficas nodulíferas do gênero *Cupriavidus* são promissoras na fitorremediação de ambientes contaminados devido a sua simbiose com leguminosas e tolerância a metais. Desta forma, estirpes de *Cupriavidus spp.* (LMG 19424^T, UFLA 01-659, UFLA 01-663 e UFLA 02-71) foram testadas quanto a sua capacidade de tolerar e bioacumular cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) em meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido. Alterações no padrão de crescimento das estirpes de *Cupriavidus*, na presença ou ausência de metais foram avaliadas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura e o estudo da alocação dos metais foi realizado por microscopia eletrônica de transmissão, tendo como intuito estudar os mecanismos de biorremediação. A estirpe UFLA 01-659 apresentou maior tolerância (concentração mínima inibitória - CMI de 5 mM de Cd, 4,95 mM de Cu e 14,66 mM de Zn) e taxa de remoção (9,0, 4,6 e 3,2 mg L⁻¹ de Cd, Cu e Zn, respectivamente) dos metais testados, com atividade mais expressiva em relação ao Cd. A eficiência da estirpe UFLA 01-659 em remover os metais está associada a sua alta capacidade de produção de biomassa e/ou a maiores teores dos metais absorvidos na biomassa. Observou-se que em resposta a presença de metais no meio de cultura líquido, as bactérias apresentaram produção de exopolissacarídeos e células diminutas e agregadas. Entretanto, estas respostas foram diferenciadas para as estirpes e para os metais. Em relação à alocação, todos os metais foram adsorvidos na membrana e na parede das células, enquanto que a complexação intracelularmente foi observada apenas para os metais Cu e Zn. Estes resultados indicam o potencial de *C. necator* UFLA 01-659 para a remediação em áreas com excesso de Cd, Cu e Zn.

Palavras chaves: metais pesados, microscopia eletrônica, bactéria diazotrófica, biorremediação, mecanismos de tolerância.

1 INTRODUÇÃO

Em ambientes contaminados por metais pesados são encontradas diversas bactérias que apresentam tolerância a níveis altos de metais pesados *in vitro* e elevada capacidade de remoção destes metais (Andreazza *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2008). Tais capacidades são expressas mediante a realização de diferentes mecanismos como bombas de efluxo, produção de tions e atividade enzimática (Zoropogui *et al.*, 2008; Hynninen *et al.*, 2009), entretanto estes mecanismos variam em função das estirpes e do metal avaliado.

Um dos mecanismos mais importantes de tolerância de metais pesados é a atividade de bombas de efluxo, que permitem às células a extrusão de metais absorvidos, mediante a decomposição de ATP. Wang *et al.* (2015) sequenciou o genoma de *Cupriavidus gilardii* CR3 (bactéria resistente a múltiplos metais) e identificou diversos *operons* que codificam bombas de efluxo, tais como *czc* (Cd^{2+} , Zn^{2+}) e *cus* (Cu^+ , Ag^+) ligados a resistência de metais pesados.

A variação de comportamento de estirpes de um mesmo gênero foi observada por Bianucci *et al.* (2011) que verificou que nem todas as quatro estirpes de *Bradyrhizobium* por eles avaliadas foram capazes de acumular cádmio em sua biomassa, e que as estirpes que apresentaram maior tolerância e teor de metal na biomassa apresentaram incremento nos valores de glutatona (antioxidante) na presença do metal.

A formação de biofilme, outro mecanismo vinculado a bioacumulação, foi demonstrado no trabalho de Chien *et al.* (2013), em que a estirpe EJ01 (*Pseudomonas* sp.) apresentou maior capacidade de remoção dos metais cádmio e níquel que a estirpe mutante m-3055 que possuía uma capacidade deficiente de formação de biofilme.

Além da remoção direta dos metais pela adsorção e incorporação em sua biomassa, algumas bactérias podem apresentar uma contribuição indireta através

da sua relação com plantas cultivadas em ambientes contaminados. Estirpes de *Pseudomonas* inoculadas em plantas de girassol e milho, por exemplo, diminuíram a toxicidade de cobre e induziram a uma maior fitoextração deste metal em ambas as plantas (Li & Ramakrishna, 2011). A maior absorção de metais pesados em plantas inoculadas com *Pseudomonas koreensis* foi atribuída à solubilização dos metais na rizosfera (Babu *et al.*, 2015).

Também são relatadas tolerâncias de bactérias diazotróficas a metais pesados, que em simbiose com leguminosas podem auxiliar tais plantas no estabelecimento em solos contaminados, favorecendo o aumento dos teores de nitrogênio em tais ambientes (Mahieu *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013).

O gênero *Cupriavidus* tem apresentado resultados promissores em diversos trabalhos que estudaram a contribuição de bactérias diazotróficas nodulíferas no processo de fitoextração de metais tóxicos. Klonowska *et al.* (2012) obteve isolados de *Cupriavidus taiwanensis* que apresentaram alta tolerância a níquel, zinco e cromo e elevada eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com *Mimosa pudica*. Em outro trabalho, a inoculação da estirpe TJ208 (*Cupriavidus taiwanensis*) aumentou a eficiência de biossorção de cádmio, cobre e chumbo por plantas de *Mimosa pudica* (Chen *et al.*, 2008).

As estirpes de *Cupriavidus necator* UFLA 01- 659, UFLA 01- 663 e UFLA 02- 71 (estudadas neste trabalho) apresentaram em trabalhos anteriores uma tolerância elevada de 2,5, 10, 10 e 5 mM de cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) em meio sólido, respectivamente, e considerável eficiência da fixação biológica de nitrogênio em simbiose com as espécies de leguminosas: *Mimosa pudica*, *Mimosa caesalpinifolia* e *Leucaena leucocephala* (Ferreira *et al.*, 2012). Em experimentos com solo multicontaminado, a estirpe UFLA 01- 659 conferiu aumento no conteúdo de nitrogênio da parte aérea de *Mimosa*

pudica e *Leucaena leucocephala*, e a estirpe UFLA 02-71 em *Mimosa caesalpinifolia*, contribuindo na recuperação deste solo (Ferreira *et al*, 2013).

Tendo em vista os resultados promissores das estirpes de *C. necator*, UFLA 01-659, UFLA 01-663 e UFLA 02-71, o objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância e a capacidade de remoção dos metais pesados Cd, Cu e Zn em meio líquido, assim como investigar a alocação de tais metais por microscopia eletrônica, contribuindo para o conhecimento dos mecanismos de tolerância e remoção de metais pesados por bactérias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes utilizadas e obtenção de inóculo para os experimentos com meio líquido

No presente estudo foram utilizadas as estirpes UFLA 01-659, UFLA 01-663 e UFLA 02-71, da espécie *Cupriavidus necator* (Silva *et al.*, 2012), além da estirpe LMG 19424^T, da espécie *Cupriavidus taiwanensis* (Vandamme & Coenye, 2004), como isolado tipo do gênero. Todas as estirpes estudadas encontram-se preservadas por liofilização na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo do departamento de Ciência do Solo/UFLA.

Para obtenção do inóculo, as estirpes foram cultivadas em meio Luria Bertani - LB (triptona 10g L⁻¹, extrato de levedura 5g L⁻¹, e NaCl 5g L⁻¹) sólido (Sambrook *et al.*, 1989) por 2 dias à 28°C. Posteriormente as células foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) estéril. A concentração de células foi padronizada a densidade óptica (DO) de 45% de transmitância, que corresponde a uma densidade de 6x10⁸ UFC mL⁻¹. Para os experimentos de concentração mínima inibitória e remoção de metais foram adotados a proporção de um mL de inóculo para 100 mL de meio de cultura líquido.

2.2 Concentração mínima inibitória (CMI)

As estirpes foram cultivadas em 10 mL de meio de cultura LB líquido, com pH 6, sob agitação horizontal de 110 rpm, incubadas à 28°C por 4 dias, tempo este que corresponde a fase estacionária segundo Ferreira (2011). Previamente este meio de cultura foi suplementado com doses crescentes dos metais Cd (0-5mM), Cu (0-5mM) e Zn (0-15mM), em três repetições. Foram utilizados como fontes dos metais os sais: sulfato de cádmio (CdSO₄.8H₂O), sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) e sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O).

Para evitar a precipitação dos metais, foi acrescido TRIS ao meio de cultura na concentração de 6,0 g L⁻¹ (Mergey *et al.*, 1985). Ao final do período

de incubação, a quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de meio líquido foi realizada pelo método de microgota (Herigstad *et al.*, 2001).

2.3 Remoção de metais pesados

Neste experimento, as estirpes foram cultivadas em 80 mL de meio LB líquido, nas mesmas condições de pH, inoculação, temperatura, agitação e tempo de incubação adotados para determinação da CMI. O meio de cultura foi suplementado com Cd na concentração de 1 mM, e com Cu e Zn na concentração de 2 mM, separadamente, que correspondem a 112,41, 127,09 e 130,76 mg L⁻¹, respectivamente. Estas concentrações foram estabelecidas com base nos resultados obtidos nos experimentos de CMI, adotando as concentrações de metais em que todas as estirpes apresentavam capacidade de serem cultivadas. As estirpes também foram cultivadas em meio de cultura sem a presença dos metais, utilizadas como controle negativo. Todos os tratamentos foram realizados em três repetições.

Após o período de incubação, o caldo bacteriano foi centrifugado por dez minutos a 10000 rpm, descartado o sobrenadante e realizada duas lavagens do "pellet" em tampão fosfato de sódio (8 mM de Na₂HPO₄.12H₂O; 1,9 mM de NaH₂PO₄.2H₂O; 8 gramas de NaCl; pH 7,3) conforme Moreira *et al.* (1993) e Pot *et al.* (1994). A biomassa bacteriana obtida foi pesada e submetida à digestão por via úmida com ácido nítrico e perclórico (2:1), e posteriormente foi determinada a concentração de cada metal no extrato de digestão em espectrofotômetro de absorção atômica. À partir desta determinação, foram calculados a taxa de remoção de metal do meio de cultura (mg L⁻¹) e o teor do metal na biomassa (mg g⁻¹).

2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de suspensões bacterianas do experimento de remoção de metais pesados foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Anteriormente ao protocolo de preparo de amostras, foram depositados e espalhados 10 µL de poli-L-lisina (0,1%) sobre lamínulas de vidro, para que as bactérias aderissem sobre sua superfície. Após a secagem da poli-L-lisina, foram pipetados 20 µL de suspensão bacteriana sobre as lamínulas e postas para secar novamente.

Seguiu-se então o protocolo para preparo de amostra com fixação em Karnovsky por 36 horas, lavagem com tampão cacodilato (0,02M), pós-fixação com tetróxido de ósmio por uma hora, e desidratação em gradiente de acetona, seguida de secagem em aparelho de ponto crítico. Foi realizada metalização com ouro para aumentar a condutividade elétrica das amostras. As micrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XPV.

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Foi retirado um mL do caldo bacteriano (apenas da estirpe UFLA 01-659) dos tratamentos do experimento de remoção de metais e centrifugados por 10 minutos em 10000 rpm em microcentrífuga e descartado o sobrenadante. O "pellet" obtido foi fixado em solução de Karnovsky, centrifugado novamente e polimerizado com agarose (2%) para facilitar o preparo. Cubos de agarose contendo o pellet foram retirados e seguiu-se com lavagens em tampão cacodilato e pós-fixação em tetróxido de ósmio por duas horas, e acetato de uranila (0,5%) por 12 horas. Em seguida, realizou-se a desidratação em gradiente de acetona (25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95 e 100%), e infiltração em resina SPURR, finalizando com emblocamento. Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrotomo, seguida por contrastação com acetato de uranila e

citrato de chumbo. A visualização foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 (120kV).

2.6 Análises estatísticas

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o software R. Os valores de CMI foram preditos por equações de regressão das UFC em função de doses crescentes de cada um dos metais ($P < 0,05$). Os dados de peso de células, taxa de remoção de metais e teores de metais na biomassa foram avaliados em arranjo fatorial (4x4), sendo o primeiro fator composto pelas quatro estirpes de bactérias e o segundo a composição do meio de cultura LB (controle sem metais, suplementado com Cd, suplementado com Cu e suplementado com Zn), e a análise de variância das médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se o grau de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração mínima inibitória

A estirpe UFLA 01-659 apresentou maior tolerância a todos os metais avaliados (Tabela 1), apresentando valores de CMI de 5,00 mM de Cd, 4,95 mM de Cu e 14,66 mM de Zn. Estes valores correspondem a 562, 314 e 958 mg L⁻¹ dos referidos metais, respectivamente. O valor tolerado de Cd pela estirpe UFLA 01-659 foi 2,5 vezes maior que as demais estirpes, e os de Cu e Zn foram superiores 1,7 e 3 vezes, respectivamente.

As CMI de Cd e Cu foram bastante semelhantes entre as três demais estirpes estudadas (LMG 19424^T, UFLA 01-663 e UFLA 02-71). Entretanto, foi possível observar uma diferenciação da CMI de Zn (metal mais tolerado), apresentando em ordem decrescente de tolerância: UFLA 01-659 > UFLA 02-71 = UFLA 01-663 > LMG 19424^T.

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória de cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) para o crescimento de diferentes estirpes de *Cupriavidus* spp. em meio de cultura LB líquido

Cd					
Bactéria	CMI (mM)	CMI (mg)	Equação	R ²	P
LMG 19424 ^T	1,93	216,95	$Y = -1,5787x^2 - 1,9831x + 9,7094$	0,9235	**
UFLA 01-659	5,00	562,05	$Y = -0,6418x^2 + 1,5312x + 8,3751$	0,9622	**
UFLA 01-663	2,02	227,07	$Y = -2,7258x^2 + 2,2535x + 6,5478$	0,9910	**
UFLA 02-71	2,00	224,82	$Y = -3,7724x^2 + 3,3889x + 8,4650$	0,9780	**
Cu					
LMG 19424 ^T	2,95	187,46	$Y = -2,0864x^2 + 3,2183x + 8,6503$	0,8824	**
UFLA 01-659	4,95	314,55	$Y = -0,7183x^2 + 1,8808x + 8,2845$	0,9364	**
UFLA 01-663	3,57	226,86	$Y = -0,9879x^2 + 1,6322x + 6,783$	0,9843	**
UFLA 02-71	3,06	194,45	$Y = -2,1958x^2 + 4,048x + 8,199$	0,9517	**
Zn					
LMG 19424 ^T	3,59	234,71	$Y = -1,622x^2 + 3,2853x + 9,0996$	0,9464	**
UFLA 01-659	14,66	958,47	$Y = -0,0639x^2 + 0,2887x + 9,5031$	0,9579	**
UFLA 01-663	5,87	383,78	$Y = -0,4802x^2 + 1,6516x + 6,8592$	0,9137	**
UFLA 02-71	5,95	389,01	$Y = -0,4533x^2 + 1,1051x + 9,4849$	0,9791	**

* significativo ao nível de 5%, ** significativo ao nível de 1%.

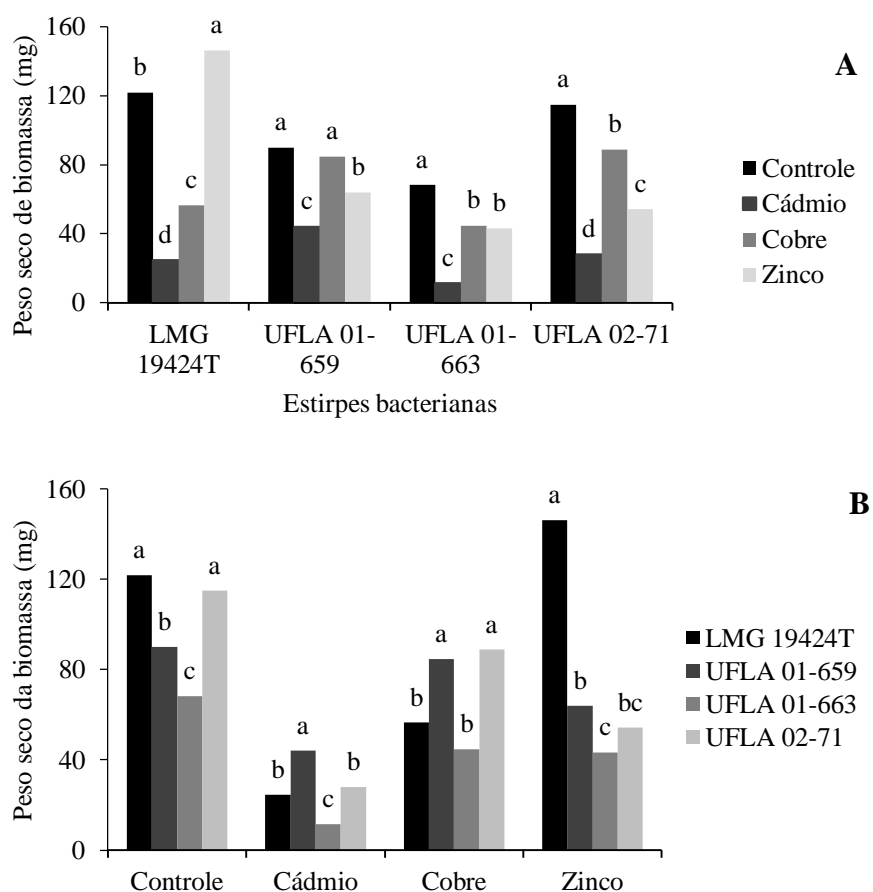
3.2 Remoção de metais pesados

Observando o efeito dos metais sobre cada uma das estirpes, observa-se que *C. taiwanensis* LMG 19424^T apresenta uma maior produção de biomassa em meio cultivado com zinco ($P < 0,05$), superando a condição de controle sem adição de quaisquer metais (Figura 1 A). O cobre não comprometeu a produção de biomassa da estirpe UFLA 01-659 se compararmos com o tratamento controle. E para todas as estirpes, o Cd foi o metal mais deletério na produção de biomassa.

Comparando a produção de biomassa das estirpes (Figura 1 B) nota-se que quando é adicionado Cd ao meio de cultivo, a estirpe UFLA 01-659 apresenta maior produção de biomassa, enquanto que na presença de Cu as

estirpes UFLA 01-659 e UFLA 02-71 apresentaram maiores produções de biomassa. Quando as estirpes são cultivadas com Zn, a maior produção de biomassa é apresentada pela estirpe LMG 19424^T.

Figura 1 - Biomassa das estirpes bacterianas na ausência de metais (controle) e na presença dos metais Cd (1 mM), Cu e Zn (2mM) em meio de cultura LB líquido.

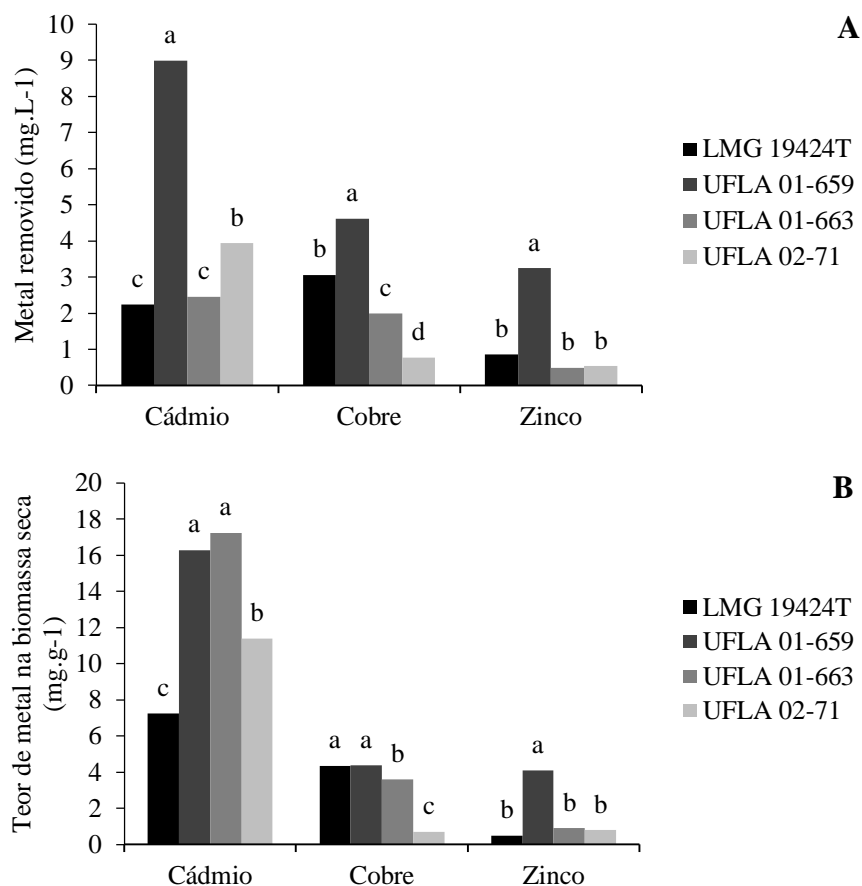


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A estirpe UFLA 01-659 apresentou maiores taxas de remoção para todos os metais, quando comparada com as demais estirpes, obtendo valores de aproximadamente 9, 4,6 e 3,2 mg L⁻¹ de Cd, Cu e Zn, respectivamente (Figura 2A). Nos tratamentos com Cu e Zn a referida estirpe, removeu até seis vezes mais que as demais, e com Cd a remoção foi em torno de quatro vezes mais.

Em relação aos teores dos metais na biomassa (Figura 2B), no tratamento com cádmio os maiores teores de metal na biomassa foram observados nas estirpes UFLA 01-659 e UFLA 01-663, e no tratamento com Cu nas estirpes UFLA 01-659 e LMG 19424^T. Enquanto que no tratamento com Zn, o maior teor de metal na biomassa foi apresentado pela estirpe UFLA 01-659, exclusivamente.

Figura 2 - Metal removido do meio de cultura e teores de metais pesados na biomassa nas estirpes LMG 19424^T, UFLA 01-659, UFLA 01-663 e UFLA 02-71 cultivadas em meio de cultura LB líquido suplementado com Cd (1mM), Cu e Zn (2 mM).



3.3 Microscopia eletrônica das células de *Cupriavidus* cultivadas com metais pesados

As observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostraram a ocorrência de alterações no padrão de crescimento das células

(tamanho e forma) e na produção de exopolissacarídeos devido à exposição aos metais (Figura 3 e Figura 4).

No tratamento controle da estirpe LMG 19424^T não foi observada a produção de exopolissacarídeos (Figura 3A). No entanto, quando cultivada com Cd (Figura 3) ou Cu (Figura 3C) esta estirpe apresentou um mesmo padrão de crescimento e com produção de exopolissacarídeos. Quando cultivada com zinco esta mesma estirpe apresentou células diminutas e agregadas (Figura 3D).

C. necator UFLA 01-659 não apresentou modificações visíveis ao MEV para as concentrações de metais testadas (Figura 3E, F, G e H). Em todos os tratamentos a estirpe UFLA 01-663 apresentou uma produção de biomassa característica. No tratamento controle (Figura 4A) e na presença de Cu (Figura 4C) foi observada a produção de exopolissacarídeos. No entanto, este efeito foi ausente na presença de Cd (Figura 4B) ou do Zn (Figura 4D).

Na presença de Cd (Figura 4F) e Cu (Figura 4G), *C. necator* UFLA 02-71 apresentou padrões de crescimento semelhantes entre si, e produção de exopolissacarídeos visualmente maior do que no controle (Figura 4E). Na presença de Zn esta estirpe manteve a mesma forma celular, no entanto com elevada produção de exopolissacarídeos (Figura 4H).

Figura 3 - Eletromicrografia de varredura da biomassa microbiana das estirpes LMG 19424T (A, B, C e D) e UFLA 01-659 (E, F, G e H) em diferentes tratamentos do experimento de remoção de metais (A e E - controle, B e F - Cd, C e G - Cu, D e H - Zn)

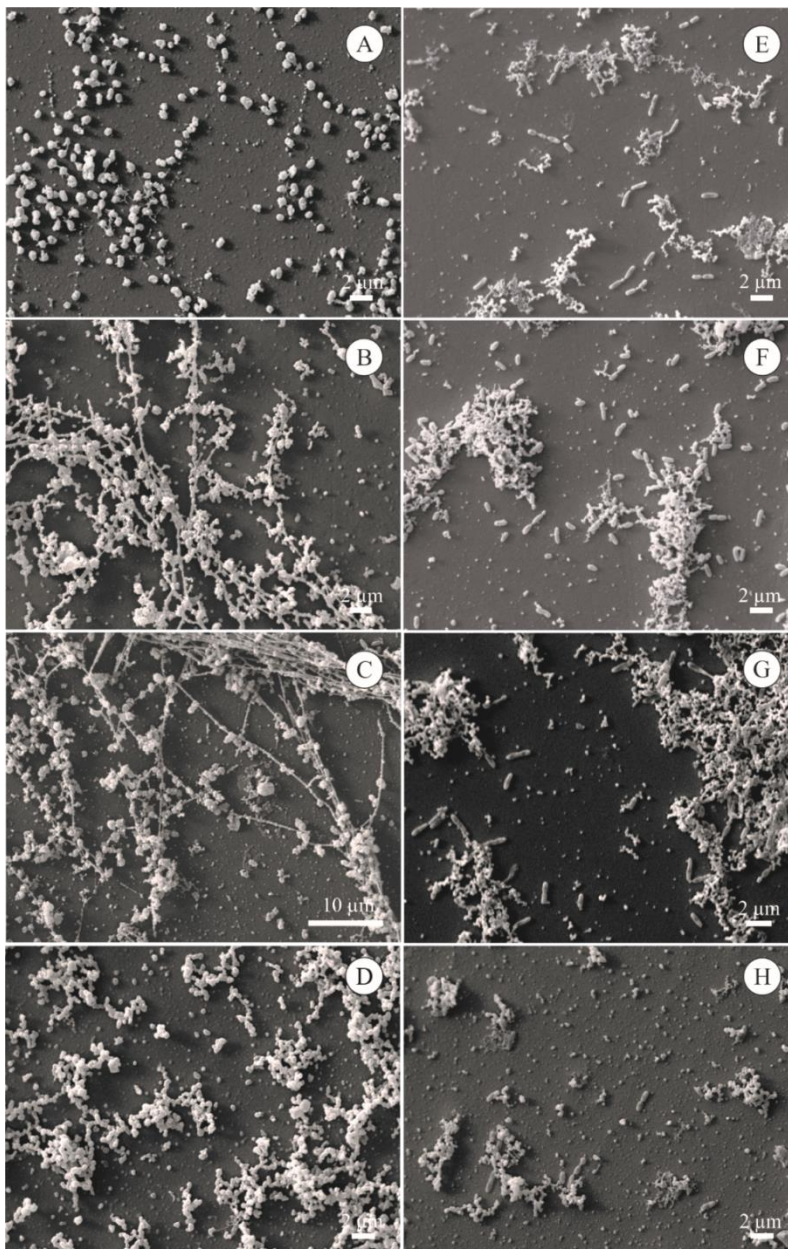
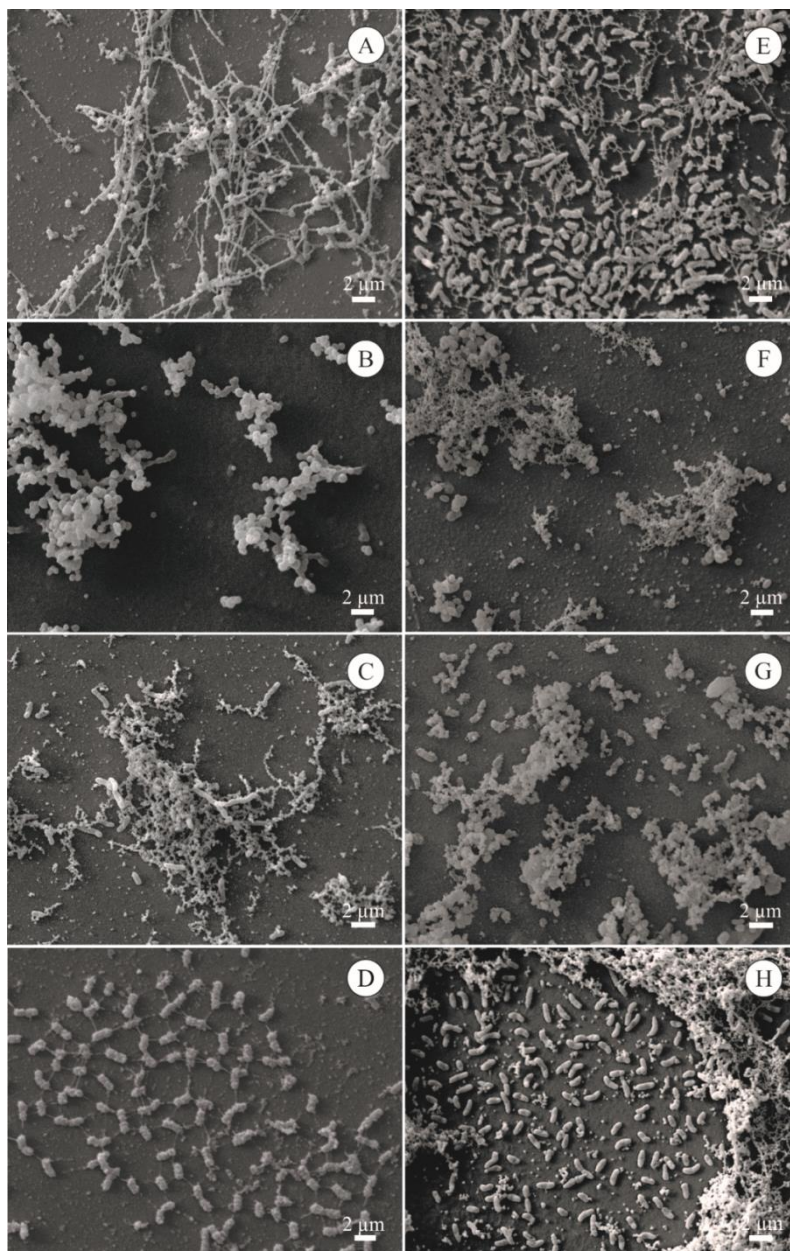
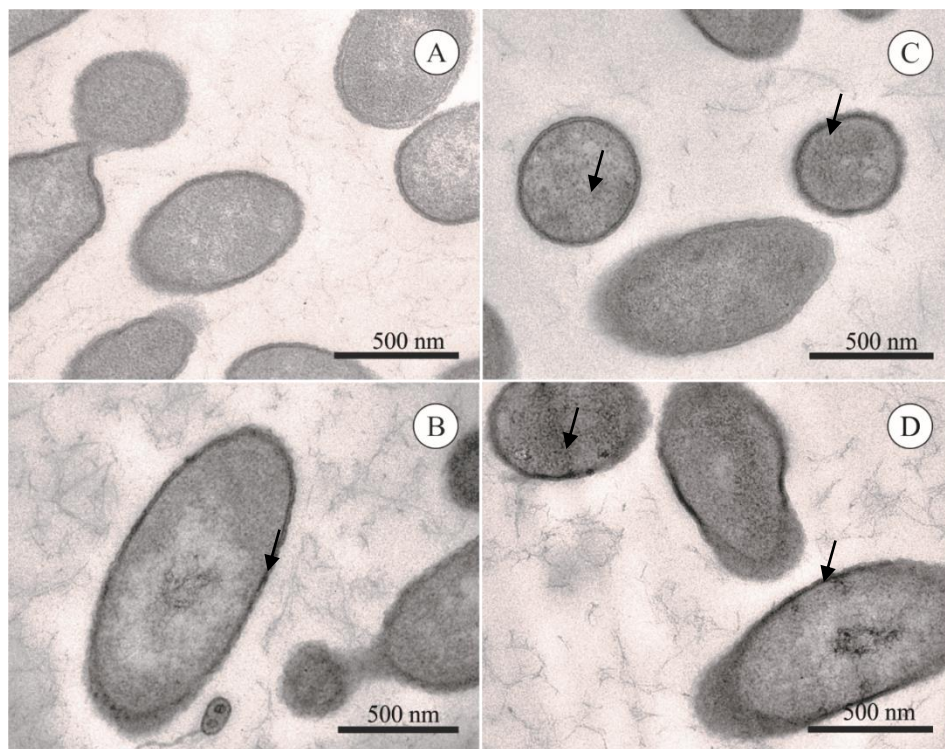


Figura 4 - Eletromicrografia de varredura da biomassa das estirpes UFLA 01-663 (A, B, C e D) e UFLA 02-71 (E, F, G e H) em diferentes tratamentos do experimento de remoção de metais (A e E – controle, B e F – Cd, C e G –Cu, D e H - Zn)



Nas imagens geradas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) é possível observar que houve um acúmulo de todos os metais (Figura 5 B, C, D) tanto na membrana citoplasmática como na parede celular. Os metais Cu (Figura 5 C) e Zn (Figura 5 D) também apresentaram acúmulo no interior das células da estirpe UFLA 01-659.

Figura 5 - Eletromicrografia de transmissão da estirpe UFLA 01-659 após o experimento de remoção de metais nos tratamentos: controle sem a presença de metais (A), Cd na concentração de 1 mM (B), Cu (C) e Zn (D) na concentração de 2 mM. Setas indicam os locais mais contrastados onde houve acúmulo dos metais



4 DISCUSSÃO

Na literatura são relatados valores de CMI, taxa de remoção de metais e teor na biomassa bacteriana vinculada a estirpes resistentes a metais pesados. Por exemplo: em relação ao metal Cd foram registrados valores de CMI de 0,75 - 3 mM para *Pseudomonas*, *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp. e *Cupriavidus metallidurans* CH34, esta última considerada altamente tolerante (Chien *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2008; Klonowska *et al.*, 2012). Quanto ao acúmulo na biomassa, Bianucci *et al.* (2011) estudando estirpes de *Bradyrhizobium* observou teores de Cd na biomassa de 7,7 mg g⁻¹.

A estirpe *C. necator* UFLA 01-659, deste estudo, apresentou valores de CMI de aproximadamente 5,00 mM de Cd em meio líquido, e taxa de remoção de 9,00 mg L⁻¹ de Cd em meio de cultura, e o elevado teor de 16,3 mg g⁻¹ do metal na biomassa, valores estes superiores aos anteriormente relatados na literatura.

Em relação ao metal Cu, são registrados valores de CMI de 5,00 mM para *Pseudomonas*, *Cupriavidus taiwanensis* e bactérias endofíticas, e teores de 0,838 mg g⁻¹ na biomassa de *Pseudomonas* sp. (Chen *et al.*, 2008; Li & Ramakrishna *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011). Em nossos estudos registramos o valor de CMI semelhante ao já relatado (5,00 mM), porém os índices de taxas de remoção de 4,6 mg L⁻¹ e teores de Cu na biomassa de 4,4 mg g⁻¹ para estirpe UFLA 01-659 foram bastante expressivos.

Li & Ramakrishna (2011) isolando cepas de *Pseudomonas* de lagos de sedimento, obtiveram valores de CMI 6 mM de Zn em meio sólido e conteúdo de 15,877 mg g⁻¹ de Zn na biomassa. Klonowska *et al.* (2012) obteve valores de CMI de 15 mM de Zn para alguns isolados, entretanto neste mesmo estudo a estirpe LMG 19424^T apresentou elevado índice CMI de (10 mM), bem superior ao encontrados em nosso trabalho (3,59 mM). Esta baixa tolerância em nossos experimentos, pode ser devido à presença de TRIS no meio de cultura, que

confere uma alta disponibilidade do metal. Em nosso trabalho a estirpe UFLA 01-659 também apresentou alta tolerância a Zn (14,66 mM) e índices menos expressivos de remoção ($3,24 \text{ mg L}^{-1}$) e teores ($4,1 \text{ mg g}^{-1}$) de Zn na biomassa.

A superioridade da estirpe UFLA 01-659 em tolerar os metais estudados também é notada nas imagens geradas em MEV (Figura 3), em que não são notadas alterações no padrão de desenvolvimento (tamanho de células e produção de exopolissacarídeos), quando comparamos aos cultivos com metais com o controle.

Sua alta eficiência em remover os metais do meio de cultura se expressava ora por meio da alta produção de biomassa (observados nos cultivos com Cd e Cu), ora por teor superior do metal na biomassa (quando cultivada com Zn), observados na Figura 1 e 2. Babu *et al.* (2015) atribui a eficiência em remoção de metais pesados do meio de cultura a capacidade das estirpes em produzir uma maior densidade de células e nas saturações de locais de adsorção de metais na superfície das células.

Chien *et al.* (2013) observou uma maior produção de exopolissacarídeos por estirpes bacterianas com a presença e o aumento dos teores dos metais cádmio e níquel no meio de cultura. Contudo, não pode observar diferença na produção de exopolissacarídeos entre as estirpes que apresentaram maior e menor taxa de remoção de metais, afirmando assim que a maior remoção pode estar ligada a composição destes exopolissacarídeos e sua capacidade de adsorção de metais.

Em nosso trabalho, a presença de metais no meio de cultura induziu a produção de exopolissacarídeos nas estirpes LMG 19 424T e UFLA 02-71 (Figura 3 e Figura 4), porém estas estirpes apresentaram menor taxa de remoção. Em relação aos mecanismos de tolerância, Babu *et al.* (2015) verificou que os complexos de multimetais (As, Cd, Cu, Pb e Zn) foram encontrados na superfície das células e extracelularmente, atribuindo a produção de

exopolissacarídeos um importante papel na complexação de metais extracelularmente.

Contudo, em experimentos de isotermas de adsorção de Zn por biomassa de *Pseudomonas aureofaciens* foi observado uma maior adsorção do metal pela estirpe que apresentava pouca produção de exopolissacarídeos a partir da concentração de 0,4-0,45 mM de Zn em solução de equilíbrio (Drozdova *et al.*, 2014). Em vista dos trabalhos relatados e do encontrado por nós nas imagens geradas em MEV, pode se dizer que a produção de exopolissacarídeos é uma resposta a presença de metais, mas apresenta pouca contribuição na remoção de metais pesados do ambiente.

Agés *et al.* (2008) detectou a presença de Cd associado a células bacterianas de *Stenotrophomonas maltophilia* por MEV com sistema EDX acoplado, entretanto não foi possível a determinação exata da alocação dos metais por esta técnica. Para estes autores, a presença de Cd reorienta o metabolismo bacteriano para produção de cisteína para posteriormente utilizá-la como precursor na formação de partículas de sulfeto de cádmio (CdS). Para Wang *et al.* (2015) a alta resistência de *Cupriavidus gilardii* CR3 a diversos metais se deve principalmente pelo eficiente sistema de efluxo de íons, complexação e redução de metal, e de uma forma indireta, por sua capacidade de autorreparação.

Desta forma pode se inferir que a alocação dos metais é determinada pelos mecanismos de tolerância desempenhados por cada estirpe bacteriana. A alocação de Cu e Zn no interior das células de UFLA 01-659 pode indicar que a estirpe apresenta baixa capacidade de extrusão dos metais via bombas de efluxo de prótons, e/ou que realiza a complexação de metais formando partículas intracelularmente. Já a presença de Cd apenas na membrana citoplasmática e na parede celular pode indicar que há uma extrusão eficiente deste metal e que sua alta taxa de remoção se deve principalmente a fenômenos físicos de adsorção.

5 CONCLUSÕES

C. necator UFLA 01-659 apresentou maior capacidade de tolerar e remover Cd devido alta produção de biomassa e adsorção na membrana e parede celular.

A eficiência na remoção de Cu e Zn por *C. necator* UFLA 01-659 é expressa pela sua capacidade de complexação intracelular e adsorção na membrana e na parede celular.

A presença de metais no meio de cultura induz a produção de exopolissacarídeos pelas estirpes LMG 19424T e UFLA 02-71, com pouca contribuição para remoção de metais.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>), Finep, Fapemig, CNPq e Capes pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica. Ao CNPq pelas bolsas de produtividades dos professores Dr. Eduardo Alves e Dra. Fatima Maria de Souza Moreira.

REFERÊNCIAS

- ANDREAZZA, R.; OKEKE, B. C.; PIENIZ, S.; CAMARGO, F. A. O. Characterization of copper-resistant rhizosphere bacteria from *Avena sativa* and *Plantago lanceolata* for copper bioreduction and biosorption. **Biological Trace Element Research**, v. 146, p. 107-115, 2012.
- BABU, A. G.; SHEA, P.J.; SUDHAKAR, D.; JUNG, I. B.; OH, B. T. Potencial use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil. **Journal of Environmental Management**, v.151, p.160-166, 2015.
- BIANUCCI, E.; FABRA, A.; STELLA, C. Cadmium accumulation and tolerance in *Bradyrhizobium* spp. (Peanut microsymbionts). **Current Microbiology**, v.62, p. 96-100, 2011.
- CHIEN, C.; KUO, Y.; CHIEN, C.; HUNG, C.; YEH, C.; YEH, W. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, v.20, p.359-363, 2008.
- CHIEN, C. C.; LIN, B. C.; WU, C. H. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 132-137, 2013.
- CHIEN, C. C.; JIANG, M. H.; TSAI, M. R. Isolation and characterization of an environmental cadmium and tellurite resistant *Pseudomonas* strain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, n.10, p. 2202-2207, 2011.
- DROZDOVA, O. Y.; POKROVSKY, O. S.; LAPITSKIY, S.A.; SHIROKOVA, L. S.; GONZÁLEZ, A. G.; DEMIN, V. V. Decrease in zinc adsorption onto soil in the presence of EPS-rich and EPS-poor *Pseudomonas aureofaciens*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 435, p. 59-66, 2014.
- FERREIRA, P. A. A. **Tolerância de *Cupriavidus necator* a cádmio e zinco e sua eficiência simbiótica em leguminosas**. 2011. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- FERREIRA, P.A.A.; BOMFETI, C.A.; SILVA JUNIOR, R.; SOARES, B.L.; SOARES, C.R.F.S.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 85-95, jan 2012.

FERREIRA, P.A.A.; LOPES, G.; BOMFETI, C.A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S.M.; SOARES, C.R.F.S.; GUILHERME, L.R.G; MOREIRA, F.M.S.
Leguminous plants inoculated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soil amended with calcium silicate. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 2055-2066, 2013.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **J. Microbiol. Methods**, v. 44, n. 2, p. 121– 129, 2001.

HYNNINEN, A.; TOUZÉ, T.; PITKÄNEN, L.; MENGIN-LECREULX, D.; VIRTÁ, M. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 384-394, 2009.

HUANG, L. M.; DENG, C. B.; HUANG, N.; HUANG, X. J. Multivariate statistical approach to identify heavy metal sources in agricultural soil around an abandoned Pb-Zn mine in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. **Environmental Earth Sciences**, v. 68, n. 5, p. 1331-1348, 2013.

KLONOWSKA, A.; CHAINTREUIL, C.; TISSEYRE, P.; MICHÉ, L.; MELKONIAN, R.; DUCOUSSO, M.; LAGUERRE, G.; BRUNEL, B.; MOULIN, L. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metals-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.81, p.618-635, 2012.

LI, K.; RAMAKRISHNA. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. **Journal of Hazardous Materials**, v.189, p.531-539, 2011.

LUO, S. L.; CHEN, L.; CHEN, J. L.; XIAO, X.; XU, T. Y.; WAN, Y. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. **Chemosphere**, v. 85, p. 1130-1138, 2011.

MACIEL, C. A. C.; CAMARGO, O. A.; VIEIRA, S. R.; CHIBA, M. K. Distribuição espacial de cobre, zinco e níquel em um Latossolos após quinze anos da aplicação de lodo de esgoto. **Bragantia**, v.71, n.4, p.528-537, 2012.

MAHIEU, S.; FRÉROT, H.; VIDAL, C.; GALIANA, A.; HEULIN, K.; MAURE, L.; BRUNEL, B.; LEFÈVRE, C.; ESCARRÉ, J.; CLEYET-MAREL, J. C. *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, and efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailing highly contaminated by Zn, Pb and Cd. **Plant soil**, v. 342, p. 405-417, 2011.

MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHLEGEL, H.G.; GERTIS, J.; CHARLES, P.; VAN GUSEGEM, F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 01, p. 328-334, 1985.

MOREIRA, F.M.S., GILLIS, M., POT, B., KERSTERS, K., FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v.16, p.135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; NÓBREGA, R. S. A.; LIMA, A. S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Annals of the Brazilian Academy of Science**, v. 80, n. 4, p.749-761, 2008.

PAGES, D.; ROSE, J.; CONROD, S.; CUINE, S.; CARRIER, P.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Plos ONE**, v.2, 2008.

POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K. Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints. In: Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (Eds.), **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics**. First edition, Wiley, Chichester, NY, 1994. p. 493-521.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory press. 1989.

SILVA, K.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F.M.S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p. 175-182, 2012.

VALENTIM DOS SANTOS, J.; VARÓN-LOPÉZ, M.; SOARES, C. R. F. S.; LEAL, P. L.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Biological attributes of

rehabilitated soil contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 2285-2289, 2004.

WANG, X.; CHEN, M.; XIAO, J.; HAO, L.; CROWLEY, D. E.; ZHANG, Z.; YU, J.; HUANG, N.; HUO, M.; WU, J. Genome sequence analysis of the naphthenic acid degrading and metal resistant bacterium *Cupriavidus gilardii* CR3. **Plos ONE**, p. 1-21, 2015.

ZOROPOGUI, A.; GAMBARELLI, S.; COVE'S, J. CzcE from *Cupriavidus metallidurans* CH34 is a copper-binding protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 365, P. 735-739, 2008.

**ARTIGO 2 - BIOSSORÇÃO DE CÁDMIO, COBRE E ZINCO POR
CUPRIAVIDUS NECATOR (UFLA 01-659)**

VICENTIN, Rayssa Pereira; SANTOS, Jessé Valentim dos; MOREIRA, Fatima
Maria de Souza; ALVES, Eduardo

ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

Bactérias contribuem para imobilização de metais pesados por meio da bioissorção. Este processo de interesse biotecnológico sofre influência de diversos fatores, o que o torna difícil de ser descrito ou estimado. Neste trabalho submetemos a biomassa de células vivas e mortas (por autoclavagem) da estirpe *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 a experimentos de cinética (10-520 minutos) e isoterma (0-600 mg L⁻¹) de bioissorção de metais. Ambos os experimentos foram realizados para os metais cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn), separadamente. O ajuste dos dados da isoterma aos modelos de Langmuir e de Freundlich foi verificado. Foram realizadas eletromicrografias de transmissão das células vivas dos tratamentos com 300 mg L⁻¹ de cádmio, e 600 mg L⁻¹ de cobre e de zinco em solução, pra investigar a alocação destes metais na célula. Nos períodos de tempo avaliados houve pouca diferenciação na bioissorção de metais, que foi restrita a alguns períodos de incubação. Entretanto na isoterma em função da concentração, verificou-se que o aumento da concentração dos metais em solução induziu a uma maior bioissorção (mg g⁻¹), para todos os metais, com alto ajuste dos dados para o modelo de Freundlich. Na isoterma foi possível verificar que células vivas tem maior capacidade de bioissorção de Cu que células mortas. As maiores porcentagens de metais removidos foram apresentadas por Cd (aproximadamente 52%), seguida de Zn e Cu (36 e 20%). A estirpe de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 possui a capacidade de acumular Cd e Zn no interior da célula, enquanto que o Cu parece ficar retido entre a membrana e a parede celular, o que justifica a maior bioissorção realizada por células vivas. Como os dados apresentaram ajuste ao modelo de Freundlich, provavelmente *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 apresenta capacidades superiores de bioissorção destes metais.

Palavras-Chave: metal pesado, biorremediação, bactéria, microscopia eletrônica de transmissão.

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são poluentes encontrados em ambientes naturais (solos e corpos d'água), resíduos industriais, e efluentes de indústrias e de estações de tratamento de esgoto (Valentim do Santos *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2013; Manasi, *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). Nestes ambientes os metais podem sofrer imobilização pela precipitação na forma de hidróxidos e sorção (Ferreira *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2015).

Os modelos matemáticos propostos por Langmuir e por Freundlich têm sido utilizados para descrever a capacidade de sorção de metais pesados a superfícies sólidas, como células bacterianas, auxiliando na elucidação do comportamento destes metais em diversos ambientes (Gülbaz *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2015). No modelo de Langmuir há uma estagnação da capacidade de sorção, e este tem sido usado para descrever a sorção em monocamada. Já no modelo de Freundlich a capacidade de sorção aumenta indefinidamente, sendo típica para sorção em multicamada.

Nos solos os metais pesados sofrem sorção por partículas sólidas, como minerais e macromoléculas orgânicas, expressa por interações físicas e químicas, que vão desde as ligações fracas por forças de Van Der Waals, a ligações covalentes, de difícil reversão. Dependendo do tipo e da proporção dos seus componentes sólidos, podem apresentar um predomínio de sorção em mono ou multicamada (Yang *et al.*, 2015; Gülbaz *et al.*, 2015; Galunin *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

Já os microrganismos (presentes em praticamente todos os ambientes), além destas interações, apresentam outras mais complexas, que envolvem sua constituição e capacidades biológicas de acumulação, e são mais difíceis de serem descritas. Geralmente, a capacidade de biossorção de metais pesados por microrganismos é influenciada por diversos fatores como: tipo de elemento químico, concentração de metal em solução, pH do meio, temperatura,

concentração de biossorbato e tempo de exposição do metal ao biossorbato (Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2014; Salvadori *et al.*, 2014).

A contribuição de microrganismos na imobilização via biossorção de metais pesados tem sido estudada com fim biotecnológico da remediação de represas de rejeito de mineração e em tratamento de efluentes (Salvadori *et al.*, 2014; Al-Gheethi *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2015). Neste contexto, bactérias do gênero *Cupriavidus* são promissoras por apresentarem alta tolerância e capacidade de biossorção de metais pesados (Ferreira *et al.*, 2012; Klonowska *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2014). Outro aspecto interessante deste gênero é a sua versatilidade, que em simbiose com *Mimosa pudica* pode induzir uma maior biossorção de cádmio, cobre e chumbo por parte da planta, e ao mesmo tempo ser capaz de fixar nitrogênio atmosférico (Chen *et al.*, 2008).

Neste estudo, tivemos por objetivo avaliar a capacidade de *Cupriavidus necator* em realizar a biossorção de cádmio, cobre e zinco, assim como o ajuste dos dados de isoterma de biossorção aos modelos de Langmuir e Freundlich, e demonstrar a alocação dos metais na célula bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo do biosorbato

A estirpe UFLA 01-659, da espécie *Cupriavidus necator* (Silva *et al.*, 2012), foi cultivada em meio Luria Bertani (LB) líquido (Sambrook *et al.*, 1989) por 4 dias, à 28°C sob agitação horizontal de 110 rpm. Após o período de cultivo, as células foram centrifugadas e passaram por duas lavagens em água deionizada estéril (Chang *et al.*, 1997). Para os experimentos com células mortas, a biomassa obtida após a centrifugação foi autoclavada por 20 minutos à 120°C, e pressão de 1 atm. A densidade de biomassa de células bacterianas utilizada nos experimentos foi de 2 g L⁻¹ em solução com os metais.

2.2 Cinética de biosorção de metais

Foi avaliada a capacidade de biosorção dos metais cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) por células vivas e mortas, em função do tempo de incubação. Para tanto, a biomassa de células foi ressuspensa em 50 mL de solução contendo os metais Cd, Cu e Zn na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo um experimento para cada metal. O pH da solução foi previamente ajustado em 5 para Cu e Zn e 6 para Cd com solução de TRIS (100 mM) para evitar a precipitação dos metais (Chang *et al.*, 1997).

As amostras foram incubadas à 28°C e agitadas a uma rotação de 110 rpm por 10, 20, 40, 70, 120, 200, 320 e 520 minutos, com três repetições para cada tempo. Foram realizadas centrifugações das amostras e coletados o sobrenadante para análise da concentração dos metais pesados, que corresponde a concentração de equilíbrio (C_e), em espectrofotômetro de absorção atômica.

2.3 Isotermas de biosorção de metais

A biosorção de metais foi avaliada submetendo células vivas e mortas a concentrações crescentes de metais pesados nas mesmas condições de pH,

agitação e temperatura utilizado no experimento de cinética de bioadsorção. Nas isotermas com Cd as células foram expostas a 50 mL de solução contendo 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg L⁻¹ de Cd, e nas isotermas com Cu e Zn as concentrações utilizadas foram 0, 25, 50, 100, 200, 300, 450 e 600 mg L⁻¹, com três repetições para cada tratamento.

Em todas as isotermas o tempo de incubação foi de 200 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi recolhido para determinação da concentração de metais pesados em solução (C_e) em espectrofotômetro de absorção atômica.

2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Os pellets obtidos após a centrifugação das amostras dos tratamentos com 300 mg L⁻¹ de Cd e 600 mg L⁻¹ de Cu e Zn da isoterma de bioadsorção de metal foram fixado em solução de Karnovsky, lavados em tampão cacodilato e pós-fixado em tetróxido de ósmio por duas horas, e acetato de uranila (0,5%) por 12 horas. Em seguida, realizou-se a desidratação em gradiente de acetona (25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95 e 100%), e infiltração em resina SPURR, finalizando com emblocamento. Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrotomo. As contrastações dos cortes foram realizadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

2.5 Cálculos de dados e análise estatística

2.5.1 Cinética e isoterma de bioadsorção de metais pesados

Foram calculados os valores de bioadsorção de metais (mg g⁻¹) tanto na cinética como na isoterma pela seguinte equação:

$$\text{Equação 1: } q_e = V (C_i - C_e) / M$$

Onde: q_e (mg g^{-1}) é a quantidade de metal bioissorvido pela biomassa bacteriana; V é o volume (L) de solução de metal ao qual a biomassa foi exposta; C_i (mg L^{-1}) é a concentração inicial do metal em solução; C_e (mg L^{-1}) é a concentração de equilíbrio (final) do metal em solução; e M (g) é a massa em peso do bioissorbato (biomassa bacteriana). A diferença entre as médias de bioissorção dos tempos de incubação e concentração de metais foram indicadas por barra de erro.

A porcentagem de metal removido foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 2: } \% = ((C_i - C_e) / C_i) * 100$$

2.5.2 Ajuste dos dados aos Modelos de Langmuir e Freundlich

A partir dos dados de C_e e q_e da isoterma foi verificado o ajustes dos dados aos modelos de Langmuir e Freundlich por análise de regressão, adotando o grau de significância de 5%, utilizando o software SISVAR.

Sendo, o modelo de Langmuir:

$$\text{Equação 3: } q_e = q_m \cdot K_L \cdot C_e / (1 + K_L \cdot C_e)$$

Onde, q_m (mg L^{-1}) é a capacidade máxima de bioissorção do bioissorbato e K_L (mg L^{-1}) é uma constante de Langmuir relacionada a energia de ligação do metal ao bioissorbato.

E o modelo de Freundlich:

$$\text{Equação 4: } q_e = K_F \cdot C_e^{(1/N)}$$

Em que K_F e N são constantes do modelo de Freundlich que descrevem a taxa (linear e exponencial) de aumento da biossorção em função da concentração do metal em solução.

3 RESULTADOS

3.1 Cinéticas de biossorção de metais pesados

A influência do tempo de incubação na biossorção dos metais estudados é apresentada na Figura 1 com pouca variação entre os tempos de incubação, indicando que a biossorção de metais pela biomassa da estirpe *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 ocorre de forma rápida.

Foram registrados valores médios de biossorção na faixa de 19,7-23,7 mg g⁻¹ de Cd em biossorbato. A biossorção de Cd por células vivas apresentou um discreto aumento com o aumento do tempo de incubação, já as células mortas apresentaram um discreto decréscimo. Isto implicou numa diferenciação na biossorção entre células vivas e mortas, com maior biossorção por células mortas nos menores tempos de incubação (10 e 20 minutos) e o inverso nos períodos de incubação de 120 minutos e superiores.

A biossorção média de Cu variou entre 7,3-9,6 mg g⁻¹, com diferenciação entre as células vivas e mortas apenas nos tempos de 10, 200 e 520 minutos, com maior biossorção por células vivas. Já a biossorção de Zn apresentou expressiva flutuação, variando de 11,3 à 16,9 mg g⁻¹, não sendo possível estabelecer uma diferenciação consistente entre os tempos de incubação ou células vivas e mortas.

3.2 Isoterma de biossorção de metais pesados e ajuste dos dados aos modelos de Langmuir e Freundlich

A biossorção de todos os metais estudados foi elevada com o aumento da concentração dos metais em solução, tanto por células vivas como mortas (Figura 2). Na isoterma com Cd apenas na maior concentração avaliada (300 mg L⁻¹) foi observado uma maior biossorção por células vivas, e nas demais concentrações não houve diferença entre células vivas e mortas.

Na isoterma de bioissorção de Cu observou-se uma clara diferenciação com maior bioissorção apresentada pelas células vivas, em todas as concentrações de Cu testadas. Para zinco a diferenciação só foi possível na concentração de 200 mg L⁻¹, com maior bioissorção apresentada pelas células mortas.

Observando os maiores valores de bioissorção registrados nas isotermas, a biomassa de *C. necator* UFLA 01-659 alcançou índices de bioissorção de 74,5, 53,6 e 92,4 mg.L⁻¹ de Cd, Cu e Zn, respectivamente, realizada por células vivas.

Se observarmos a porcentagem de metal extraído, nota-se que houve uma maior remoção de Cd, seguido de Zn e Cu. A remoção de Cd variou de 41,2-52,5 % nas diferentes concentrações testadas, enquanto que a remoção de Zn variou de 17,1-35,6 % e Cu de 7,6-19,6%. Apesar das flutuações apresentadas, a porcentagem de metal removido não parece ser influenciada pela concentração de metal em solução. Para Cd e Zn a porcentagem de remoção entre células vivas e mortas teve pouca diferenciação, enquanto que para Cu, células vivas apresentaram uma maior remoção, tal como a bioissorção.

Figura 1 - Cinética de biossorção de cádmio, cobre e zinco (100 mg L^{-1} em solução) por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* UFLA 01-569.

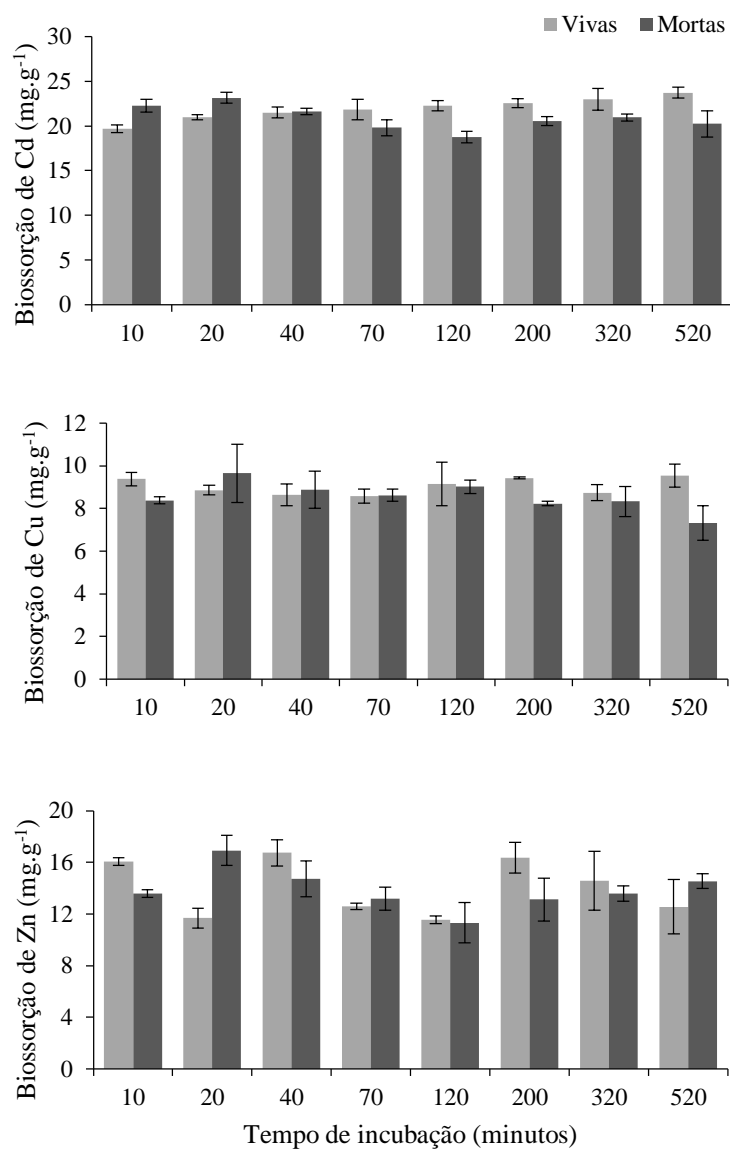
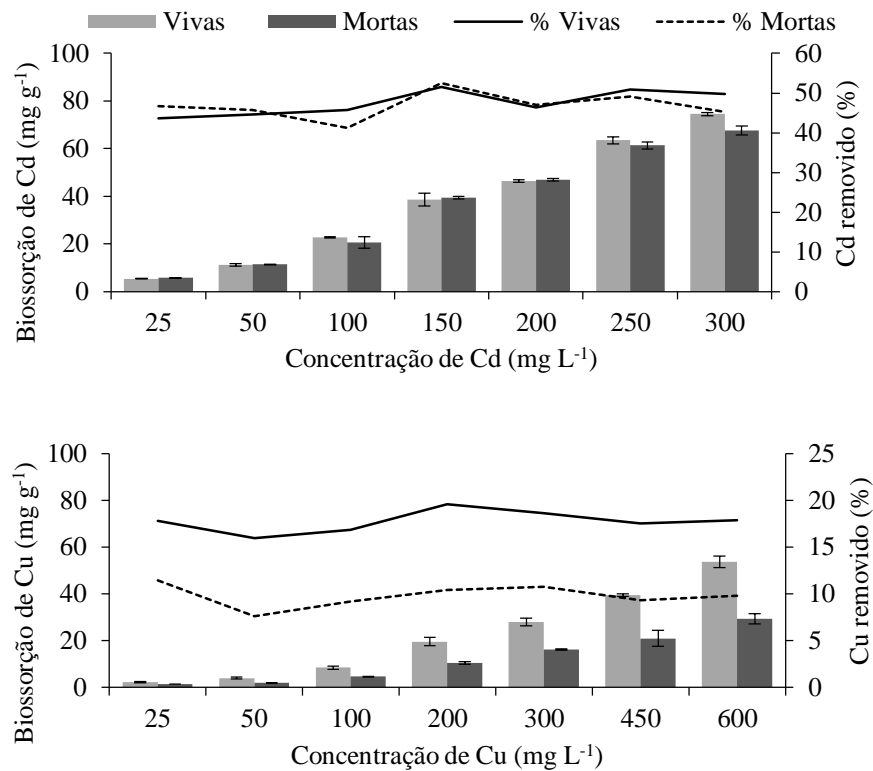
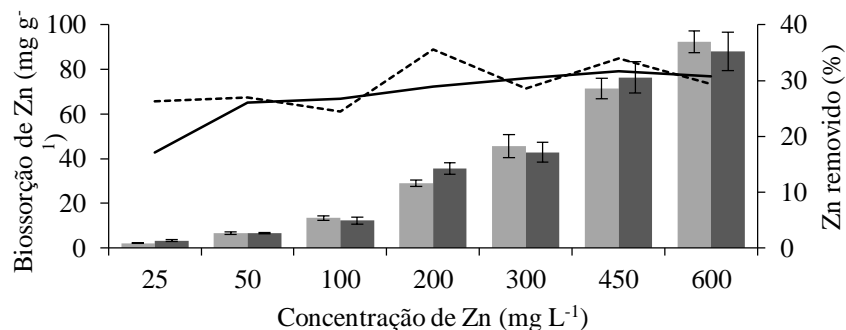


Figura 2 - Isotermas de bioabsorção de cádmio, cobre e zinco (representadas por gráfico de barras) e porcentagem de remoção de metais (representada por gráfico de linhas) por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 em diferentes concentrações dos metais em solução.





Os dados de isotermas de biossorção dos metais pesados não apresentaram ajuste para o modelo de Langmuir, em nenhum dos metais, apresentando baixos valores de coeficiente de determinação (R^2) e equações não significativas (dados não apresentados). Já o modelo Freundlich apresentou melhor ajuste para os dados de biossorção para todos os metais estudados, tanto para células vivas como mortas, com equações altamente significativas e elevados coeficiente de determinação (Tabela 1). A proximidade dos dados originais com os estimados pelo modelo de Freundlich pode ser verificada nos gráficos de biossorção apresentados na Figura 3.

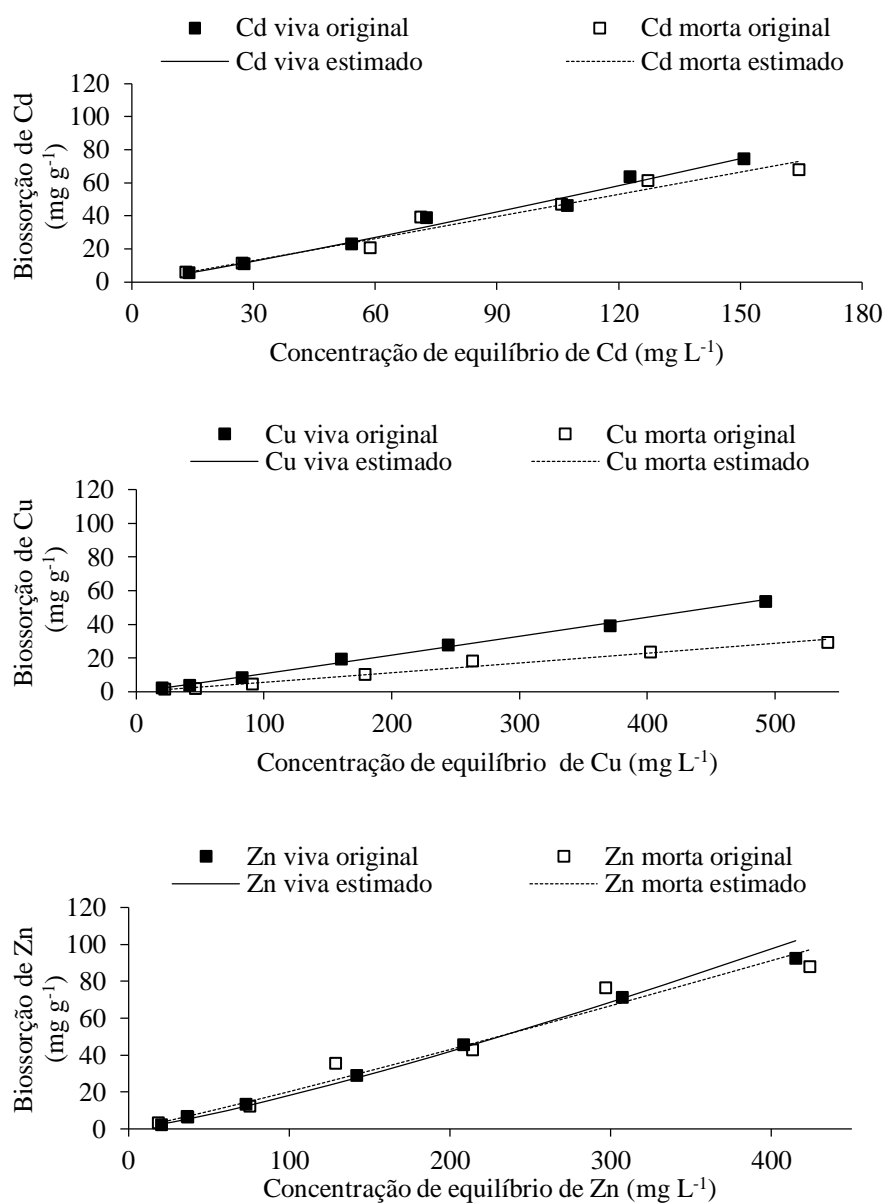
A constante K_F apresentou maiores valores para Cd, para ambas as células vivas e mortas. Os valores da constante exponencial do modelo de Freundlich ($1/N$) foram bastante semelhantes entre os metais e para células vivas e mortas. Apenas a biossorção de Zn por células vivas apresentou um fator exponencial ($1/N$) um pouco maior.

Tabela 1 - Constantes do modelo de Freundlich para bio sorção dos metais cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* (UFLA 01-659).

Metal	Célula	K_F	1/N	R^2	P
Cd	Viva	0,2922	1,1061	0,9798	**
	Morta	0,4168	1,0123	0,9582	**
Cu	Viva	0,0934	1,0273	0,9825	**
	Morta	0,0490	1,0253	0,9653	**
Zn	Viva	0,0669	1,2157	0,9762	**
	Morta	0,1374	1,0844	0,9507	**

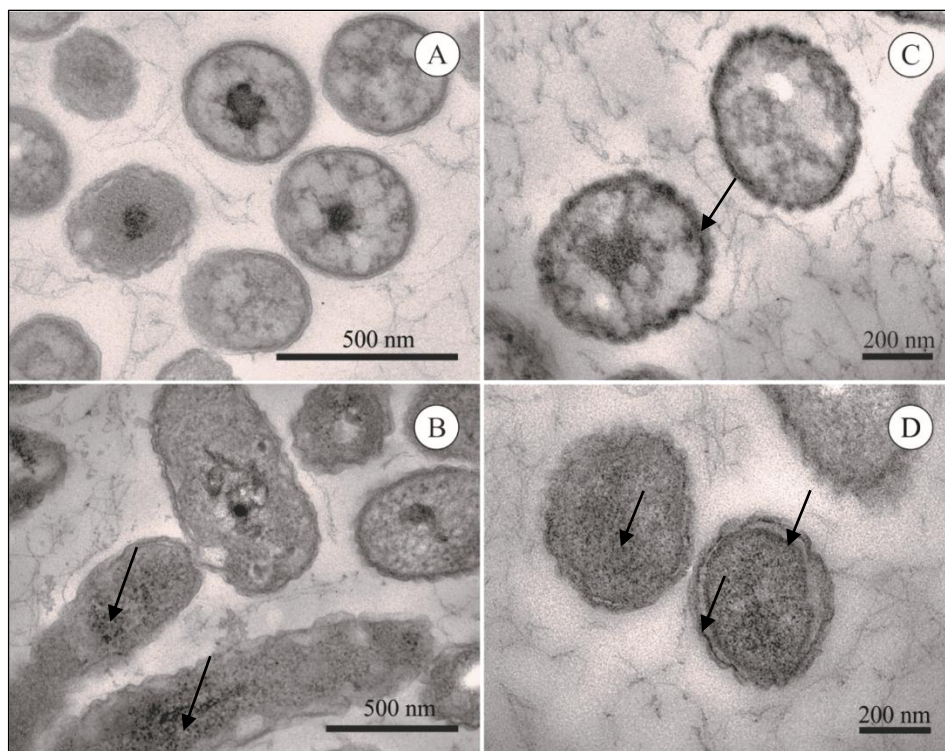
**Equações altamente significativas ($P < 0,01$).

Figura 3 - Dados originais e estimados pelo modelo de Freundlich da biossorção de cádmio, cobre e zinco por células vivas e mortas de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 em função da concentração de equilíbrio dos metais.



Pela eletromicrografia de transmissão pode-se verificar que houve diferenciação na alocação dos metais nos processos de biossorção. O Cd apresenta em maior incidência no interior da célula (Figura 4 B), enquanto que Cu aparenta estar alocado entre a membrana e a parede celular (Figura 4 C). O metal Zn pode ser notado no interior da célula, e adsorvido tanto na membrana quanto na parede celular (Figura 4 D).

Figura 4 - Eletromicrografia de transmissão de células da estirpe de *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 submetidas a experimentos de biossorção de cádmio (B), cobre (C) e zinco (D), e o controle negativo (A) sem a presença de metais.



4 DISCUSSÃO

4.1 Capacidade de biossorção de metais e sua modelagem

Apesar da elevada toxicidade do Cd, a estirpe *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 apresentou maior eficiência na remoção deste metal em comparação com os demais metais, removendo em torno de 50% do metal em solução, e apresentando uma biossorção de 74,54 mg g⁻¹ de Cd na biomassa, superior ao relatado nos poucos trabalhos existentes na literatura. Esta maior capacidade de remoção de Cd em comparação aos demais metais também pode ser notado pelos maiores valores da constante K_F (0,2922 e 0,4168) do modelo de Freundlich apresentado pelos dados obtidos na isoterma de biossorção em função da concentração de metal (Tabela 1).

Ansari e Malik (2007) obtiveram valores de biossorção de até 56 mg g⁻¹ de Cd em biomassa de isolados bacterianos incubados com solução de Cd de 400 mg L⁻¹, com ajuste para o modelo de Freundlich. Enquanto que *Pseudomonas* sp. LKS06 apresentou capacidade máxima de biossorção de apenas 27,5 mg g⁻¹ de Cd (Huang & Liu, 2013).

Kim *et al.* (2015) avaliando a capacidade de biossorção de diversas bactérias registrou valores de máxima adsorção de Cd de 64,28 mg g⁻¹ desempenhada pela estirpe *Bacillus catenulatus* JB-022, e com alto ajuste de seus dados com o modelo de sorção proposto por Langmuir para todas as estirpes estudadas.

É importante salientar que pelo modelo de Langmuir, há uma saturação da capacidade de biossorção do metal pelo biossorbato. Enquanto que pelo modelo de Freundlich não é possível estabelecer a capacidade máxima de biossorção com os dados obtidos, tal como foi observado em nossos experimentos.

A biossorção de Cu ($53,6 \text{ mg g}^{-1}$) por *C. necator* UFLA 01-659 foi a menos expressiva quando comparada aos demais metais e ao relatado na literatura. Os valores de K_F também foram os mais baixos (0,0934 e 0,0490). A estirpe *Cupriavidus metallidurans* CH34, por exemplo, obteve valores de capacidade máxima de biossorção de até $86,78 \text{ mg g}^{-1}$ de Cu e ajuste dos dados com modelo de Langmuir (Fan *et al.*, 2014). Porém, *Geobacillus thermodenitrificans* apresentou capacidade máxima de biossorção de 50 mg g^{-1} de Cu, semelhante ao que encontramos (Chatterjee *et al.*, 2010), enquanto que *Cupriavidus taiwanensis* obteve uma biossorção de apenas $19,0 \text{ mg g}^{-1}$ de Cu (Chen *et al.*, 2008).

O maior valor de biossorção de Zn por *C. necator* UFLA 01-659 foi de 92 mg g^{-1} , que assim como o Cd, apresentava valores bastantes elevados de biossorção quando comparado ao já relatado. Li *et al.* (2010) observou maior biossorção ($75,85 \text{ mg g}^{-1}$) de Zn por células mortas de *Streptomyces ciscaucasicus*, enquanto que Chatterjee *et al.* (2010) obteve valores de $48,26 \text{ mg g}^{-1}$ para *Geobacillus thermodenitrificans*.

Avaliando a capacidade de *C. necator* UFLA 01-659 de realizar biossorção dos metais, é importante ressaltar que os incrementos de biossorção em função do aumento da concentração do metal em solução não haviam alcançado estagnação, conforme o modelo de Freundlich, sendo possível que a estirpe *C. necator* UFLA 01-659 apresente maiores índices de biossorção para os metais estudados.

4.2 Alocação de metais versus capacidade de biossorção

A alocação dos metais no processo de biossorção revelados pelas eletromicrografias de transmissão (Figura 4) pode auxiliar na elucidação da diferenciação da capacidade de biossorção de células vivas e mortas. Na biossorção de Cu por *Cupriavidus necator* UFLA 01-659 houve uma clara

diminuição da bio sorção por células mortas, ficando evidente que a manutenção da estrutura celular é imprescindível num processo eficiente de bio sorção do metal, já que as células parecem aprisionar o metal entre a membrana e a parede celular.

Porém esta diferenciação entre células vivas e mortas parece variar em função do metal (já que não observamos esta diferenciação para Cd e Zn) e em função da estirpe estudada. *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, por exemplo, não apresentam diferenciação entre células vivas e mortas na bio sorção de níquel, enquanto que *Burkholderia cepacia* e *Chryseomonas luteola* apresentam maior bio sorção por células mortas (Al-Gheethi *et al.*, 2014).

Para Cd e Zn, apesar de um acúmulo bastante evidente destes metais no citossol (Figura 4), a ruptura da estrutura celular em células mortas parece não interferir consideravelmente na capacidade de bio sorção. O que nos indica que a contribuição dos acúmulos de metais no citossol em células vivas é compensada pela maior superfície de contato das partículas de células mortas.

Fan *et al.* (2014) aponta como possíveis locais de interação de Cu com a biomassa de bactérias a ligação com lipoproteínas e interação com proteínas e polissacarídeos. Já os estudos com *Pseudomonas* sp. LKS06 indicam que os grupamentos amina, carboxílicos, fosfatos e hidroxilas podem estar envolvidos no processo de bio sorção de Cd (Huang & Liu, 2013)

5 CONCLUSÕES

A capacidade de bioabsorção de Cd, Cu e Zn pela biomassa da estirpe de *C. necator* UFLA 01-659 foi elevada, tanto por células vivas como mortas, e apresenta potencial de bioabsorção superior ao observado nas concentrações de metais testadas.

A alocação de Cu entre a parede e a membrana celular implicou numa maior bioabsorção do metal por células vivas.

A alocação dos metais na parede e membrana celular, assim como intracelularmente se deu de forma diferenciada para os metais pesados com maior bioabsorção para os metais alocados intracelularmente (Cd e Zn).

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>), Finep, Fapemig, CNPq e Capes pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica. Ao CNPq pelas bolsas de produtividade dos professores Dr. Eduardo Alves e Dra. Fatima Maria de Souza Moreira.

REFERÊNCIAS

AI-GHEETHI, A. A. S.; NORLI, I.; LALUNG, J.; AZLAN, A. M.; FAREHAH, Z. A. N.; KADIR, M. O. A. Biosorption of heavy metals and cephalixin from secondary effluents by tolerant bacteria. **Clean Technologies Environmental Policy**, v. 16, p. 137-148, 2014.

ANSARI, M. I.; MALIK, A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v.98, p.3149-3153, 2007.

CAO, M.; HU, Y.; sun, q.; wang, l.; chen, j.; lu, x. Enhanced desorption of PCB and trace metal elements (Pb and Cu) from contaminated soils by saponin and EDDS mixed solution. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 93-99, 2013.

CHANG, J.S.; LAW, R.; CHANG, C. C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. **Water Research**, v. 31, n. 7, p. 1651-1658, 1997.

CHATTERJEE, S. K.; BHATTACHARJEE, I.; CHANDRA, G. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 117-125, 2010.

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

CHENG, Y.; YANG, C.; HE, H.; ZENG, G.; ZHAO, K.; YAN, Z. Biosorption de Pb(II) ions from aqueous solutions by waste biomass from biotrickling filters: Kinetics, isotherms, and thermodynamics. **Journal of Environmental Engineering ASCE**, DOI:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000956, C4015001, 2015.

FAN, J.; OKYAY, T. O.; RODRIGUES, D. F. The synergism of temperature, pH and growth phases on heavy metal biosorption by two environmental isolates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 236-243, 2014.

FERNÁNDEZ, M. A.; SOULAGES, O. E.; ACEBAL, S. G.; RUEDA, E. H.; SÁNCHEZ, R. M. T. Sorption of Zn(II) and Cu(II) by four Argentinean soils as affected by pH, oxides, organic matter and clay content. **Environmental Earth Science**, v. 74, p. 4201-4214, 2015.

FERREIRA, P.A.A.; BOMFETI, C.A.; SILVA JUNIOR, R.; SOARES, B.L.; SOARES, C.R.F.S.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 85-95, jan 2012.

FERREIRA, P.A.A.; LOPES, G.; BOMFETI, C.A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S.M.; SOARES, C.R.F.S.; GUILHERME, L.R.G; MOREIRA, F.M.S. Leguminous plants inoculated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soil amended with calcium silicate. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 2055-2066, 2013.

GALUNIN, E.; FERRETI, J.; ZAPELINI, I.; VIEIRA, I.; TARLEY, C. R. T.; ABRÃO, T.; SANTOS, M. J. Cadmium mobility in sediments and soil from a coal mining área on Tibagi River watershed: Environmental risk assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 265, p. 280-287, 2014.

GÜLBAZ, S.; KAZEZYILMAZ-ALHAN, C. M.; COPTY, N. K. Evaluation of heavy metal removal capacity of bioretention systems. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 376-389, 2015.

HUANG, L. M.; DENG, C. B.; HUANG, N.; HUANG, X. J. Multivariate statistical approach to identify heavy metal sources in agricultural soil around an abandoned Pb-Zn mine in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. **Environmental Earth Sciences**, v. 68, n. 5, p. 1331-1348, 2013.

HUANG, W.; LIU, Z. M. Biosorption os Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm Kinetic characteristic and mechanism studies. **Colloids and Surfaces B; Biointerfaces**, v. 105, p. 113-119, 2013.

KIM, S. Y.; JIN, M. R.; CHUNG, C. H.; YUN, Y. S.; JAHNG, K. Y.; YU, K. Y. Biosorption of cationic basic dye and cadmium by the novel biosorbent *Bacillus catenulatus* JB-022 strain. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 4, p. 433-439, 2015.

KLONOWSKA, A.; CHAINTREUIL, C.; TISSEYRE, P.; MICHÉ, L.; MELKONIAN, R.; DUCOUSSO, M.; LAGUERRE, G.; BRUNEL, B.; MOULIN, L. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metals-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.81, p.618-635, 2012.

LI, H.; LIN, Y.; GUAN, W.; CHANG, J.; XU, L.; GUO, J.; WEI, G. Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscausicus* strain CCNWHX 72-14, **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 151–159, 2010.

MANASI; RAJESH, V.; KUMAR, A. S. K.; RAJESH, N. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 176-185, 2014.

NAZ, T.; KHAN, M. D.; AHMED, I.; REHMAN, S.; RHA, E. S.; MALOOK, I.; JAMIL, M. Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas* species isolated from sugar industry. **Toxicology and Industrial Health**, DOI: 10.1177/0748233715569900, p. 1-9, 2015.

SALVADORI, M. R.; ANDO, R. A.; OLLER DO NASCIMENTO, C.A.; CORRÊA, B. Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Spress. 1989.

SANTOS, J. V.; VARÓN-LOPÉZ, M.; SOARES, C. R. F. S.; LEAL, P. L.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Biological attributes of rehabilitated soil contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015.

SILVA, K.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F.M.S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p. 175-182, 2012.

YANG, K.; MIAO, G.; WU, W.; LIN, D.; PAN, B.; WU, F.; XING, B. Sorption de Cu²⁺ on humic acids sequentially extracted from a sediment. **Chemosphere**, v. 138, p. 657-663, 2015.

ZHAO, X. L.; JIANG, T.; DU, B. Effect of organic matter and calcium carbonate on behaviors of cadmium adsorption-desorption on/from purple paddy soils. **Chemosphere**, v. 99, p. 41-48, 2014.

ZHOU, Q.; CHEN, Y.; YANG, M.; LI, W.; DENG, L. Enhanced bioremediation of heavy metal from effluent by sulfate-reducing bacteria with copper-iron bimetallic particles. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 413-417, 2013.