

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO
MERCÚRIO E ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
AMBIENTES CONTAMINADOS**

Patricia Giovanella Grazziotin
Bióloga/UCS
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS

Porto Alegre
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO
MERCÚRIO E ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
AMBIENTES CONTAMINADOS**

Patricia Giovanella Grazziotin
Bióloga/UCS
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS

Orientador: Fátima Menezes Bento

Tese apresentada como um dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS), Brasil
Março, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Giovanella Grazziotin, Patricia
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO MERCÚRIO
E ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIÇÃO DE AMBIENTES
CONTAMINADOS / Patricia Giovanella Grazziotin. --
2015.
161 f.

Orientadora: Fátima Menezes Bento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Biorremediação. 2. Metais pesados. 3. Mercúrio.
4. Bactéria . I. Menezes Bento, Fátima, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PATRICIA GIOVANELLA GRAZZIOTIN
BIOLÓGA
UCS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

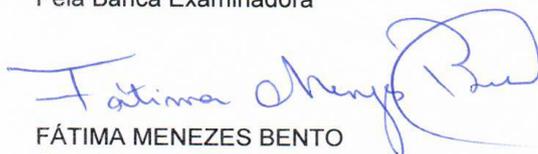
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 31/03/2015
Pela Banca Examinadora



FÁTIMA MENEZES BENTO
Orientador

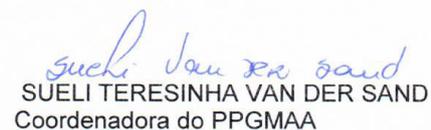


PATRICIA DORR QUADROS
UFRGS



FLAVIO ANASTACIO DE OLIVEIRA CAMARGO
UFRGS

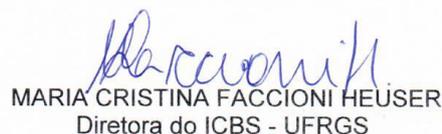
Homologado em: 12/08/2015
Por:



SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA



MARCO FLORES FERRÃO
UFRGS



MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Fátima Menezes Bento pela oportunidade, confiança, incentivo e orientação.

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro ao longo do projeto.

Aos professores do PPGMAA.

À Prof.^a Maria do Carmo Ruaro Peralba, por disponibilizar o equipamento para as análises cromatográficas.

Ao Prof. Flávio Camargo, pela oportunidade de continuar esse projeto e por disponibilizar seu laboratório para as análises.

Ao Prof. Clésio Gianello, por disponibilizar o equipamento de espectrofotometria de absorção atômica e o ICP.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Solos da UFRGS, pela colaboração essencial a este trabalho e amizade.

Aos amigos do laboratório pelo convívio enriquecedor, amizade, companheirismo, apoio e discussões.

Aos amigos, colegas e alunos de Iniciação científica Alexandre Pereira Costa e Naihana Schäffer pelo auxílio com os experimentos, dedicação e companheirismo.

À Dona Marlene, pela amizade, preocupação dispensada a mim e por todo apoio à realização da minha formação.

À minha irmã Angélica e as irmãs que eu escolhi Ana, Marta e Rosele que me ampararam na jornada da vida.

Ao leão, Kuki e Zinho, meus felinos e companheiros inseparáveis.

À minha mãe Irene, pela sua difícil jornada e luta constante, e por tudo que me ensinou sobre a vida.

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO MERCÚRIO E ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS¹

Autor: Patricia Giovanella Grazziotin

Orientador: Fátima Menezes Bento

Resumo

O mercúrio é tóxico, tanto para células eucarióticas quanto para procarióticas, mas alguns micro-organismos possuem mecanismos de resistência a este metal, como a capacidade de reduzir enzimaticamente o mercúrio (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg (0). O objetivo do trabalho foi desenvolver uma estratégia com viabilidade econômica de aporte de carbono para remoção de mercúrio, avaliar o potencial bacteriano de remoção de mercúrio, cádmio, níquel e chumbo de ambientes contaminados (efluentes industriais) e identificar os distintos mecanismos de resistência envolvidos na resistência bacteriana aos metais. Oito isolados foram capazes de remover mercúrio e degradar o glicerol. Os melhores resultados para remoção de Hg e degradação do glicerol foram obtidos utilizando os isolados *Serratia marcescens* M25C (85 e 100%), *Klebsiela pneumoniae* PLB (90 e 100%), *Klebsiela oxytoca* U14 (90 e 100%) e *Arthrobacter sp.* U3 (80 e 65%) adicionando 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura. O isolado *Pseudomonas sp.* B50D foi o que apresentou melhor desempenho quando avaliada remoção de mercúrio concomitante a outros metais. Sua capacidade de remover Hg na presença de Cd foi de 75%, Ni e Pb (91%). Esse isolado removeu 60% (Cd), 90% (Ni) e 85% de Pb. *Pseudomonas sp.* B50D apresenta como mecanismos de resistência aos metais a redução, bioissorção, produção de biofilme e produção de sideróforos. Foi demonstrado que o pH do efluente influencia a capacidade dos isolados *Pseudomonas sp.* B50A e *Pseudomonas putida* V1 removerem Hg, sendo que o pH 6 teve a melhor resposta de remoção. A capacidade dos isolados e do consórcio removerem mercúrio do efluente variou de 70 a 75%. Porém, com a adição de múltiplos metais no efluente a remoção do mercúrio foi inibida. Este trabalho demonstrou a viabilidade da utilização de glicerol residual como fonte de carbono para remoção biológica do Hg e o potencial do isolado *Pseudomonas sp.* B50D para remediação de contaminações mais complexas. Os isolados *Pseudomonas sp.* B50A e *Pseudomonas putida* V1 são recomendados para o tratamento de efluentes industriais contaminados com mercúrio, porém contaminações mais complexas (com outros metais) exigem a utilização concomitante de outros isolados bacterianos ou ainda outros métodos não avaliados neste estudo.

Tese de doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil (161p.) Março, 2015

CHARACTERIZATION OF MERCURY RESISTANT BACTERIA AND STRATEGIES FOR BIOREMEDIATION OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION¹

Author: Patricia Giovanella Grazziotin

Adviser: Fátima Menezes Bento

Abstract

Mercury is toxic to eukaryotic cells and prokaryotic, but some microorganisms possess mechanisms of resistance to this metal, as the ability to enzymatically reduce the mercury (II) to the volatile and less toxic form of mercury Hg (0). The goal of this study was to evaluate the potential for bacterial removal of mercury, cadmium, nickel and lead from industrial wastewater and to identify the different resistance mechanisms involved in bacterial resistance to metals. Eight strains were able to remove mercury and degrade glycerol. The best results for the removal of mercury and glycerol degradation isolates were respectively obtained using *Serratia marcescens* M25C (85 and 100%), *Klebsiella pneumoniae* NBP (90 and 100%), *Klebsiella oxytoca* U14 (90 and 100%) and *Arthrobacter* sp. U3 (80 and 65%) by adding 0.5 g L⁻¹ yeast extract. *Pseudomonas* sp. B50D showed the best result to concomitant mercury removal with other metals. Its ability to remove mercury in the presence of Cd was 75% to Ni and Pb was 91%. This bacterial isolate removed 60% of Cd, 90% of Ni and 85% of Pb from the effluent contaminated with mercury. The metals resistance mechanisms to metals reduction suggested to *Pseudomonas* sp. B50D were biosorption, biofilm production and production of siderophores. It has been shown that the effluent pH influences the ability of the isolated *Pseudomonas* sp B50A and *Pseudomonas putida* V1 remove Hg, and pH 6 had better removal response. The consortium removal mercury from the effluent ranging from 70 to 75%. However, with the addition of multiple metals in the effluent mercury removal was inhibited. This study demonstrated the feasibility of using residual glycerol as carbon source for the biological removal of mercury and the potential of the isolated *Pseudomonas* sp. B50D for remediation of complex contamination. The strains *Pseudomonas* sp. B50A and *Pseudomonas putida* V1 are recommended for the treatment of industrial wastewater contaminated with mercury, but a complex contamination (with other metals) require the concomitant use of other bacterial isolates or other methods that were not evaluated in this study.

¹ Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (161p.) March, 2015.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Ocorrência e fontes de exposição ao mercúrio.....	5
2.2 Toxicologia do mercúrio.....	7
2.3 Dinâmica do mercúrio no ambiente.....	9
2.4 Contaminação da água pelo mercúrio	13
2.5 Transformação microbiana do mercúrio	15
2.6 Mecanismos de resistência microbiana ao mercúrio.....	16
2.7 Mecanismos de resistência microbiana aos metais	21
2.7.1 Biofilmes.....	21
2.7.2 Sideróforos.....	24
2.7.3 Bioacumulação e Biossorção.....	26
2.8 Referências bibliográficas.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1 Resultados I.....	39
3.2 Resultados II.....	71
3.3 Resultados III.....	103
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS.....	136
5. CONCLUSÕES.....	147
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1.** O ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente. Setas sólidas representam transformação ou absorção de mercúrio. Setas ocas indicam fluxo de mercúrio entre diferentes compartimentos no ambiente. A largura das setas indicam a importância relativa do fluxo na natureza. A especiação de Hg (II) em águas anóxicas ou em presença de oxigênio é controlada por cloro, hidróxidos e enxofre. Transformações mediadas por microrganismos são representadas por círculos que representam bactérias. SRB para bactérias sulfato redutoras, *merB* e *merA* referem-se a atividade dos genes que codificam as enzimas organomercurio liase e mercúrio redutase respectivamente. Um grupo de pontos indica o envolvimento de algas unicelulares 10
- FIGURA 2.** Modelo de resistência do operon *mer* típico de bactérias Gram-negativas. O símbolo (•) indica resíduos de cisteínas. O X refere-se a um solvente nucleofílico genérico. RSH é um grupo thiol de baixo peso molecular como a glutationa. Genes ou proteínas entre parênteses indicam que não ocorre em todos os exemplos de operon *mer* (Adaptado de Barkay et al., 2003)..... 20

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente expansão tecnológica e industrial dos diferentes setores na sociedade moderna, há um incremento da quantidade e complexidade dos resíduos tóxicos produzidos. O descarte de resíduos com elevada toxicidade fora dos padrões da legislação ambiental vigente, bem como a sua incorreta manipulação nos diversos ecossistemas naturais, ocasionam danos ao ambiente.

A contaminação dos ecossistemas por metais é um dos principais objetos de estudo das ciências relacionadas com o ambiente. Isso se deve ao fato de que essas substâncias químicas apresentam alta toxicidade e propriedades de acumulação nos organismos. Os resíduos gerados pela indústria podem conter um ou mais metais tóxicos, o que da origem a efluentes quimicamente complexos. Esses efluentes merecem particular atenção por serem extremamente recalcitrantes e por serem potenciais poluidores de corpos hídricos. O mercúrio destaca-se neste contexto, por se tratar de um poluente que circula no ar, na água e no solo; por sua alta toxicidade e pela biomagnificação na cadeia alimentar. Este metal é liberado ao ambiente a partir de fontes naturais e antrópicas, como a mineração de ouro e prata, indústrias de cloro e soda, petrolífera, eletrônica e baterias.

A remediação de ambientes contaminados com cátions metálicos tóxicos tem empregado convencionalmente técnicas físico-químicas que são pouco eficazes, tem alto custo de operação e geralmente produzem resíduos adicionais com potencial de contaminação. Nos últimos anos, têm se dado maior atenção aos métodos biológicos de remediação de metais pesados, devido ao baixo custo de operação, alta eficiência de remoção, bom desempenho em baixas concentrações de metais e por serem alternativas mais ecologicamente corretas. Neste contexto, as bactérias são candidatas promissoras por apresentarem sistemas especializados de resistência aos metais. Entre os mecanismos de resistência aos metais, alguns deles como bioacumulação, bioissorção, redução, produção de sideróforos e formação de biofilmes, os quais podem ser explorados para o desenvolvimento de tecnologias limpas de controle da poluição por metais visando promover a mitigação dos impactos ambientais.

A utilização do potencial microbiano para a detoxificação de contaminantes ambientais no processo chamado biorremediação no Brasil é insipiente, dada à abordagem simplificada desta nova disciplina. A maioria dos estudos referidos como de biorremediação, referem-se apenas a avaliação superficial da capacidade biotransformadora/biorremovedora de comunidades microbianas. O efeito de diferentes técnicas para a biorremediação, utilizando a capacidade de redução enzimática do Hg e bioissorção; biofilmes microbianos, aplicação de consórcios microbianos combinando mecanismos de resistência e o uso de fontes alternativas de carbono podem incrementar significativamente a descontaminação do ambiente.

Neste trabalho foi conduzido um estudo da biorremediação de ambientes contaminados com mercúrio, com o desenvolvimento e a avaliação conjunta de tecnologias que utilizam os recursos genéticos da microbiota do ambiente. Ao mesmo tempo que, busca contribuir para o avanço do conhecimento acerca da aplicabilidade dessas tecnologias no tratamento de efluentes industriais contaminados com metais.

Sendo assim, os objetivos gerais desta tese foram desenvolver uma estratégia com viabilidade econômica para remoção de mercúrio de ambientes contaminados e com baixa concentração de carbono, demonstrar experimentalmente a real aplicabilidade da utilização de micro-organismos na biorremoção de mercúrio, identificar os distintos mecanismos de resistência que podem estar envolvidos na resistência bacteriana ao Hg e a outros metais.

Objetivos Específicos:

- Analisar o comportamento das bactérias quanto ao crescimento, remoção de mercúrio e degradação do glicerol residual em meio mineral;
- Identificar a presença dos genes *merA* e *merB* nos isolados bacterianos resistentes ao mercúrio;
- Estudar o impacto da co-contaminação com outros metais na remoção do mercúrio pelos isolados;
- Avaliar a capacidade de remoção de mercúrio e outros metais em meio de cultivo e efluente por bactérias prospectadas em ambientes contaminados;
- Demonstrar a mudança na estrutura da comunidade microbiana durante a remoção do mercúrio de efluentes;

- Avaliar a produção de sideróforos e biofilmes pelos isolados e determinar a bioadsorção e bioacumulação de metais.

Nesse sentido, três estudos foram elaborados:

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ocorrência e fontes de exposição ao mercúrio

O mercúrio ocorre naturalmente no ambiente em diferentes espécies químicas. As principais formas de mercúrio são: elementar, orgânica e inorgânica. Essas por sua vez apresentam solubilidade, reatividade e toxicidade distintas, causando diferentes impactos no ecossistema e na saúde humana (UNEP, 2002). O mercúrio é raramente encontrado como elemento livre na natureza, estando em baixas concentrações e distribuído de forma ampla por toda crosta terrestre (Pirrone & Maffey, 2005).

As fontes mais importantes para extração de mercúrio são as reservas de minério de cinábrio (HgS), encontradas em rochas próximas de atividades vulcânicas recentes, em fraturas minerais e em áreas próximas de fontes de águas termais. Uma das principais reservas deste elemento encontra-se nas minas de Almadén, na Espanha, a qual está em operação desde 400 d.C. Além desta, existem outras minas de expressão na Itália, Iugoslávia, Rússia, América do Norte, Japão, Filipinas, China, Turquia e Irlanda (Biester et al., 1999).

Esse elemento é liberado para o ambiente por inúmeras fontes naturais e antropogênicas (Pirrone & Maffey, 2005), sendo que aproximadamente 75% da contaminação global pelo Hg se deva a atividades antropogênicas (Mason &

Fitzgerald, 1996). Na china, a quantidade de mercúrio emitida aumentou significativamente nas últimas décadas, podendo influenciar os valores da emissão mundial do mercúrio (Jiang et al., 2006). Uma das principais fontes de emissão de Hg na China são as indústrias de fabricação de cloreto de polivinila (Ren et al., 2014). Na América do Sul, um dos mais importantes usos do mercúrio diz respeito à extração do ouro, devido à sua capacidade de formar liga com esse metal (Verbel & Restrepo, 2002). No Brasil as principais fontes de emissão antrópica de mercúrio são os garimpos de ouro, responsáveis por mais de 65% do total das emissões. Também foi constatada uma contribuição significativa das indústrias de aço e ferro (10,4%), do cloro (10,1%) e das queimadas (7,5%) (Lacerda,1997).

Estimativas mostram que as fontes antropogênicas de mercúrio são responsáveis pela liberação de 2250 toneladas ao ano desse poluente na atmosfera, enquanto que fontes naturais como vulcões, corpos aquáticos, solo e vegetação liberam 2700 toneladas ao ano (Pirrone et al., 2001). As indústrias de equipamentos elétricos, cloro-soda e pintura contribuem com aproximadamente 55% do total de Hg antropogênico liberado (WHO, 1989). Outra fonte bastante comum de mercúrio são os compostos de petróleo e seus derivados. A concentração de mercúrio em petróleo bruto e derivados é altamente dependente da localização geológica do poço de extração, variando de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ a 10 mg L^{-1} (Wilhelm & Bloom, 2000).

2.2 Toxicologia do mercúrio

O mercúrio se apresenta em três formas químicas na natureza: mercúrio inorgânico elementar (vapor ou líquido, não reativo), sais ou minerais mercuriais inorgânicos e mercuriais orgânicos. No ambiente, essas formas de mercúrio são transformadas, e o contato com qualquer uma delas pode produzir toxicidade (UNEP, 2002). A toxicidade do mercúrio depende da espécie química, porém todas elas possuem em comum a capacidade de danificar o funcionamento do sistema nervoso (Clarkson, 2002).

As propriedades químicas mais importantes que explicam grande parte dos danos biológicos causados pelo mercúrio são a elevada afinidade que esse metal possui pelo enxofre e a facilidade com que ele forma ligações covalentes com este elemento. Quando o enxofre está presente como grupo sulfidrila de proteínas, o mercúrio divalente substitui o átomo de hidrogênio para formar mercaptanas do tipo X-Hg-SR e Hg-SR, onde X é um grupo eletronegativo e R é um aminoácido como a cisteína, enquanto que os mercuriais orgânicos formam ligações do tipo RHg-SR. Deste modo, mesmo em baixas concentrações no organismo, o mercúrio interfere no metabolismo e nas funções celulares (Verbel & Restrepo, 2004).

O mercúrio elementar é considerado a forma química desse metal menos tóxica ao organismo (Barkay et al., 2003). Ele é pouco absorvido pelo sistema gastro intestinal, de forma que é quase completamente eliminado e sua ingestão é tida como sem consequência. No entanto, quando inalado, atravessa a membrana alveolar e atinge a circulação sanguínea. Na circulação,

ainda na forma metálica, cruza as barreiras das membranas celulares atingindo especialmente o cérebro (Nascimento & Chasin, 2001).

O sistema nervoso central é o órgão crítico na exposição aos vapores de mercúrio, causando uma série de alterações psíquicas como depressão, insônia, dificuldade para concentração, diminuição da memória, tristeza, confusão, fadiga, perda do apetite, fobias e sudorese (Picazo & Fernandez, 2000).

Os sais inorgânicos de mercúrio são muito corrosivos para o trato gastro-intestinal, olhos, pele e mucosa. Como consequência ao seu contato pode ocorrer hematemese, colite, hematoquesia, ardor, salivação excessiva, diarreia sanguinolenta, necrose da mucosa intestinal, desidratação e colapso cardiovascular (WHO, 1990). Os efeitos sobre os rins e os efeitos neurotóxicos são considerados como os mais importantes numa avaliação de risco pela exposição aos compostos de mercúrio inorgânico (UNEP, 2002). Ainda que os distúrbios neurológicos estejam mais relacionados à contaminação por mercúrio orgânico (principalmente metilmercúrio), estudos têm demonstrado uma relação do mercúrio inorgânico com sintomas neurológicos, como a insônia, baixa estima, perda da memória, irritabilidade e dificuldade na concentração (Pirrone & Mahaffey, 2005).

Dentre os compostos contendo mercúrio, os orgânicos, especialmente o metilmercúrio é considerado o mais tóxico, e é o responsável pelos danos mais importantes à saúde humana. A toxicidade dos compostos organomercuriais é devida a sua alta estabilidade química, solubilidade em

lipídeos, afinidade pelas proteínas, excreção lenta e facilidade de absorção pelo trato gastrointestinal (Kerper, 1992).

O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde afeta principalmente áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. Intoxicações por metilmercúrio se caracterizam por ataxia, problemas na articulação das palavras, perda da sensibilidade nas mãos, pés e em torno da boca, constrição do campo visual e perda da audição. Em estágios de contaminação severa se observa coma e morte (Clarkson, 2002).

2.3 Dinâmica do mercúrio no ambiente

Na atmosfera, o mercúrio pode se apresentar sob várias formas, nem todas identificadas, pois o seu ciclo global é complexo (Figura 1). A forma química do mercúrio influencia significativamente o seu transporte, pois enquanto algumas formas ligam-se a partículas pesadas e se depositam, o mercúrio elementar pode percorrer longas distâncias. O tempo médio de residência do mercúrio na forma de vapor na atmosfera é estimado entre quatro meses e quatro anos (WHO, 1991). Desta forma, os níveis de mercúrio nas regiões mais remotas do planeta, como nas águas do Ártico, não diferem expressivamente em relação aos níveis das regiões meridionais (Clarkson, 2002).

O mercúrio elementar presente na atmosfera pode ser oxidado dando origem a compostos como óxido de mercúrio (HgO) e cloreto de mercúrio (HgCl_2). Essas substâncias são menos voláteis e mais solúveis que o mercúrio metálico, de modo que, são facilmente depositadas nos particulados da atmosfera ou solubilizadas no vapor de água das nuvens (Munthe et al.,

1991). De acordo com World Health Organization (WHO, 1990) mesmo havendo a diminuição da atividade antropogênica desse metal, haverá contínua contaminação do ambiente pelo processo natural de desgaseificação da crosta terrestre, evaporação dos oceanos e mineração de chumbo, cobre e zinco.

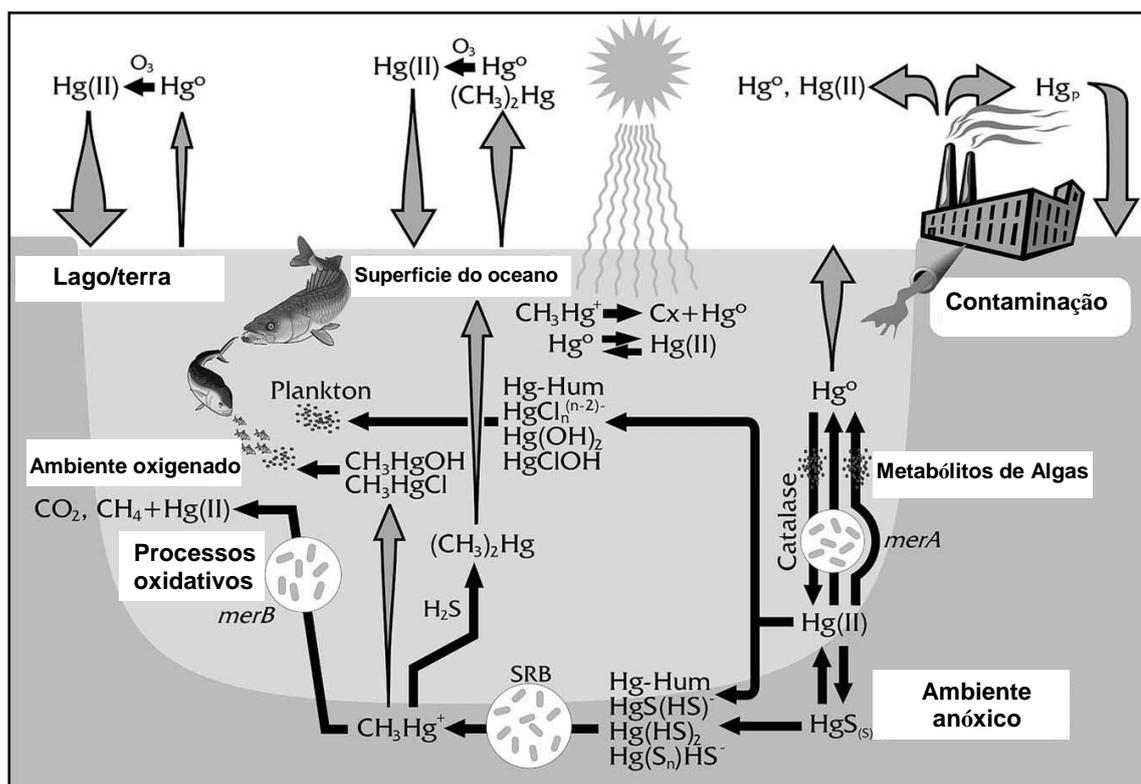


FIGURA 1. O ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente. Setas sólidas representam transformação ou absorção de mercúrio. Setas ocas indicam fluxo de mercúrio entre diferentes compartimentos no ambiente. A largura das setas indica a importância relativa do fluxo na natureza. A especiação de Hg (II) em águas anóxicas ou em presença de oxigênio é controlada por cloro, hidróxidos e enxofre. Transformações mediadas por micro-organismos são representadas por círculos que representam bactérias. SRB para bactérias sulfato redutoras, *merB* e *merA* referem-se a atividade dos genes que codificam as enzimas organo mercúrio liase e mercúrio redutase respectivamente. Um grupo de pontos indica o envolvimento de algas unicelulares. (Adaptado de Barkay et al., 2003).

Dependendo do tipo de solo, pode ocorrer retenção e armazenamento de mercúrio, devido à forte ligação desse metal com a matéria orgânica. Por causa deste comportamento, somente quando ligado aos sólidos em suspensão ou ao húmus, ele se torna suscetível a ser transportado pela

água. Por esta razão, o mercúrio acumulado pode ser liberado para a água por longos períodos de tempo (UNEP, 2002; Bisinoti & Jardim, 2004).

O mercúrio é acumulado no horizonte superficial do solo que possui maior conteúdo de matéria orgânica, razão pela qual os solos orgânicos possuem níveis mais altos de mercúrio, quando comparados aos solos minerais. Em solos com $\text{pH} > 5,5$, o ferro e a argila participam mais eficientemente na adsorção de Hg (II) sendo que a máxima adsorção ocorre em $\text{pH} 7$, enquanto que em solos ácidos com pH inferior a 4 essa retenção não é significativa (Lacerda et al., 1999).

O potencial redox, o pH e a concentração de cloro estão diretamente relacionadas com as transformações químicas que o mercúrio sofre no solo. Dependendo das condições de oxi-redução do sistema, podem ocorrer as formas Hg^0 e Hg (II) .

A maior parte do Hg (II) está confinada nos minerais do solo ou adsorvida em superfícies sólidas, inorgânicas e orgânicas. Outra propriedade importante do mercúrio é a sua habilidade em formar complexos com o íon sulfeto, fazendo com que a forma iônica seja estável na presença de H_2S e HS^- , em condições redutoras (Melamed & Villas Boas, 2002).

No ambiente aquático, o mercúrio contribui com emissões pontuais diretas, erosão, lixiviação e deposição atmosférica sendo que a principal fonte diz respeito à deposição úmida (chuvas). As diferentes espécies de mercúrio introduzidas no sistema aquático são distribuídas e reguladas por processos químicos, biológicos e físicos que ocorrem nas interfaces ar/água e água/sedimento. Na água, as concentrações são em média de 10 partes por

trilhão, já em sedimentos, a concentração natural é de 200 mg L^{-1} . Isto se dá pela grande afinidade do mercúrio por partículas em suspensão que o transportam até o sedimento (Alexandre, 2006). A forma predominante de mercúrio nos sistemas aquáticos é a oxidada Hg (II), que pode ser convertida a mercúrio elementar ou metilmercúrio por processos bióticos e abióticos. Em ambientes anaeróbios, a matéria orgânica pode reduzir Hg (II) a Hg^0 , enquanto que o processo inverso é observado em ambientes aeróbios (USEPA, 1997; North, 1999; Queiroz, 1995; Mayasa, 2001; Alexandre, 2006). Em ambientes aquáticos, a distribuição, a natureza e a biodisponibilidade do Hg são controladas por fatores como: a temperatura e a turbidez da água e as quantidades de argila, fósforo, carbono, enxofre e ferro. Em corpos hídricos aeróbios os complexos solúveis de mercúrio são adsorvidos e removidos pela sedimentação, enquanto que nos sedimentos anaeróbios, os compostos de Hg precipitados são convertidos em sulfeto de mercúrio (HgS), forma altamente insolúvel, impossibilitando assim a sua reciclagem (UNEP, 2002; Alexandre, 2006).

O mercúrio confinado nos sedimentos dos oceanos, lagos e rios pode permanecer ativo por vários anos e sofrer a ação de agentes orgânicos, como ácidos húmicos e fúlvicos, que quelam as espécies insolúveis e solúveis na água, precipitando-os diretamente da solução para o sedimento (Bisinoti & Jardim, 2004). A metilação abiótica do mercúrio no ambiente e sua contribuição para a produção de metilmercúrio é um assunto contestado. Trabalhos mostram que os responsáveis pela metilação abiótica incluem os ácidos fúlvicos, húmicos e carboxílicos (Barkay et al., 2003). A metilação do mercúrio

é importante em razão da sua biomagnificação na cadeia alimentar, causada pela grande afinidade do metil mercúrio pelas proteínas (Micaroni et al., 2000; Azevedo, 2003).

2.4 Contaminação da água pelo mercúrio

Um dos problemas de poluição considerado de difícil resolução é a contaminação das águas com metais pesados. Estes poluentes, presentes nos efluentes de várias atividades industriais (Gavrilescu, 2004), são tidos como os mais importantes contaminantes inorgânicos devido à recalcitrância e persistência no ambiente (Parvathi et al., 2007).

Os efluentes das indústrias petroquímicas, eletrônicas, metalúrgicas, de PVC, tintas e cloro-soda, podem conter elevadas concentrações de metais pesados (Veglio et al., 2000; Zouboulis et al., 2004) cuja descarga, sem um tratamento adequado, para cursos de água superficiais tem como consequência a acumulação de metais nas águas e nos sedimentos (Malik, 2004). O mercúrio destaca-se como um problema ambiental de maior importância, pois ele é bioacumulado ao longo da cadeia trófica causando diferentes impactos no ecossistema e na saúde do homem (UNEP).

O caso mais conhecido de contaminação ambiental causada pelo mercúrio ocorreu no Japão na baía de Minamata. Efluentes gerados por uma indústria de acetaldeído e PVC foram lançados durante décadas na baía, levando a contaminação do ambiente e dos peixes causando a doença de Minamata em seres humanos pela ingestão de peixe contaminado. A doença de minamata matou mais de 100 pessoas e contaminou milhares ao redor Baía

de Minamata e do Mar adjacente Yatsushiro desde 1956 (Kudo et al., 1998; Harada, 2005).

No Brasil são relatados muitos casos da presença de mercúrio em corpos hídricos (em rios e mares). Em águas doces temos: CAMARA e colaboradores (1996), em estudos em Poconé, no Mato Grosso, constataram contaminação decorrente a prática do garimpo; MEYER e colaboradores (1998) relataram que uma fábrica de cloro-álcali lançou grandes quantidades de Hg no rio Botafogo, um dos principais tributários do canal de Santa Cruz em Recife, Pernambuco, até o ano de 1991; em Cubatão, São Paulo, em 1998, análises de sedimentos do rio Cubatão e de efluentes industriais da Carbocloro, evidenciaram presença de mercúrio (Azevedo, 2003). Já em águas marinhas, têm sido registrados casos de poluição por mercúrio, como decorrência de atividades industriais nos estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro (Eysing et al, 1988; Kehrig et al, 1998).

Os riscos ambientais de longo prazo associados aos metais focaram as atenções para o controle dos despejos industriais e a remoção de soluções aquosas se tornou um desafio para o século XXI (Volesky, 2001). No caso do mercúrio os efluentes devem ser tratados na fonte de emissão, evitando a descarga nos corpos hídricos, já que o mesmo pode levar tempo muito longo ou até mesmo séculos para sistemas aquáticos atingirem níveis relativamente seguros de contaminação (Miserocchi et al., 1993; Krom et al., 1994).

2.5 Transformação microbiana do mercúrio

Além da contribuição dos processos abióticos nas transformações do mercúrio inorgânico, deve-se destacar o papel dos micro-organismos na redução do Hg. A enzima mercúrio redutase num processo de detoxificação transforma Hg (II) em Hg⁰, a forma menos tóxica de mercúrio. A oxidação de Hg⁰ a Hg (II) também pode ocorrer bioticamente na presença de micro-organismos aeróbios pela ação da enzima catalase (Verbel & Restrepo, 2002).

Em ambientes aeróbios ou anaeróbios, o metilmercúrio pode ser formado pelo metabolismo microbiano. A metilação é influenciada por uma variedade de fatores ambientais, como: temperatura, concentração de bactérias no meio, pH, tipo de solo ou sedimento e condições de oxi-redução do meio (Nascimento & Chasin, 2001; Azevedo, 2003). A taxa de síntese biológica do metilmercúrio é determinada principalmente pela concentração, forma química do Hg, composição das espécies microbianas e pelo tamanho da população natural capaz de metilar (Azevedo, 2003).

A metilação e demetilação do metilmercúrio podem ocorrer na interface água-sedimento, sedimento ou ainda na coluna de água (Zhang & Planas, 1994). Alguns dos gêneros de bactérias resistentes responsáveis pela demetilação do mercúrio são: *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Staphylococcus* (Barkay et al., 2003). Esses micro-organismos produzem a enzima organo mercúrio liase, que catalisa o rompimento da ligação entre o carbono e o mercúrio, dando origem a Hg (II) e CH₄. Posteriormente, a enzima mercúrio redutase pode transformar o Hg (II) em Hg⁰ (Barkay et al., 2003; Barkay & Wagner-Döbler, 2005; Silver & Hobman, 2007).

2.6 Mecanismos de resistência microbiana ao mercúrio

Os estudos da resistência bacteriana ao mercúrio iniciaram há pelo menos cinco décadas. O sistema que envolve a defesa bacteriana contra esse metal extremamente tóxico e seus derivados orgânicos, tem sido estudado em nível genético e bioquímico, devido ao seu papel na biorremediação ambiental e no biomonitoramento. Os genes que codificam as proteínas de resistência ao mercúrio ocorrem nos plasmídeos e transposons, em diferentes formas de arranjos, que podem envolver reguladores, transportadores e vários replicons dentro das células (Barkay et al., 2003).

Nos micro-organismos, a resistência à maioria dos metais normalmente ocorre por efluxo, a fim de remover metais do citoplasma e sequestro extracelular do contaminante. Com o mercúrio, os micro-organismos utilizam o sistema *mer*. O operon *mer* é um sistema genético regulado, constituído por quatro a cinco genes estruturais, que codificam proteínas de transporte de mercúrio, transformação e regulação dos genes (Silver & Hobman, 2007).

Tem sido proposto que a expressão do operon *mer* é minuciosamente controlada pela proteína reguladora MerR codificada pelo gene *merR*. Esse regulador é um ativador dos genes estruturais na presença de mercúrio, um repressor dos genes estruturais na ausência desse metal e um regulador da sua própria síntese (Brow et al., 2003). Três resíduos de cisteínas são conservados em todas as proteínas MerR, sendo confirmado que esse é o sítio de ligação do Hg o qual tem alta afinidade pelos resíduos cisteína (Ross et al., 1989).

Na ausência de Hg II dentro da célula, a proteína MerR se liga como um homodímero com o promotor, o qual é uma região de dupla simetria chamada MerO (operador), situada a montante do gene *merT* entre os sítios de reconhecimento da RNA polimerase do promotor dos genes estruturais (Pt) (Summers, 1992). O *merR* possui um promotor próprio (Pr) que é lido divergentemente de Pt, sobrepondo-se com o mesmo, de forma a ocupar o espaço do operador (MerO) e conseqüentemente a transcrição dele mesmo (*merR*) pela RNA polimerase (regulador negativo) (Barkay et al., 2003). MerR pode se ligar às subunidades da RNA polimerase na região do promotor (Pt) mesmo na ausência do indutor Hg deformando a região, de modo que se estabelece um estado estável de não transcrição (Ansari et al., 1991; Ansari et al., 1995).

O parágrafo acima descreve um mecanismo clássico de controle em bactérias, a regulação negativa, onde uma proteína repressora se liga ao operador, impedindo que a RNA polimerase inicie a transcrição, e, portanto a expressão gênica é inativada. O mercúrio iônico quando presente, se liga ao domínio C-terminal da MerR com alta especificidade (Summers, 1992), provocando uma alteração alostérica na proteína que está ligada ao DNA da região do operador, conduzindo a relaxamento na região do DNA do operador liberando o acesso da RNA polimerase. Como resultado ocorre o alinhamento e a transcrição dos genes estruturais do operon *mer* (Brow et al., 2003). Nesse caso o mercúrio atua como um indutor, de modo que a transcrição é estimulada assim que o indutor é reconhecido dentro da célula.

Além do gene regulador *merR* existe ainda o gene *merD* que é uma fase de leitura aberta (ORF), rica em cisteína encontrada a jusante do *merA* (Brown et al., 1986). Seu produto, a proteína MerD possui uma região N-terminal similar a MerR, no entanto ao contrário da MerR ela é traduzida em quantidades muito pequenas (Lee et al., 1989). Deleções desse gene demonstraram não ter qualquer efeito sobre o fenótipo resistente ao mercúrio (Nucifora et al, 1990). *In Vitro*, foi demonstrado que MerD forma um complexo ternário com MerOP e MerR, de modo a deslocar MerR-Hg do operador, permitindo a síntese de MerR livre de Hg, o qual desliga a indução dos genes do operon *mer* (Champier et al., 2004). Essa proteína antagonista de MerR parece ser importante para desligar a transcrição do operon *mer* quando a concentração celular de mercúrio estiver muito baixa. Já que, devido a alta afinidade de MerR ao Hg, a repressão do operon não é rápida o suficiente .

Em bactérias Gram-negativas, uma MerP (proteína mercúrio periplasmática) utiliza dois resíduos de cisteína para deslocar Hg(II) até o contato com os resíduos proximais de cisteína da MerT (proteína da membrana interna) (Figura 2). Esse resíduo de cisteína está localizado na primeira hélice transmembrana. Após esse passo, o Hg interage com o par distal de cisteína da MerT e é transportado através da membrana até o citosol da célula, onde sofrerá a redução pela ação da mercúrio redutase (MerA) (Brown et al., 2002). Neste contexto, o papel das cisteínas nas proteínas Mer é crucial, já que o sistema de importação de mercúrio, da região extracelular para o interior da célula ocorre ao longo de uma cascata de pares de cisteína de diferentes

proteínas até o sítio ativo da mercúrio redutase, localizada no citoplasma (Silver & Hobman, 2007).

A mercúrio redutase (MerA) é uma oxidoreductase flavina disulfídeo (~120 KDa), que atua como um dímero e é constituída por três domínios. A estrutura tridimensional da enzima indica que o sítio ativo é formado pela interação do domínio central de uma subunidade, com o domínio C-terminal da outra (Schiering et al., 1991, citado por Barkay & Wagner-Dobler, 2005). O domínio central, descrito como um grupo de oxidoreductase piridina nucleotídeo disulfídeo, é o local onde ocorre a catálise e transferência de dois elétrons de NADPH através de FAD para Hg (II). Neste local, existe um par de cisteínas redox ativas que perfaz a reação de transferência de carga. Um domínio C-terminal, encontrado exclusivamente na enzima mercúrio redutase, e não em outras oxidoreductases, em conjunto com o domínio central, constituem o núcleo da enzima MerA (Engst & Miller, 1999). Por fim, existe um domínio N-terminal que tem a função de dirigir o Hg (II) até o sítio ativo da MerA. Esse domínio é essencial em células com baixas concentrações de agentes sulfídricos, onde a oferta de Hg (II) tiolado pode ser limitada (Barkay & Wagner-Dobler, 2005).

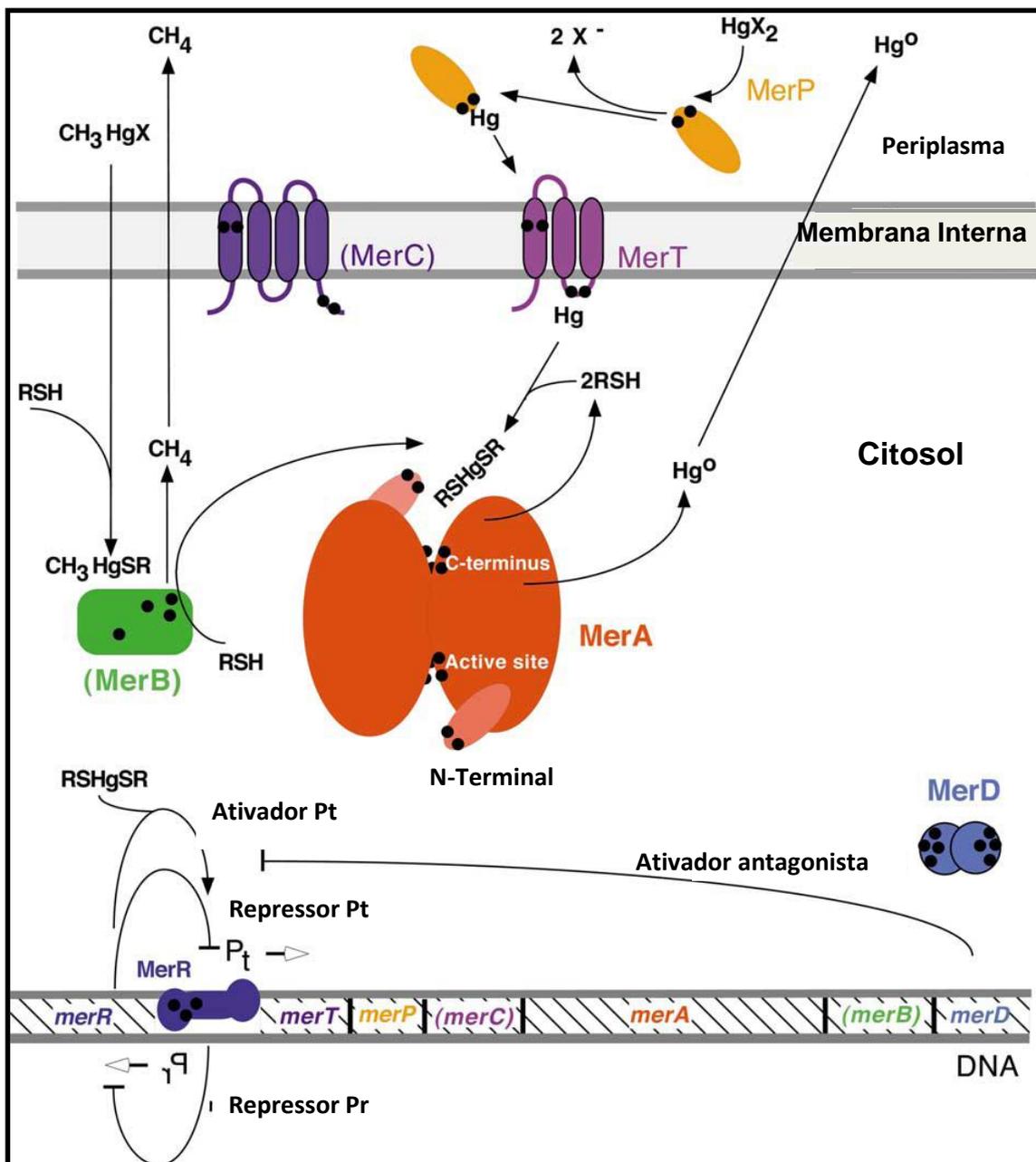


FIGURA 2. Modelo de resistência do operon *mer* típico de bactérias Gram-negativas. O símbolo (•) indica resíduos de cisteínas. O X refere-se a um solvente nucleofílico genérico. RSH é um grupo tiol de baixo peso molecular como a glutatona. Genes ou proteínas entre parênteses indicam que não ocorre em todos os exemplos de operon *mer* (Adaptado de Barkay et al., 2003).

A organomercurio liase (MerB) é uma enzima monomérica de 22,4 kDa codificada pelo gene *merB*. Essa enzima catalisa a clivagem das formas organomercuriais como o metilmercúrio e fenilmercúrio (Begley & Eaclick,

2004). Três cisteínas são conservadas na MerB, a Cys 96, Cys 117 e Cys 159, sendo a Cys 96 e Cys 159 necessárias para a plena atividade *in vitro* (Pitts e Summers, 2002; Benison et al., 2004). Quatro passos são necessários para a clivagem e liberação de Hg^{2+} dos organomercuriais. Inicialmente, a Cys 159 forma um tiol covalente com o organomercúrio, em seguida o organomercúrio se liga também a Cys 96, que libera os prótons necessários para a quebra da ligação C-Hg. Nessa reação ocorre a formação dos compostos metano a partir da quebra de metilmercúrio e benzeno a partir de fenilmercúrio. O Hg então é liberado pelas Cys 96 e 159 na forma de Hg^{2+} e é transferido por meio de tióis solúveis ou talvez diretamente ao domínio C-terminal da mercúrio redutase, onde é transformado em Hg^0 (Benison et al., 2004; Barkay et al., 2003).

2.7 Mecanismos de resistência microbiana aos metais

2.7.1 Biofilmes

Biofilmes são aglomerados de células microbianas ligadas a uma superfície. Eles ocorrem em quase todos os ambientes úmidos onde ocorre fluxo de nutrientes, micro-organismos e uma superfície de ligação (Stewart & Franklin, 2008). O biofilme pode existir a partir de comunidades de uma espécie, ou ainda como associação de comunidades heterogêneas contendo fungos, bactérias, algas e protozoários (Sutherland, 2001). Ele pode ser definido como um conjunto de micro-organismos envolvidos numa matriz que consiste de uma mistura de compostos poliméricos, principalmente polissacarídeos conhecida como substância polimérica extracelular (EPS) (Abee et al., 2011). Além de polissacarídeos, os biofilmes contêm proteínas,

ácidos nucleicos, lipídeos, metabólitos secretados, produto de lise celular, substâncias húmicas e partículas do próprio ambiente circundante (Flemming, 1997; Flemming & Wingender, 2010). A composição e quantidade de EPS pode variar dependendo do micro-organismo, idade do biofilme e das condições ambientais (Ilyina et al., 2004).

O crescimento do biofilme é resultado de um processo complexo que envolve o transporte de moléculas orgânicas e inorgânicas e células microbianas para a superfície, para subsequente adsorção e finalmente a ligação irreversível auxiliada pela produção de EPS (Beech, 2004). Devido a sua complexidade, a formação de biofilmes é regulada em diferentes estágios por diversos mecanismos (Ruiz et al., 2008; Waters & Bassler, 2005). O mecanismo regulatório mais estudado para o controle da produção de EPS, a formação de biofilme e diferenciação, é a regulação do quorum sensing (QS) (Ruiz et al., 2008; Lazar, 2011). O QS permite a comunicação entre células bacterianas e regula a expressão de genes específicos em resposta a alterações na densidade populacional (Rivas et al., 2005; Valenzuela, 2006). Em geral, o processo de QS envolve a produção, liberação e detecção de moléculas químicas sinalizadoras, que permitem as células microbianas regularem a expressão de genes numa densidade celular dependente (Hooshangi & Bentley, 2008). A uma dada densidade populacional, os genes envolvidos na diferenciação e maturação do biofilme são ativados (Waters & Bassler, 2005).

Os biofilmes desempenham papel importante na ciclagem dos minerais do ambiente (Brown et al., 1999) e na sobrevivência dos micro-

organismos na presença de elevadas concentrações de agentes antimicrobianos, inclusive metais (Sarkar & Chakaborty, 2008). Um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi 600 vezes mais resistente a metais pesados em biofilme, quando comparada a células planctônicas (Teitzel & Parsek, 2003). Vários fatores como, heterogeneidade metabólica, restrição de oxigênio, mudanças fisiológicas e expressão de genes regulados pelo *quorum-sensing* podem desempenhar papel importante na tolerância aos metais em biofilmes bacterianos (Taga & Bassler, 2003; Von Bodman et al., 2003).

Szomolay et al., (2005) propuseram que a penetração limitada de agentes antimicrobianos dentro do biofilme, resulta em baixos níveis de exposição das células localizadas nas regiões mais profundas, permitindo que essas células entrem num estado de fisiologia adaptada e resistente ao antimicrobiano. É, portanto esperado que os micro-organismos tenham a habilidade de adaptar sua fisiologia para sobreviver à exposição de metais tóxicos. No entanto, a resposta molecular dos micro-organismos em biofilme expostos a esse tipo de estresse ainda não foi relatada (Sarkar & Chakaborty, 2008). Vários laboratórios estão utilizando tecnologia de transcriptômica e proteômica para elucidar os mecanismos moleculares que fundamentam a resposta dos biofilmes microbianos a toxicidade dos metais. Esse tipo de resposta pode ser visto como um processo de diversificação fenotípica dependente da concentração de espécies metálicas (Harrison et al., 2007). É interessante notar que as células do biofilme de *Candida tropicalis* que sobrevivem a exposição ao Co, Se ou outros antifúngicos parecem estar aleatoriamente intercaladas na população. Esses estudos indicam que, embora

exista dificuldade de penetração de agentes antimicrobianos por bioissorção sendo um componente importante na suscetibilidade a estressores tóxicos, esse não é o único mecanismo de resistência (Harrison, 2006; Harrison et al., 2007).

Biofimes microbianos produzem células persistentes do tipo resistentes a multidrogas, com frequência maior que a descrita para populações de células planctônicas (Jahid & Ha, 2012). Representando cerca de 0,1 a 10% da população do biofilme, esta subpopulação de células especializadas, também são conhecidas por mediar tolerância aos metais (Harrison et al., 2005a; Harrison et al., 2005b).

Variantes fenotípicos, diversidade celular, mudanças fisiológicas, produção aumentada de polissacarídeos, produção de células persistentes, precipitação e imobilização dos metais podem explicar a resistência dos biofilmes microbianos aos metais (Harrison et al., 2007).

2.7.2 Sideróforos

A produção de sideróforos é a estratégia mais comum para acumulação de ferro em micro-organismos. Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular (500-1500 daltons), que possuem alta afinidade e seletividade para o ferro III. Existem cerca de 500 compostos, com distintas estruturas, identificados como sideróforos (Hider & Kong, 2010), no entanto, a natureza dos grupos funcionais não difere muito entre eles (Krewulak & Voguel, 2007).

O papel destes compostos é captar o ferro do ambiente, para torná-lo disponível à célula microbiana (Winkelmann, 1987; Winkelmann, 1991). Após ser secretado para o meio extracelular, o sideróforo forma um complexo Fe^{3+} -sideróforo que é transportado ao interior da célula para a disponibilização do metal ao micro-organismo (Dobbelaere et al., 2003). A biossíntese de sideróforos é regulada em função dos níveis de ferro do meio, de modo que quando os níveis de ferro são superiores aos necessários para a célula, ocorre repressão dos genes relacionados à captação de ferro e indução sob limitação de ferro (Lee & Helmann, 2007).

Complexos estáveis entre sideróforos e outros cátions metálicos diferentes do ferro também são formados (Neubauer et al., 2000). Braud et al., (2009a,b) avaliaram 16 metais (Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{3+} , Tl^+ and Zn^{2+}) e comprovaram que os dois sideróforos mais produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (pioverdina e piochelina) são aptos a quelar todos estes metais. No entanto, quando avaliaram a produção de pioverdina, na presença de ferro e outros metais simultaneamente houve claramente a preferência de ligação deste sideróforo ao ferro (Braud et al., 2009b).

Outros cátions metálicos diferentes do ferro são hábeis a estimular ou inibir a produção de sideróforos em inúmeras bactérias (Duhme et al., 1998). Possivelmente, a estimulação na produção de sideróforos por outros metais ocorra devido à diminuição da quantidade de sideróforos livres no meio, já que grande parte está complexada com os metais. O decréscimo na concentração dos sideróforos pode ser suficiente para ativar a secreção de

novas moléculas ao meio (Braud et al., 2009b). A produção de sideróforos induzida por metais tóxicos sugere que estes quelantes, podem exercer um papel importante na tolerância das bactérias aos metais pesados (Li et al., 1997). O complexo metal/sideróforo gerado no meio extracelular reduz a concentração de metais livres, e afeta a difusão destes para dentro da célula (a massa molecular metal/sideróforo não difunde via porinas). Assim, a concentração intracelular de metais tóxicos se mantém baixa e conseqüentemente a tolerância microbiana ao metal aumenta (Schalk et al., 2011).

2.7.3 Bioissorção e Bioacumulação

Entre os mecanismos de resistência aos metais postulados por Bruin et al., 2000 pode-se destacar o sequestro extracelular (bioissorção) e intracelular (bioacumulação) de metais. Chojnacka (2010) define como bioissorção um processo físico-químico de ligação de um poluente a superfície celular, independente de metabolismo, enquanto que a bioacumulação é um processo ativo e o poluente se acumula no interior da célula.

A bioissorção apesar de ser um processo passivo abrange uma variedade de interações do metal com grupos funcionais da célula bacteriana, podendo ser um processo altamente complexo mecanicamente (Gaad, 2009). A ligação de metais à superfície celular dos micro-organismos é um fenômeno de adsorção que ocorre por interações eletrostáticas entre o cátion metálico e a superfície carregada negativamente da célula microbiana. Desta forma, a

capacidade de adsorção vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie bacteriana.

Em células bacterianas Gram-positivas, o peptidoglicano e os ácidos teicóicos constituem grupos funcionais quando deprotonados, para ligação eficiente aos metais (Beveridge, 1999). O peptidoglicano consiste dos açúcares N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico (NAG, NAM), com cadeia peptídica lateral ligada ao NAM, essa cadeia possui quatro grupos de aminoácidos com ácido D-glutâmico e mesodiaminopimélico (DAP) contendo dois grupos carboxílicos para a adsorção do metal. Os grupos fosforilados dos ácidos teicóicos também representam uma região de adsorção de metais (Araki & Ito, 1989).

Paredes celulares de bactérias Gram-negativas exibem menor quantidade de peptidoglicano e não possuem ácidos teicóicos. No entanto, possuem uma membrana externa complexa com fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e várias proteínas. Os fosfolípidos da membrana externa possuem grupos fosforilados no mesmo ambiente que do ácido teicóico, podendo esses também ser uma região de adsorção nesse tipo de células (Beveridge & Murray, 1980; Graham & Beveridge, 1994). Beveridge (1989) e Fomina & Gaad, 2014 sugerem que um componente significativo do metal adsorvido em células de bactérias Gram-negativas é a ligação aos grupos fosforila da membrana externa e estruturas associadas, como os fosfolípidos e os lipolissacarídeos, enquanto que o peptidoglicano estaria menos associado à adsorção nesse tipo de bactérias.

A bioacumulação é um processo onde os íons metálicos são transportados e acumulados dentro do citoplasma bacteriano, sendo característica comum em bactérias que possuem sistemas de desintoxicação intracelular como metaloproteínas (Keasling & Huppf, 1996; Silver, 1996).

As metalotioneínas (MTs) são uma família de metaloproteínas de baixo peso molecular (6-7 kDA) encontradas em animais, micro-organismos eucariotos e procariotos e em plantas. Devido a abundância de resíduos de cisteína encontrados nessas proteínas e a facilidade com que os metais se ligam a essas estruturas, elas são conhecidas como ligantes de metais (Kägi, 1993). MTs são geralmente consideradas como sendo responsáveis pela desintoxicação de metais pesados e são essenciais para o metabolismo de metais em eucariotos. Comparado com biossorventes convencionais, MTs têm grande afinidade de ligação com vários tipos de metais pesados (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Íons metálicos como Zn (II), Cd (II), Hg (II), Cu (I), Ag (I), e Au (I) são ligados com enxofre nos grupos sulfidrilas das cisteínas (Vasák, 2005). Essas metaloproteínas têm sua síntese induzida por íons metálicos como Cd, Hg e Ag (Richards et al., 1984), desempenhando papel importante na bioacumulação e imobilização de metais tóxicos (Blindauer et al., 2002; Liu et al., 2003).

2.8 Referências bibliográficas

- ABEE T.; KOVÁCS A.T.; KUIPERS O.P.; VAN DER VEEN S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, V.22, p. 172-179, 2011.
- ADENIJI, A. Bioremediation of arsenic, chromium, lead, and mercury. National Network of Environmental Management Studies Fellow for U.S. **Environmental Protection Agency Washington**, Washington, DC, 2004, 43p.
- ARAKI, Y. & ITO, E. Linkage units in cell walls of gram-positive bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 121-135, 1989.
- ALEXANDRE, S. C. **Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto - Minas Gerais**. 2006. 63p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- ANSARI, A.Z.; CHAEL, M.L. & O'HALLORAN, T.V. Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR. **Nature**, v. 355, p. 87-89, 1991.
- ANSARI, A.Z.; BRADNER, J.E. & O'HALLORAN, T.V. DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. **Nature**, v. 374, p. 371-375, 1995.
- AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**, RIMA, São Paulo, 2003, 292 p.
- BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, 355-384, 2003.
- BARKAY, T; WAGNER-DOBLER, I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, p. 1-52, 2005.
- BEECH, I.B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms--current understanding and state-of-the art methods of study. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 53, p. 177-183, 2004.
- BEGLEY, T.P.; EALICK, S.E. Enzymatic reactions involving novel mechanisms of carbanion stabilization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 508–515, 2004.
- BENISON, G.C.; DI LELLO, P.; SHOKES, J.E.; COSPER, N.J.; SCOTT, R.A.; LEGAULT, P.; OMICHINSKI, J.G. A stable mercury-containing complex of the organomercurial lyase MerB: catalysis, product release, and direct transfer to MerA. **Biochemistry**, v. 43, p. 8333–8345, 2004.

BEVERIDGE, T.J. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annual Review of Microbiology**, v. 43, p 147-171, 1989.

BEVERIDGE T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 4725-4733, 1999.

BEVERIDGE, T..J. & MURRAY, R.G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 141, n. 2, p. 876-887, 1980.

BIESTER, H.; GOSAR, M.; MULLER, G. Mercury speciation in tailings of the Idrija mercury mine. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 65, n. 3, p. 195-204, 1999.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BLINDAUER, C..A.; HARRISON, M.D.; ROBINSON, A.K.; PARKINSON, J.A.; BOWNESS, P.W.; SADLER, P.J.; ROBINSON, N.J. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like fingers. **Molecular Microbiology**, v.45, p. 1421–1432, 2002.

BRAUD, A.; HANNAUER, M.; MILSIN, G.L.A.; SCHALK, I.J. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. **Journal of Bacteriology**, v.191, p. 5317–5325, 2009.

BRAUD, A.; HOEGY, F.; JEZEQUEL, K.; LEBEAU, T.; SCHALK, I.J. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 1079–1091, 2009.

BROW, N. L. et al. Mercury transport and resistance. **Biochemical Society**, v. 30, 715-718, 2002.

BROW, N. L. et al. The MerR family of transcriptional regulators. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, v. 145–163, 2003.

BROWN M.R.; KORNBERG A. The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival, **Trends in Biochemical Sciences**. v.33 n. 6, p. 284-290, 2008.

BROWN, G.E.; FOSTER, A.L.; OSTERGREN, J.D. Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: a molecular-scale perspective. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 96, p. 3388–3395, 1999.

BRUINS, M.R.; KAPIL, S.; OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p.198-207, 2000.

CANSTEIN, H. et al. Removal of Mercury from Chloralkali Electrolysis Wastewater by a Mercury-Resistant *Pseudomonas putida* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5279-5284, 1999.

CHAMPIER L. et. al. Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: A possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the *mer* operon. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 1475-1485, 2004.

CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BAY, B. H. Review Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutation Research**. v. 533, n. 1/2, p. 201 - 209, 2003.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation-the prospects for practical applications. **Environment International**, v. 36, p. 299–307, 2010.

CLARKSON, T. The Three Modern Faces of Mercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 11-23, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DUHME, R.C.; HIDER, M.J.; NALDRETT, M.J.; PAU, R.N. The stability of the molybdenum-azotochelin complex and its effect on siderophore production in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 3, p. 520–526, 1998.

ERBE, J.L.; TAYLOR, K.B.; HALL, L.M. Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptionalfusion as biosensors for the detection of heavy metals. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, n. 2 , p. 80-83, 1996.

FLEMMING, H.C. Sorption sites in biofilms. **Water Science and Technology**, v. 32, p. 27–33, 1995.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part II: Technical aspects. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 9-16, 2001.

FLEMMING, H.C. & Wingender, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8: p. 623–633, 2010.

FOMINA, M.; GADD, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, V. 160, p. 3-14, 2014.

GADD, G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 13–28, 2009.

GRAHAM, L.L., & BEVERIDGE, T.J. Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. **Jornal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1413-1421, 1994.

HARRISON, J. J.; CERI, H.; TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 927-938, 2007.

HARRISON, J. J. et al. Metal resistance in *Candida* biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, p. 479-491, 2006.

HARRISON, J. J. et al. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, p. 3181-3195, 2005.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. **FEMS Microbiology Letters**, v. 272, p. 172-181, 2007.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 981-994, 2005.

HIDER, R.C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 637-657, 2010.

HOOSHANGI, S.; BENTLEY, W.E. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 550-555, 2008.

ILYINA, T.S.; ROMANOVA, Y.M.; GINTSBURG, A.L. Biofilms as a Mode of Existence of Bacteria in External Environment and Host Body: The Phenomenon, Genetic Control, and Regulation Systems of Development. **Russian Journal of Genetics**, v. 40, n.11, p. 1189-1198, 2004.

JAHID, S.I.; HA, S. A Review of Microbial Biofilms of Produce: Future Challenge to Food Safety. **Food Science Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 299-316, 2012.

JIANG, G.B.; SHI, J.B.; FENG, X.B. Mercury pollution in China: an overview of the past and current sources of the toxic metal. **Environmental Science and Technology**, v. 15, p.673-678, 2006.

KÄGI, J. H. R. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, I. (Eds). **Metallothionein III: biological roles and medical Implications**. Birkhauser Verlag Basel.1993. p. 29 - 55.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption- an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KEASLING, J.D. & HUPF, G.A. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 743–746, 1996.

KERPER, L.E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *American Journal of Physiology*, v. 262, n. 5, p. 761–765, 1992.

KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1778, p. 1781–1804, 2008.

KURASAKI, M.; YAMAGUCHI, R.; ARIAS, A. R. L.; OKABE, M.; KOJIMA, Y. Significance of alpha-fragment of metallothionein in cadmium binding. **Protein Engineering**, v. 10, n. 4, p. 413 - 416, 1997.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. Anthropogenic mercury emissions to the atmosphere in Brazil: The impact of gold mining. **Journal of Geochemical Exploration**, v.58, n. 2-3, p. 223-229, 1997.

LACERDA, L.D. et al. **Mercúrio em solos e sedimentos lacustres na região de Alta Floresta, MT**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental; v. 23, 1999.

LAZAR, V. Pathogenesis and Toxins Quorum sensing in biofilms e How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power. **Anaerobe**. v. 17, p. 280-285, 2011.

LEE, I.W.; GAMBILL, B.D. & SUMMERS, AO. Translation of *merD* in Tn21. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 4, 2222-2225, 1989.

LEE, J.W.; HELMANN, J.D. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators, **Biometals**. v. 20, p. 485–499, 2007.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; WILLIAMS, K.E. Silverresistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6127– 6132, 1997.

LIU, T.; NAKASHIMA, S.; HIROSE, K.; UEMURA, Y.; SHIBASAKA, M.; KATSUHARA, M.; KASAMO, K. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacteria *Oscillatoria brevis*. **FEBS Letters**, v. 542, n. 159–163, 2003.

MASON, M.R. & FITZGERALD, W. The global mercury cycle: Oceanic and anthropogenic aspects. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 85-108, 1996.

MELAMED, R; VILLAS BÔAS, R. C. **Mecanismos de interação físico-química e mobilidade do mercúrio em solos, sedimentos e rejeitos de**

garimpo de ouro. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental; v. 25, 2002.

MICARONI, R. C.; BUENO, M. I.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

MOFFATT, P.; DENIZEAU, F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. **Drug Metabolism Reviews**. v. 29, p. 261 - 307, 1997.

MUNTHER, J.; XIAO, Z. F.; LINDQVIST, O. The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. **Water, Air, & Soil Pollution**. v. 56, n. 1, p. 621-630, 1991.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos.** Série Cadernos de Referência Ambiental v. 1. – Salvador: CRA, 2001.

NAZ, N.; YOUNG, H.K.; AHMED, N.; GADD, G.M. Cadmium Accumulation and DNA Homology with Metal Resistance Genes in Sulfate-Reducing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**.v. 71, n. 8, p. 4610–4618, 2005.

NEUBAUER, U.; NOWACK, B.; FURRER, G.; SCHULIN, R. Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 2749–2755, 2000.

NÍ CHADHAIN, S.M.; SCHÄEFER, J.K.; CRANE, S.; ZYLSTRA, G.J.; BARKAY, T. Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. **Environmental Microbiology**. v. 8, n. 10, p. 1746–1752, 2006.

NUCIFORA, G.; SILVER, S. & MISRA, T.K. Down regulation of the mercury resistance operon by the most promoter-distal gene merD. **Molecular and General Genetics**, v. 220, n. 1, p. 69-72, 1990.

PICAZO, J.E.; FERNANDEZ, J.M. **Fuentes Naturales y Antropogénicas de los Mercuriales.** Disponível em: <http://www.actualidaddermatol.com/art3295.pdf> Acesso em: jan. 2010.

PIRRONE, N. et al. Ambient Air Pollution by Mercury (Hg). Position Paper. Luxembourg, **Office for Official Publications of the European Communities**, 235 p, 2001.

PIRRONE, N.; MAHAFFEY, K. R. **Dynamics of mercury pollution on regional and global scales: atmospheric processes and human exposures around the world**, New York, 739 p, 2005.

PITTS, K.E.; SUMMERS, A.O. The roles of thiols in the bacterial organomercurial lyase (MerB). **Biochemistry**, v. 41, p. 10287–10296, 2002.

RAY, S. et al. Studies on the mercury volatilizing enzymes in nitrogen-fixing *Beijerinckia mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 184-186, 1993.

REN, W. et al. Mercury Transformation and Distribution Across a Polyvinyl Chloride (PVC) Production Line in China. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 2321–2327, 2014.

RICHARDS, R. I.; HEGUY, A.; KARIN, M. Structural and functional analysis of the human metallothionein 1-A gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. **Cell**, v. 37, p. 263 - 272, 1984.

NORDBERG, **Metallothioneins: historical review and state of knowledge**. *Talanta*. v. 46, p. 243 – 254, 1998.

RIVAS, M.; SEEGER, M.; HOLMES, D.S.; JEDLICKI, E. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Biological Research**, v. 38, p. 283-297, 2005.

ROSS, W.E.; PARK, S.J. & SUMMERS, A.O. Genetic analysis of transcriptional activation and repression in the Tn21 *mer* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 4009-4018, 1989.

RUIZ, L.M.; VALENZUELA, S.; CASTRO, M.; GONZALEZ, A.; FREZZA, M.; SOULÈRE, L.; ROHWERDER, T.; QUENEAU, Y.; DOUTHEAU, A.; SAND, W.; JEREZ, C.A.; GUILIANI, N. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. **Hydrometallurgy**. v. 94, p. 133-137, 2008.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**. v. 13, p. 2844–2854, 2011.

SILVER, S. Bacterial heavy metal resistance: New surprises. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 753–789, 1996.

SILVER, S. Exploiting heavy metal resistance systems in bioremediation. **Research in Microbiology**, v. 145, p. 61-67, 1994.

SILVER, S.; HOBMAN, J. L. Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental Aspects, Methylation, and Human Health. **Microbiology Monographs**, v. 6, p. 357-370, 2007.

SMALLA, K.; HAINES, A.S.; JONES, K.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; HEUER, H.; SCHLOTTER, M.; THOMAS, C.M. Increased Abundance of IncP-1_ Plasmids

and Mercury Resistance Genes in Mercury-Polluted River Sediments: First Discovery of IncP-1 γ Plasmids with a Complex *mer* Transposon as the Sole Accessory Element. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n. 11, p. 7253–7259, 2006.

STEWART, P.S., FRANKLIN, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature. Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199–210, 2008.

SUMMERS, A.O. Untwist and Shout: a Heavy Metal-Responsive Transcriptional Regulator. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 10, p. 3097-3101, 1992.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**. v. 147, p. 3-9, 2001.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 222–227, 2001.

SZOMOLAY, B.; KLAPPER, I.; DOCKERY, J.; STEWART, P. S. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1186–1191, 2005.

TAGA, M.E.; BASSLER, B.L. Chemical communication among bacteria. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 100, p. 14549–14554, 2003.

TEITZEL, G.M.; PARSEK, M.R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2313–2320, 2003.

UNEP. United Nations Environment Programme: Chemicals. **Global Mercury Assessment**, Geneva, 270 p, 2002.

VALENZUELA, L.; CHI, A.; BEARD, S.; ORELL, A.; GUILIANI, N.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; JEREZ, C.A. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 197-21, 2006.

VASÁK, M. Advances in metallothionein structure and functions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 19, n. 1, p. 13-17, 2005.

VERBEL, J. O.; RESTREPO, B. J. **El lado gris de la minería del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia**, Colombia, 123 p, 2002.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p. 455–482, 2003.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 21, p. 319-346, 2005.

WHO – Health Organization. **Inorganic mercury: Environmental Health Criteria**, Geneva, p 118-105, 1991.

WHO – World Health Organization. **Mercury: Environmental Health Criteria**, Geneva, v. 86. 115 p., 1989.

WHO – World Health Organization. **Methylmercury: Environmental Health Criteria**, Geneva, p. 101-144, 1990.

WILHELM, S. M.; BLOOM, N. Mercury in petroleum. **Fuel Processing Technology**, v. 63, n. 1, p. 1-27, 2000.

WINKELMANN, G. **Handbook of Microbial Iron Chelates**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.

WINKELMANN, G.; VAN DER HELM, D.; Neilands, J. B. **Iron Transport in Microbes, Plants and Animals**, VCH Press, Weinheim, 1987.

ZHANG, L.; PLANAS, D. Biotic and abiotic mercury methylation and demethylation in sediments. **Bulletin of Environmental. Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 691-698, 1994.

ZHANG, W.; CHEN, L.; LIU, D. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n.3, p. 1305-14, 2012.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de três artigos científicos. Os referidos artigos estão apresentados nas seções 3.1, 3.2 e 3.3 e identificados como Resultados I, Resultados II e Resultados III.

No primeiro artigo (seção 3.1) foi demonstrado pela primeira vez a viabilidade da utilização de glicerol residual como fonte de carbono para a remoção biológica de Hg. Tem como título “Biorremoção de mercúrio por bactérias usando glicerol residual como fonte de carbono” e foi submetido para publicação no periódico *Water, Air & Soil Pollution* em outubro de 2014.

O segundo artigo (seção 3.2), “Biorremoção de metais e mecanismos relacionados à resistência de *Pseudomonas* sp. B50D”, trata da pesquisa de bactérias potencias para a biorremoção de mercúrio e outros metais para remediação de ambientes com contaminações complexas e explora os distintos mecanismos de resistência aos metais do isolado *Pseudomonas* sp. B50D.

O terceiro artigo (seção 3.3) versa sobre a remoção de mercúrio de efluentes industriais contaminados com mercúrio e co-contaminados com outros metais e é intitulado: “Remoção de mercúrio de efluente industrial por *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1”.

3.1 RESULTADOS I

Biorremoxão de mercúrio por bactérias usando glicerol residual como fonte de carbono

Resumo

Bactérias que possuem operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o mercúrio (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg (0) sendo uma alternativa potencial aos métodos convencionais para a remoção de mercúrio de efluentes contaminados. Devido ao baixo teor de matéria orgânica dos efluentes industriais a técnica de bioaugmentação pode não ser efetiva necessitando de adição de fontes externas de carbono. Este déficit de carbono pode ser suprido pela adição de glicerol residual da indústria de biodiesel, já que se trata de uma fonte de carbono facilmente assimilável. Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez a viabilidade da utilização de glicerol residual como fonte de carbono para a remoção biológica de Hg. Oito isolados foram capazes de remover mercúrio e degradar o glicerol em meio mineral e glicerol residual. Os melhores resultados para remoção de Hg e degradação do glicerol foram obtidos utilizando os isolados *Serratia marcescens* M25C (85 e 100%), *Klebsiella pneumoniae* PLB (90 e 100%), *Klebsiella oxytoca* U14 (90 e 100%) e *Arthrobacter sp.* U3 (80 e 65%) em meio contendo 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura. Comum em solos, o isolado

Arthrobacter sp. U3 é um candidato promissor para aplicação no ambiente devido a sua baixa patogenicidade, alta taxa de remoção do Hg e degradação do glicerol.

Introdução

O mercúrio (Hg) ocorre naturalmente no ambiente em diferentes espécies químicas com solubilidade, reatividade e toxicidade distintas, causando diferentes impactos no ecossistema e na saúde do homem (UNEP). O mercúrio é emitido para o ambiente por inúmeras fontes naturais e antropogênicas, por meio de combinações complexas, envolvendo reações químicas, físicas e biológicas (Maxson 2005; Driscoll et al. 2013). As fontes antrópicas mais frequentes de mercúrio são as indústrias petroquímicas, eletrônicas, equipamentos de medição, tintas e cloro-soda, além da utilização na extração de ouro e como amálgamas dentárias (Li et al. 2009; Pirrone et al. 2010).

Apesar de o mercúrio ser tóxico, tanto para células eucarióticas quanto para procarióticas, alguns micro-organismos possuem mecanismos de resistência a esse metal. Entre eles podem-se destacar bombas de efluxo (Waldron et al. 2009), quelação por polímeros enzimáticos, precipitação, biometilação (Boening 2000) e redução enzimática; relacionada ao operon *mer* (Ma et al. 2009). Bactérias que possuem operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o Hg (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg (0) (Nies 1999; Barkay et al. 2003; Barkay & Wagner-Döbler, 2005; Zhang & Wang, 2006; Dash & Das, 2012). O gene (*merA*) é parte de um operon que compreende genes regulatórios e outros que codificam proteínas de transporte

(Summers 1992; Narita 2003; Dash & Das 2012). Em geral, muitos isolados resistentes ao mercúrio possuem os genes *merR*, *merP* e *merA* que codificam proteínas com função reguladora, de transporte e ligação extracelular e a mercúrio redutase, respectivamente (Silver & Hobman 2007). Essa resposta adaptativa dos micro-organismos ao Hg representa um recurso para remediação de áreas contaminadas por esse metal e especialmente o gênero *Pseudomonas* tem sido bastante explorado para potencial uso em ambientes contaminados (Wagner-Dobler 2003; Barkay and Wagner-Dobler 2005; Mortazavi et al. 2005; Pepi et al. 2010, Cabral et al. 2013).

A remediação de ambientes contaminados com cátions metálicos tóxicos tem empregado convencionalmente, técnicas físico-químicas que incluem precipitação, filtração e recuperação eletroquímica. Assim como, separação por membrana, escavação, depósito de resíduos em aterros sanitários ou ainda recobrimento do sítio contaminado. Essas técnicas são pouco eficazes, tem custo elevado e geralmente produzem resíduos adicionais com maior potencial de contaminação (Camargo et al. 2007; Naja & Volesky 2010).

O biodiesel tem potencial para ser o substituto natural do diesel. Neste sentido, o glicerol é o principal subproduto, sendo que para a síntese de 10 Kg de biodiesel, se produz 1 Kg de glicerol residual (Dasary et al. 2005; Johnson & Taconi 2007; Zeng & Sabra 2011). A glicerina derivada da produção do biodiesel possui baixo valor agregado, pois contém resíduos de hidróxido de sódio, ácidos graxos livres, metanol, sais de ácidos graxos, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais associados (Thompson & He 2006). Como

consequência, tornou-se um resíduo que demanda de custos para descarte (Yazdani & Gonzales, 2007; Escapa et al. 2009). Contudo, o glicerol residual é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias, sob condições aeróbias e anaeróbias, para a obtenção de energia para os processos metabólicos (Silva et al. 2009). No que diz respeito ao tratamento de efluentes, tem sido estudada a utilização de glicerol residual como fonte de carbono para os processos biológicos de desnitrificação e remoção de fósforo (Bodík et al. 2009; Yuan et al. 2010; Torà et al. 2011; Guerrero et al. 2012) visando diminuir o custo do tratamento desses efluentes.

Embora as pesquisas na área de biorremediação de efluentes contaminados por mercúrio estejam em expansão, tecnologias que visam rotas metabólicas distintas e utilização de fontes alternativas de carbono (glicerol residual) para o desenvolvimento e aplicação de microrganismos na biotransformação desse metal, ainda não foram estudadas. Desta forma, o estudo de métodos que agregam eficiência de remoção e baixo custo de aplicação pode expandir efetivamente a tecnologia de biorremediação para larga escala.

Para avaliar esta contribuição, este estudo teve por objetivo analisar o crescimento e a capacidade de remoção de Hg (II) de oito bactérias em meio de cultivo LB e a viabilidade de remoção do Hg com glicerol residual como fonte de carbono, estimar a degradação do glicerol residual pelos microrganismos, identificar a presença dos genes *merA* nos isolados Gram-negativos por PCR e determinar a concentração inibitória e biocida do Hg (II) sobre os isolados.

Material e Métodos

Glicerol Residual

O glicerol residual utilizado neste estudo foi produzido a partir da transesterificação mélica do óleo de soja para produção de biodiesel. O mesmo foi desenvolvido no CECON – Centro de combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e óleos do Instituto de química da UFRGS.

Micro-organismos

As bactérias avaliadas neste estudo foram previamente isoladas pela técnica de enriquecimento, de resíduos e efluentes industriais contaminados com metais

Trinta e cinco isolados resistentes ao Hg foram avaliados quanto ao crescimento em glicerol como única fonte de carbono (Tabela 1). Foi utilizado o método indireto de turbimetria, analisando a densidade óptica a 600 nm em meio de cultura MM1 Richard & Vogel⁷ (KCl 0,7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 3 g L⁻¹, NH₄NO₃ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 4 mg L⁻¹, FeSO₄ 0,2 mg L⁻¹, MnCl₂ 0,2 mg L⁻¹, CaCl₂ 0,2 mg L⁻¹, acrescido de HgCl₂ (10 µM) e 10 g L⁻¹ de glicerol comercial (99%). Após 48 h de incubação a 30±2 °C a densidade óptica a 600 nm foi verificada e os isolados que apresentaram crescimento celular (B50A, CP1.0, M50C, M25C, PLA, PLB, U3 e U14) foram selecionados para os demais experimentos.

Tabela 1. Isolados bacterianos e identificação genética baseada no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA.

Isolado	Espécie	Índice de Similareza Genética (%)
A25B	<i>Enterobacter</i> sp.	100
B50A	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
B50D	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
C50B	<i>Pseudomonas putida</i>	100
CP1.0	<i>Bacillus cereus</i>	100
M25B	<i>Enterobacter</i> sp.	100
M25C	<i>Serratia marcescens</i>	100
M50C	<i>Proteus mirabilis</i>	100
PLA	<i>Citrobacter freundii</i>	98
PLB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99
U1	Não identificada	-
U2	<i>Comamonas testosteroni</i>	99
U3	<i>Arthrobacter</i> sp.	98
U4	Não identificada	-
U5	Não identificada	-
U6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99
U7	Não identificada	-
U8	Não identificada	-
U9	<i>Arthrobacter</i> sp.	99
U10	Não identificada	-
U11	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	99
U12	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100
U13	<i>Lysinibacillus</i> sp.	86
U14	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
U20	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
UA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
V1	<i>Pseudomonas putida</i>	100
P16	<i>Lysinibacillus</i> sp.	95
P17	<i>Bacillus thuringiensis</i>	95
P18	<i>Paenibacillus</i> sp.	99
P19	<i>Bacillus</i> sp.	100
13L	<i>Paenibacillus</i> sp.	100
BC	<i>Lysinibacillus</i> sp.	95
BD	Não identificada	-
UA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99

Identificação dos isolados

Para a extração de DNA cromossomal, colônias isoladas foram incubadas em meio de cultura Luria Bertani por 24 horas a 30°C, para posteriormente passarem pelo processo de extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando-se o *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega), conforme protocolo do fabricante.

Os isolados foram identificados com base no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA. Os oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados para bactérias foram o 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal em PCR. A reação de amplificação seguiu o protocolo: tampão de reação (50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 2,5 % Triton X 100), dNTPS (200 µM de cada), 0,2 µM MgCl₂, 0,25 µM de cada primer, 0,8ng/µl de DNA das amostras e 0,02 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research Inc. Watertown, MA, USA, e o programa básico constou de 35 ciclos (desnaturação inicial 95°C por 5 min; desnaturação subsequente, 95°C por 30s; anelamento, 50°C por 1 min; extensão, 72°C por um min e extensão final por 5 min).

Os produtos de PCR foram purificados pelo método padrão de precipitação com PEG 8000 (polietilínoglicol). As reações de sequenciamento dos fragmentos de PCR utilizaram os kits de terminadores marcados da GE Healthcare com oligonucleotídeo iniciadores. As seqüências geradas foram comparadas com as sequencias no banco de dados *Genbank/NCBI*.

Detecção dos genes *merA*

Para a detecção dos genes *merA* DNA de todos os isolados foi extraído como descrito anteriormente. A reação de PCR foi realizada usando os oligotídeos iniciadores para *merA* A1 F (ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT) e A5 R (ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC) (Liebert et al. 1997) (1238 pb). A reação continha 5 μ L de 10x de tampão, 1.5 μ L de 25 mM $MgCl_2$, 1 μ L de 10 mM dNTPs, 0.02 U de Taq DNA polimerase, 0.5 μ L de 20 pmol μ L⁻¹ de oligonucleotídeos iniciadores (*forward* e *reverse*) e 16.75 μ L de água ultrapura. Foram utilizadas as seguintes condições para amplificação dos genes *merA*: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 29 ciclos a 95 °C por 1 min, 64 °C por 2 min, e 90 °C por 3 min e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Cada reação de PCR incluiu um controle negativo que foi preparado em condições idênticas, tal como descrito acima, exceto quanto a adição de DNA. As reações foram corridas em GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA). Os produtos das reações de PCR foram separados em gel de agarose a 1% (Fisher Scientific, MA) e observadas em transiluminador através da radiação emitida com radiação ultravioleta.

Preparo de células para os ensaios

Os inóculos dos ensaios nos diferentes meios de cultivo foram padronizados como descrito a seguir.

Ensaio em meio de cultura LB: cada isolado resistente ao mercúrio foi inoculado em meio LB (triptona bacteriológica 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹) pH 6,7, contendo Hg (10 μ M) na forma de $HgCl_2$ incubado

por 24 h a 30 ± 2 ° C sob agitação de 100 rpm. Os inóculos foram padronizados em 10^7 UFC mL⁻¹ iniciais pela turbimetria, analisando a densidade óptica a 600 nm (0,05-0,45) e a correspondente quantidade de UFC mL⁻¹ em placas. Frascos com meio de cultura não inoculado serviram como controle negativo.

Ensaio com meio de cultura mínimo mineral MM1 e glicerol residual: cada isolado resistente ao mercúrio foi inoculado em meio MM1 (KCl 0,7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 3 g L⁻¹, NH₄NO₃ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 4 mg L⁻¹, FeSO₄ 0,2 mg L⁻¹, MnCl₂ 0,2 mg L⁻¹, CaCl₂ 0,2 mg L⁻¹ (pH 6,7, contendo Hg (10 µM) na forma de HgCl₂ e glicerol residual (10 g L⁻¹) incubado por 48 h a 30 ± 2 ° C sob agitação de 100 rpm. Os inóculos foram padronizados em 10^7 UFC mL⁻¹ iniciais por turbimetria, analisando a densidade óptica a 600 nm e a correspondente quantidade de UFC mL⁻¹ em placas. Frascos com meio de cultura não inoculado serviram como controle negativo.

Concentração mínima inibitória (CMI)

Todos os isolados foram avaliados quanto a concentração inibitória mínima em meio de cultura LB contendo mercúrio em diferentes concentrações na forma de HgCl₂, os isolados foram incubados por 48h horas a 30 ± 2 °C sob agitação de 100 rpm. O crescimento foi avaliado visualmente pela turvação do meio. A concentração de mercúrio capaz de interromper o crescimento microbiano (meio sem turvação) foi considerada a concentração inibitória mínima deste metal, em relação ao microrganismo avaliado.

Concentração Mínima Biocida (CMB)

Os isolados foram testados quanto a concentração mínima biocida de mercúrio em placas de poliestireno de 96 orifícios em meio LB contendo mercúrio na forma de HgCl_2 nas concentrações: 125 a 1500 μM , incubados por 48 horas a $30\pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação de 100 rpm. Após 48 h de incubação, 25 μL da cultura foi inoculada em placas de Petri contendo meio Agar nutriente. A concentração biocida foi verificada após o período de 72 h de incubação a $30\pm 2^\circ\text{C}$, pela presença ou ausência de crescimento microbiano nas placas.

Remoção de mercúrio pelos isolados em meio de cultura LB

O ensaio foi realizado conforme Kannan & Krishnoorthy (2006). Aproximadamente 10^7 UFC mL^{-1} foram inoculados em meio LB contendo 10 μM de HgCl_2 e incubados a 30°C por 24 h. Após a incubação de 24 h, amostras foram retiradas para determinação de pH, biomassa (DO 600 nm) e mercúrio remanescente. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura LB contendo mercúrio, sem inoculação. Como controle positivo foi utilizado meio de cultura LB inoculado com as bactérias sem metal.

Remoção de mercúrio pelos isolados bacterianos utilizando uma fonte alternativa de carbono (glicerol residual)

Foi realizada a avaliação da capacidade de remoção do mercúrio em meio mínimo mineral MM1 contendo 10 μM de mercúrio na forma de HgCl_2 , 10 g L^{-1} de glicerol residual acrescido de 0,5 g L^{-1} de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A concentração inicial de células inoculadas foi de 10^7 UFC

ml^{-1} e o cultivo incubado por 24, 48 e 72 horas a 30 a 100 rpm. Após os períodos de incubação, foram retiradas alíquotas de amostras para a análise de mercúrio e glicerol remanescentes, pH e densidade óptica a 600 nm. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura MM1 contendo $10 \mu\text{M}$ de mercúrio na forma de HgCl_2 , 10 g L^{-1} de glicerol residual acrescido de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura não inoculado.

A técnica descrita anteriormente, também foi realizada em tratamento sem a adição de extrato de levedura. A concentração inicial de células inoculadas foi de 10^7 UFC mL^{-1} e o cultivo incubado por 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas a 30°C a 100 rpm. Após os períodos de incubação, foram retiradas alíquotas de amostras para a análise de mercúrio e glicerol remanescentes, pH e densidade óptica a 600 nm. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura MM1 contendo $10 \mu\text{M}$ de mercúrio na forma de HgCl_2 e 10 g L^{-1} de glicerol residual não inoculado.

Determinação analítica do mercúrio

A concentração de mercúrio remanescente no meio de cultura inoculado e não inoculado foi digerido e determinado conforme metodologia EPA método 7471B. Uma alíquota de 0,1 mL foi coletada dos diferentes tratamentos e digerida com a adição de 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 2 mL ácido nítrico concentrado. Então, 10 mL de KMnO_4 (70 g L^{-1}) foi adicionado e a mistura submetida à temperatura de 121°C e 1,5 ATM por 15 min. Em seguida, adicionou-se 50 mL de água deionizada e 6 mL de CINH_2OH_2 (100 g L^{-1}). Então o mercúrio foi convertido a forma de Hg^0 pelo tratamento com

uma solução de SnCl_2 (50 g L^{-1}). O mercúrio foi quantificado por espectrofotometria de absorção atômica por geração de vapor frio no comprimento de onda $253,7 \text{ nm}$ (Analyst 100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Análises cromatográficas

Amostras das culturas dos diferentes tratamentos foram coletadas e centrifugadas por 5 min a 10000 RPM. O sobrenadante foi retirado e filtrado com membrana de celulose com poro de $0,22 \mu\text{m}$. A concentração de glicerol no meio de cultura foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência num equipamento Shimadzu Corp., Japan equipado com detector de índice de refração RID-10A e coluna Aminex HPX-87H ($300 \times 7.8 \text{ mm}$, Bio-Rad, USA). A fase estacionária constou de uma solução de H_2SO_4 $0,005 \text{ M}$ a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi controlada a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e os padrões utilizados foram grau HPLC (grau de pureza $>99,5$).

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicate e as médias e desvios-padrão (N-1) calculados. Os resultados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), utilizando o programa estatístico Systat 11.

Resultados e discussão

Trinta e cinco bactérias resistentes ao mercúrio previamente bioprospectadas foram testadas quanto ao crescimento em meio de cultura

contendo glicerol purificado como única fonte de carbono. Destas, apenas 8 isolados tiveram crescimento em meio de cultivo MM1 com glicerol em 48 h de incubação e foram selecionados para os demais experimentos (dados não mostrados).

De acordo com análise da região 16S do rRNA os 8 isolados bacterianos aptos a utilizar glicerol como fonte de carbono pertencem a distintas espécies, sendo 6 bactérias Gram-negativas e 2 bactérias Gram-positivas (tabela 2). Os gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Bacillus* são relatados como degradadores dessa fonte de carbono formando subprodutos (Silva et al. 2009) enquanto que, as bactérias dos gêneros *Proteus* e *Arthrobacter* não foram relatadas em outros trabalhos como degradadoras de glicerol residual (Figura 1).

Inúmeros trabalhos têm mostrado que bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem alta resistência a diferentes formas de mercúrio (Fortunato & Crespo 2005; Chadhain et al. 2006; Zhang et al. 2012; Cabral et al. 2013, Sone et al. 2013). As bactérias dos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* são mencionadas com menor frequência na literatura, porém já foram caracterizadas quanto à tolerância ao Hg (Griffin et al. 1985; Henriette et al. 1991; Ní, 2006; Zeroual et al. 2003, Sarkhoh et al. 2010; Keramati et al. 2011; Chien et al. 2012; Dash et al. 2013; Bafana et al. 2010).

Tabela 2: Isolado, índice de similaridade genética baseada no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA, número de acesso e nucleotídeos sequenciados.

Isolado	Índice de similaridade Genética (%)	Número de Acesso	Nucleotídeos (pb)
B50A	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	KF312471.1	390
CP1.0	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	CP001407.1	615
M25C	<i>Serratia marcescens</i> (100%)	GU22079	802
M50C	<i>Proteus mirabilis</i> (100%)	AM94275	410
PLA	<i>Citrobacter freundii</i> (98%)	AB548829	954
PLB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)	CP006659.1	450
U3	<i>Artthrobacter</i> sp. (98%)	JQ082129.1	818
U14	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99%)	CP003218.1	1406

Após 48 horas de incubação em meio LB suplementado com Hg nas concentrações de 0 a 1500 μM , foi observado alto nível de resistência em todos os isolados, mas com distintas capacidades de tolerância (Tabela 3). Os isolados avaliados apresentaram MIC entre 250 e 920 μM e MCB entre 550 e 1000 μM de Hg. As bactérias *Klebsiella oxytoca* U14, *Pseudomonas* sp. B50A e *Serratia marcescens* M25C foram as mais resistentes sendo extintas em 1000 μM de Hg. Resultado semelhante foi obtido por Chatziefthimiou et al. (2007), quando avaliaram microrganismos termófilos quimiolitotróficos de uma fonte termal com altas concentrações de Hg. Esses resultados indicam que a eficiência do sistema de detoxificação de mercúrio pode ser distinta nos diferentes microrganismos avaliados.

Todos os isolados avaliados removeram Hg do meio de cultura LB (Tabela 3). Os isolados *Citrobacter freundii* PLA e *Klebsiella pneumoniae* PLB foram os mais eficientes, e estatisticamente semelhantes na capacidade de volatilizar o Hg, sendo que os percentuais de volatilização apresentados por esses microrganismos foram maiores que 90%. Os isolados *Pseudomonas* sp. B50A, *Bacillus cereus* CP1.0, *Proteus mirabilis* M50C e *Klebsiella oxytoca* U14

foram capazes de remover aproximadamente 80% do mercúrio presente no meio de cultura. Sadhukham et al. (1997) avaliaram microrganismos resistentes ao mercúrio e obtiveram resultados semelhantes em relação a remoção de Hg após 24 horas de incubação. Nesse mesmo trabalho, foi verificado que a capacidade de remoção do Hg pelos microrganismos estava relacionada aos seus valores de CIM, confirmando os achados de Ghosh et al. (1995). Entretanto, neste estudo esta relação não foi comprovada, pois os isolados com mais altas CIM não foram os isolados mais eficientes em remover Hg. O isolado *Serratia marcescens* M25C apesar de remover apenas 52% do Hg apresentou uma das maiores CIM entre os isolados avaliados.

Os resultados sugerem que possivelmente a presença de metalotioneínas em alguns isolados, possa ter sido responsável pelos altos valores encontrados de CIM. Essas proteínas possuem resíduos de cisteína e metionina ricos em sulfidrilas, que complexam os metais, protegendo as células da toxicidade desses elementos (Erb et al., 1995). No entanto, a presença de metalotioneínas não foi avaliada neste estudo, para confirmar esta hipótese. Além disso, é possível que os genes do operon *mer* não foram induzidos suficientemente pela baixa concentração de Hg no meio de cultivo dos ensaios, já que a atividade da enzima mercúrio redutase é induzida e não constitutiva. Outra hipótese, é que os microrganismos analisados possuam diferentes modos de resistência que não foram avaliados neste trabalho.

Tabela 3: Isolado, CMI, concentração mínima biocida de mercúrio (CMB), remoção de Hg (%) em meio de cultura Lúria Bertani e biomassa (DO 600 nm) após 24 h de incubação a 30 °C.

Isolado	Remoção Hg (%)	Biomassa (DO 600 nm)	MCB (µM)	MIC (µM)
<i>Pseudomonas</i> sp. B50A	83,1 ± 2,2 b	1,68 ± 0,01	1000	920
<i>Bacillus cereus</i> CP1.0	77,6 ± 2,51 c	1,23 ± 0,05	550	250
<i>Serratia marcescens</i> M25C	52,4 ± 2,35 d	1,54 ± 0,05	1000	800
<i>Proteus mirabilis</i> M50C	83,5 ± 3,07 b	1,63 ± 0,11	870	750
<i>Citrobacter freundii</i> PLA	92,3 ± 2,51 a	1,78 ± 0,04	950	720
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PLB	90,2 ± 1,61 a	1,74 ± 0,04	870	750
<i>Arthrobacter</i> sp.U3	35,1 ± 5,05 e	1,43 ± 0,03	670	470
<i>Klebsiella oxytoca</i> U14	79,6 ± 1,61 c	1,54 ± 0,06	1000	820

Valores em colunas seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,01$).

Os resultados da amplificação dos produtos da PCR para os genes *merA* das oito bactérias avaliadas são apresentados na figura 1. A amplificação dos genes *merA* dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *S. marcescens* M25C tiveram o fragmento amplificado do tamanho esperado. No entanto, para os isolados *P. mirabilis* M50C, *C. freundii* PLA e *K. pneumoniae* PLB os amplicons tiveram tamanhos menores que 1238 pb, possivelmente por variações no tamanho da sequência dos genes *merA*, o que pode estar relacionado a alta diversidade dos genes *merA* (Ní et al. 2006; Oregard & Sorensen 2007). O isolado *K. pneumoniae* PLB apresentou duas bandas extras na amplificação, demonstrando que o *primer* pode ter baixa especificidade (Felske et al. 2003). Os isolados *B. cereus* CP1.0 e *Arthrobacter* sp.U3 são bactérias Gram-positivas utilizadas como controle negativo na reação. Já que os primers utilizados são específicos para bactérias Gram-negativas, sendo que as mesmas não foram amplificadas. O isolado *K. oxytoca* U14 foi negativo para os genes *merA*, mas considerando que o sistema *mer* é o modo mais comum

de resistência bacteriana ao mercúrio (Osborn et al. 1997; Barkay et al. 2003) é possível que o isolado possua os genes *merA*, porém devido a alta diversidade dos mesmos outros *primers* deveriam ter sido testados.

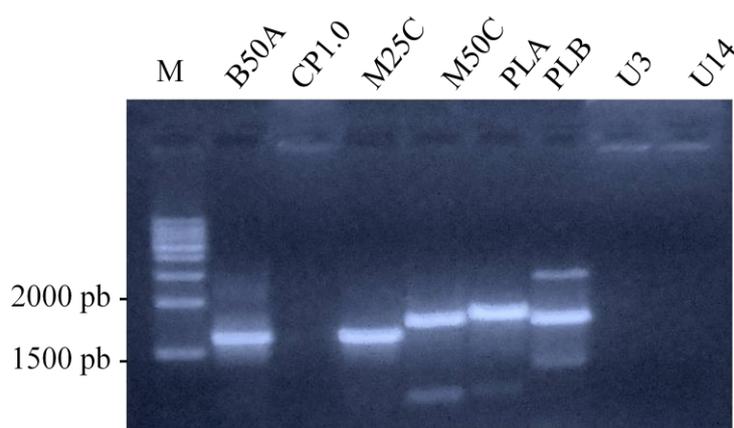


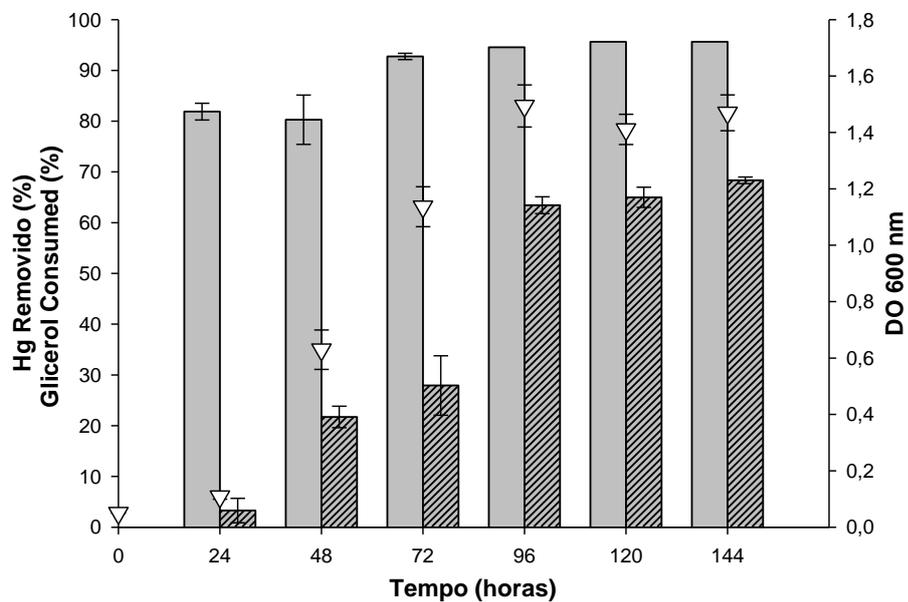
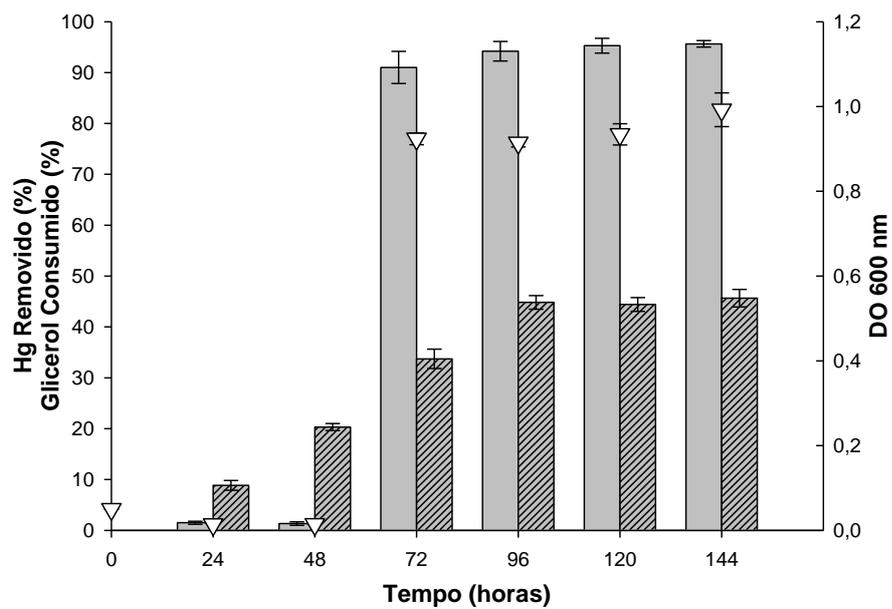
Figura 1. Amplificação dos produtos da PCR referentes aos genes *merA*. As linhas são identificadas com o nome do isolado bacteriano. A letra M se refere ao marcador de peso molecular.

Apenas os isolados *Pseudomonas* sp. B50A, *P. mirabilis* M50C e *K. pneumoniae* PLB apresentaram crescimento em meio de cultivo contendo glicerol residual como fonte de carbono sem adição de extrato de levedura (Figuras 2 A, B e C). Os três isolados degradaram o glicerol e removeram Hg do meio de cultivo, porém o crescimento bacteriano foi afetado negativamente pelo meio de cultivo se comparado ao meio LB. Embora nessas condições a fase de latência tenha sido mais longa, o crescimento foi observado, o glicerol degradado no decorrer do período de incubação, o que sugere que os 3 isolados foram tolerantes as impurezas do meio de cultivo provenientes do glicerol residual. O glicerol residual contém substâncias associadas como o

hidróxido de sódio e metanol que podem inibir o crescimento bacteriano (Thompson & He 2006).

A remoção do Hg pelo isolado *Pseudomonas* sp. B50A foi de 80% em apenas 24 h de incubação e chegou a 95% em 96 h, não dependendo de altas taxas de crescimento populacional (Figura 1A). Outros autores (Vetriani et al. 2005; Chatziefthimiou et al. 2007) também observaram que a remoção do Hg II precedia a alta concentração de células no meio de cultivo. Já a degradação do glicerol foi dependente da população bacteriana para os três isolados. Os mesmos entraram em fase estacionária após 72 h de incubação provavelmente devido a redução do pH do meio de cultura que chegou a 4,7 (dados não mostrados). Isso acontece devido à síntese de subprodutos formados a partir da degradação do glicerol (Biebl et al. 1999)

Para os isolados *P. mirabilis* M50C e *K. pneumoniae* PLB a remoção de Hg dependeu de alta população bacteriana (Figura 2: B e C), observando-se remoção efetiva do Hg a partir de 72 e 96 h de incubação respectivamente.

(A) *Pseudomonas* sp. B50A(B) *P. mirabilis* M50C

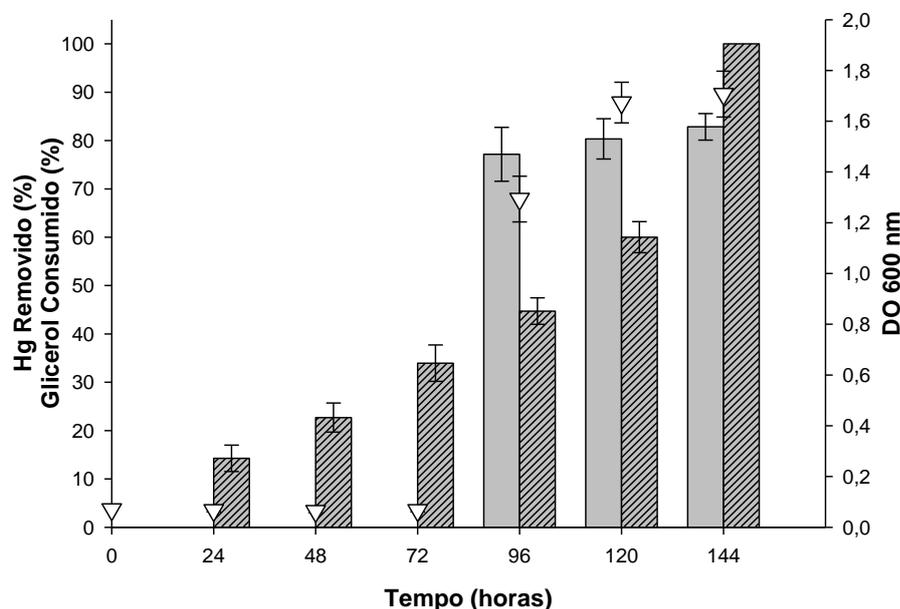
(C) *K. pneumoniae* PLB

Figura 2: Remoção de Hg (barras), consumo de glicerol (barras hachuradas), crescimento bacteriano ($\triangle\nabla$) em meio de cultivo MM1 acrescido de glicerol residual 10 g L^{-1} e HgCl_2 2 mg L^{-1} após incubação a $30\pm 2^\circ\text{C}$. Isolado *Pseudomonas* sp. B50A (A), *P. mirabilis* M50C (B), *K. pneumoniae* PLB (C). As barras de erro representam o desvio padrão da média

A adição de extrato de levedura ao meio de cultivo MM1 teve efeito positivo no crescimento dos isolados avaliados. Enquanto que, apenas três isolados cresceram em MM1 sem adição de extrato de levedura, oito apresentaram crescimento celular com adição de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura (Figura 3: A, B, C, D, E, F, G e H). O extrato de levedura além de fornecer fonte extra de nitrogênio e vitaminas também possui fonte de carbono que pode ser utilizada para a produção da biomassa (Níkel et al. 2010).

Os oito isolados entraram em fase logarítmica nas primeiras 24 horas, degradando o glicerol e removendo Hg (Figura 3: A, B, C, D, E, F, G e H). Quanto ao mercúrio, a maior parte foi removida nas primeiras 24 h de

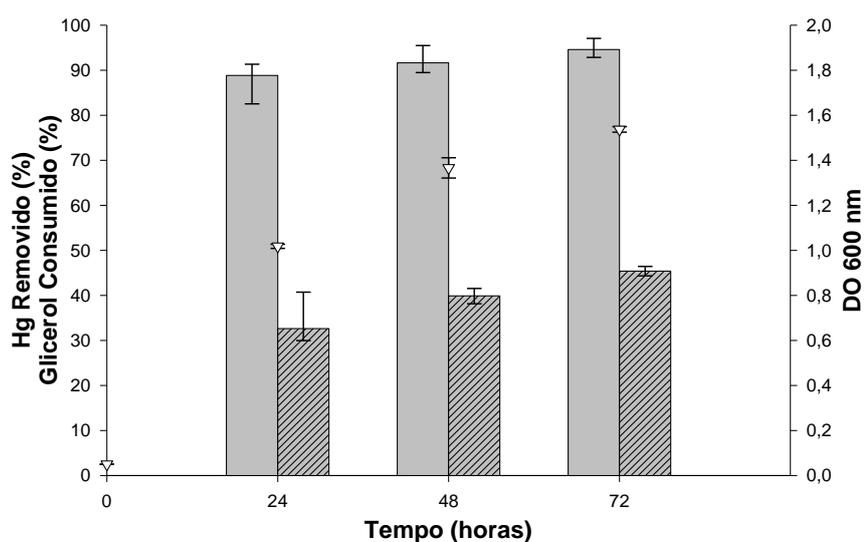
incubação, sendo essa, uma resposta positiva do ponto de vista prático. Já o glicerol dependeu do tempo de incubação e do crescimento celular para ser consumido. As bactérias *K. oxytoca* U14, *K. pneumoniae* PLB e *S. marcescens* M25C foram as mais eficientes em degradar o glicerol, exibindo 100% de degradação ao fim do experimento. São abundantes as pesquisas empregando bactérias do gênero *Klebsiella* que utilizam glicerol residual como fonte de carbono, e sua capacidade de degradar o glicerol estão bem documentadas (Mu et al. 2006; Zheng et al. 2008; Rodrigues et al. 2012; Rossi et al. 2012).

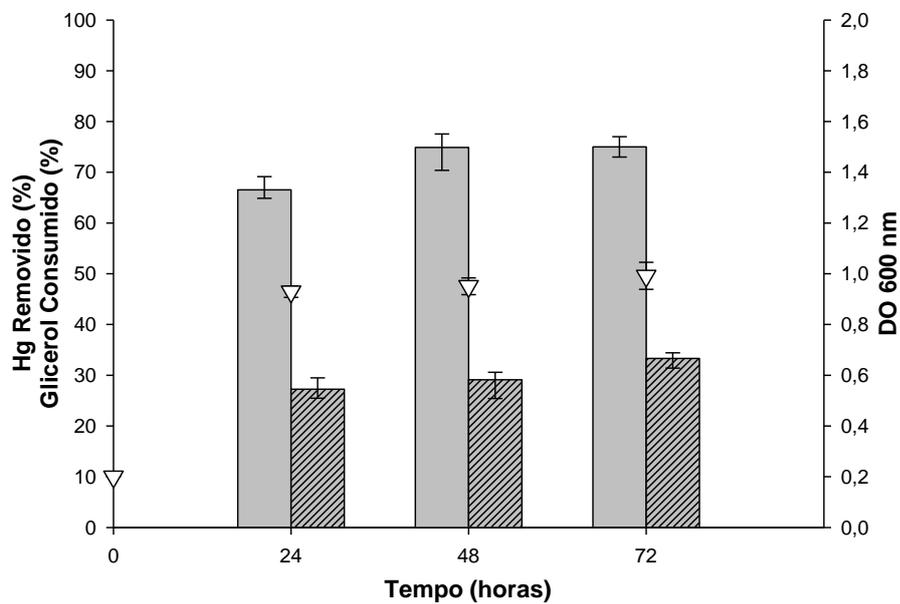
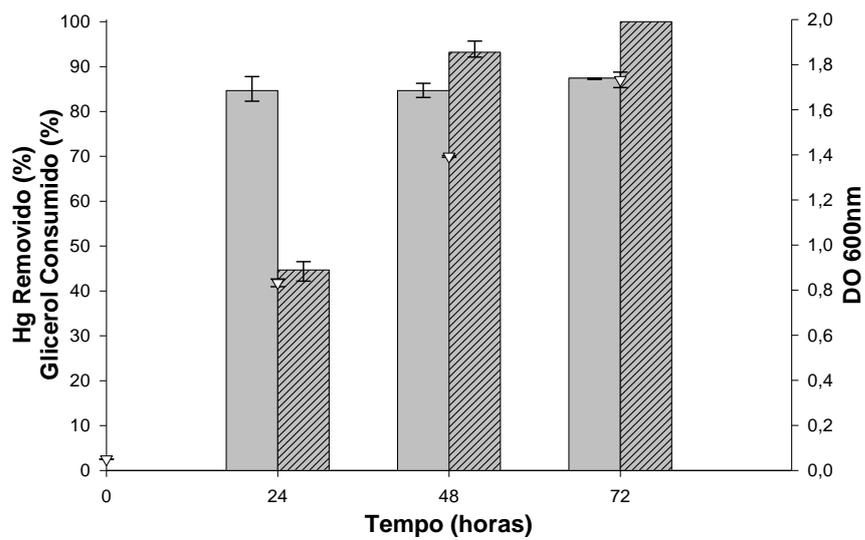
Foi observado que *Pseudomonas* sp. B50A, *S. marcescens* M25C, *P. mirabilis* M50C, *Arthrobacter* sp U3 e *K. oxytoca* U 14 removeram maior quantidade de Hg em meio de cultura MM1+extrato de levedura que em meio LB (Figura 2: A, C, D, G e H). Essa resposta positiva deve estar relacionada principalmente à constituição do meio de cultivo, já que o meio de cultura LB possui maior quantidade de ingredientes orgânicos complexos e hábeis a complexar o mercúrio. Vários dos constituintes comuns em meios de cultura se ligam aos metais influenciando a interação desses íons com os microrganismos (Ramamoorthy & Kushner 1975). Farrel et al. (1993) também demonstraram que o meio de cultivo pode ter efeito significativo na biodisponibilidade do Hg, de modo que a interpretação dos dados pode ser obscurecida pelos efeitos da composição do meio de cultura utilizado.

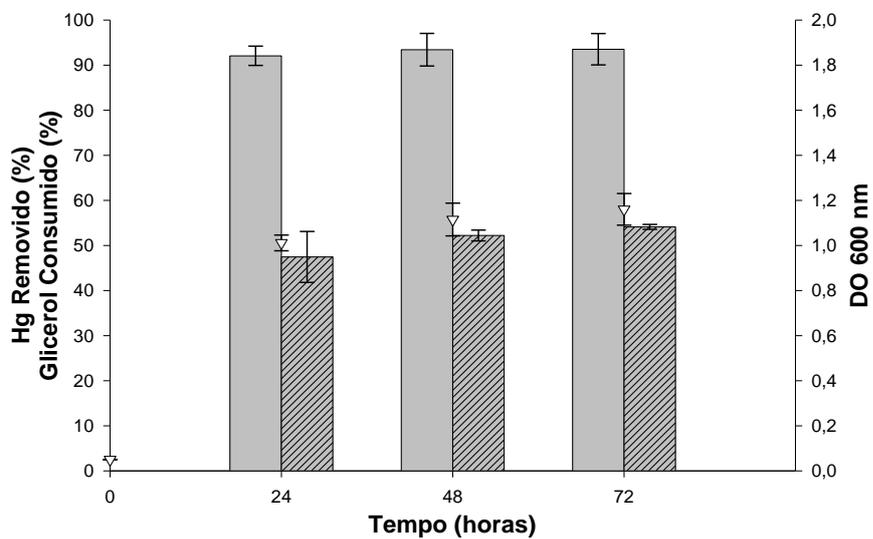
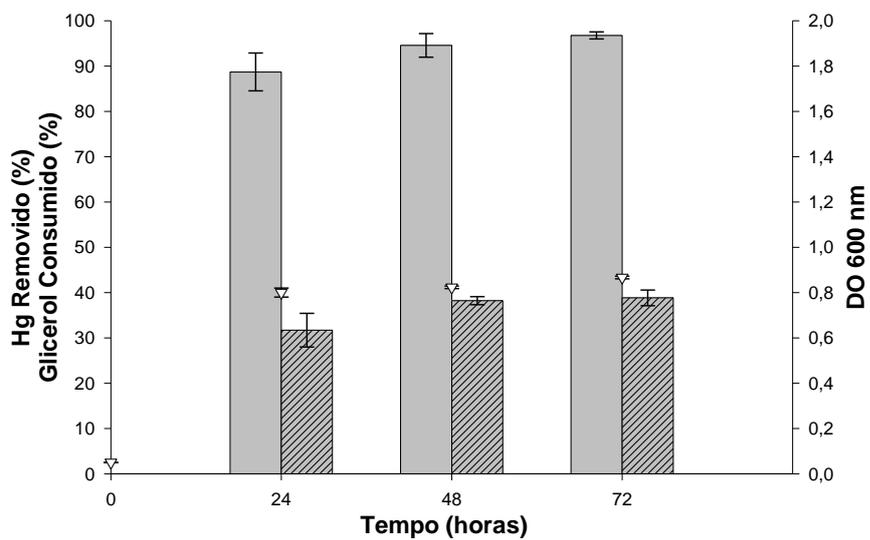
Arthrobacter sp. U3 apesar de não ter sido o isolado com melhor resposta à remoção de Hg e degradação do glicerol, apresentou resultado efetivo na remoção de Hg (80%) em 24 h de incubação e degradou 65% do

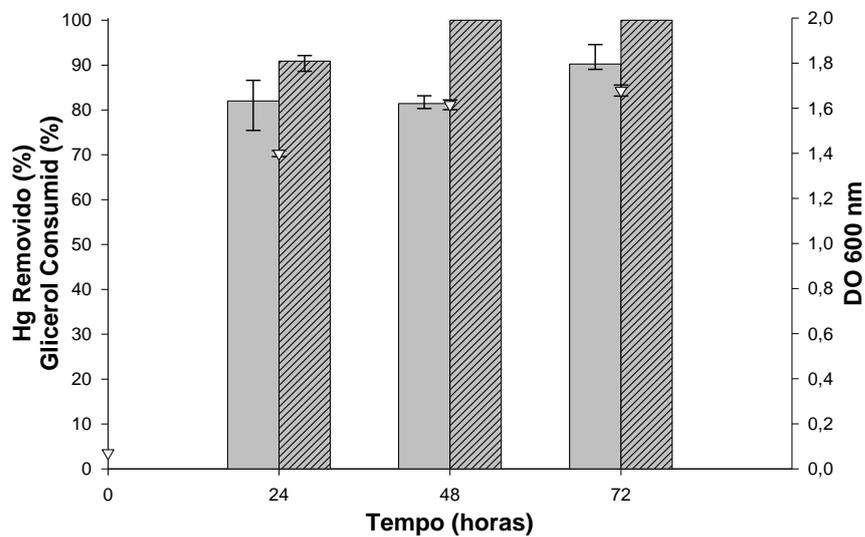
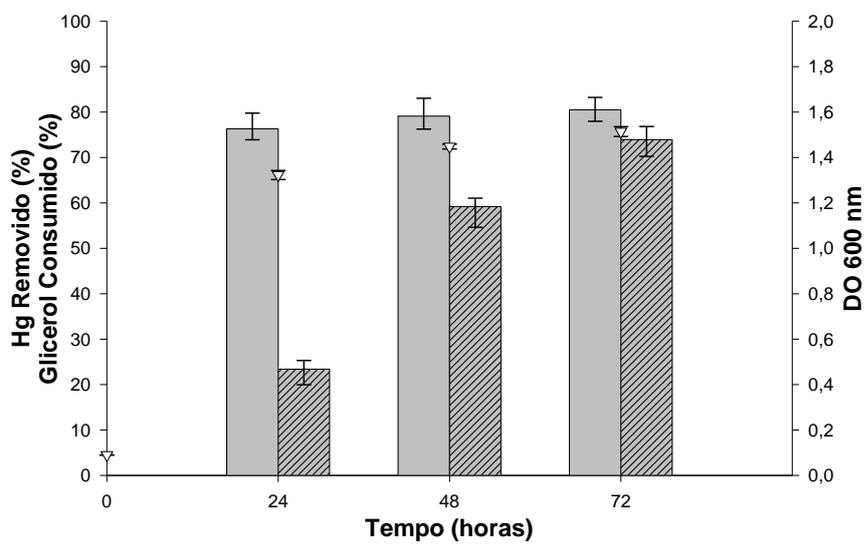
glicerol residual do meio de cultivo (Figura 3: G). Bactérias do gênero *Athrobacter* raramente causam doenças em humanos devido a sua baixa patogenicidade (Bernasconi et al. 2004). Comuns em solos, essas bactérias prosperam melhor que outras espécies bacterianas em ambientes estressados, como em pH alcalino e contaminados com metais (Camargo et al. 2004). Isso se deve a sua versatilidade metabólica e a capacidade que possuem de desintoxicar/degradar xenobióticos orgânicos e metais (Sajjaphan 2004). No entanto, existe pouca informação sobre a utilização desse gênero de bactéria na biorremediação de efluentes contaminados com Hg. Deste modo, esse isolado é um candidato promissor para outros estudos que visem a aplicação em efluentes contaminados com mercúrio com baixas taxas de carbono metabolizável.

(A) *Pseudomonas* sp. B50A



(B) *B. cereus*(C) *S. marcescens* M25C

(D) *P. mirabilis* M50C(E) *C. freundii*

(F) *K. pneumoniae* PLB(G) *Arthrobacter* sp. U3

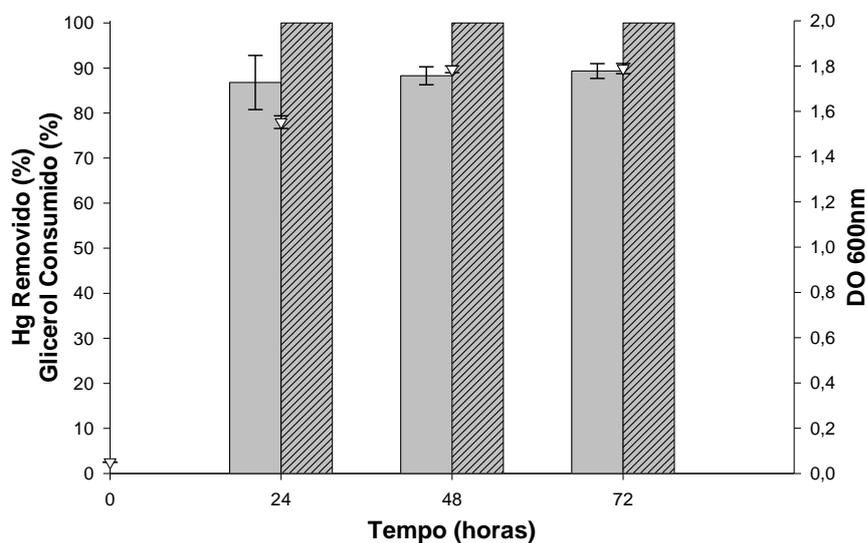
(H) *K. oxytoca* U14

Figura 3: Remoção de Hg (barras), consumo de glicerol (barras hachuradas), crescimento bacteriano (∇) em meio de cultivo MM1 acrescido de glicerol residual 10 g L^{-1} , extrato de levedura $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e HgCl_2 2 mg L^{-1} após incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Isolado *Pseudomonas* sp. B50A (A), *B. cereus* CP1 (B), *S. marcescens* M25C (C), *P. mirabilis* M50C (D), *C. freundii* PLA (E), *K. pneumoniae* PLB (F), *Arthrobacter* sp. U3 (G) e *K. oxytoca* U14 (H). As barras de erro representam o desvio padrão da média.

Conclusões

Cinco dos seis isolados Gram-negativos possuem os genes *merA*, o que confirma que provavelmente a remoção do Hg para esses isolados ocorra por volatilização. Este trabalho demonstra a viabilidade da utilização de glicerol residual como fonte de carbono para remoção biológica do Hg de ambientes contaminados. Os melhores resultados foram obtidos com a estratégia de adição de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura ao meio de cultivo, mantendo a viabilidade econômica da proposta. Os isolados avaliados apresentaram resposta positiva tanto na remoção do Hg quanto na degradação do glicerol

residual, sendo que o isolado *Arthrobacter* sp. U3 é um candidato promissor para aplicação no ambiente devido a sua baixa patogenicidade, alta taxa de remoção do Hg (80%) e degradação do glicerol (65%).

Referências Bibliográficas

Aiking et al (1985) Detoxification of mercury, cadmium and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture Appl Environ Microbio, 50:1262–1267

Amoros MJ, Abate CM (2012) Bioremediation of Copper, Chromium and Cadmium by Actinomycetes from Contaminated Soils In: Koethe E, Varma A (eds). Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils, Springer Heidelberg Dordrecht, London New York, pp349-364

Bafana A, Krishnamurthi K, Patil M, Chakrabarti T (2010) Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric salt-contaminated soil. J Hazard Mater 177:481–486

Ball MM, Carrero P, Castro D, Yarzabal LA (2007) Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolivar State, Venezuela). Curr Microbiol 54:149–154

Barkay T, Miller SM, Summers A (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev 27:355-384

Barkay T, Wagner-Döbler I (2005) Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. Adv App Microbiol 57:1-52

Bernasconi E et al (2004) *Arthrobacter woluwensis* Subacute Infective Endocarditis: Case Report and Review of the Literatur Clin Infect Dis 38:27-31

Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. Appl Microbiol Biotechnol 52:289–297

Bodík I, Blastáková A, Sedláček S, Hutnan M (2009) Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification. Bioresour Technol 100:2452-2456

Boening DW (2000) Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere 40:1335-1351

Cabral L, Giovanella P, Gianello C, Bento FM, Andrezza R, Camargo FAO (2013) Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. *Biodegrad* 24:319-331

Camargo FAO, Bento FM, Okeke BC, Frankenberger WT (2004) Hexavalent chromium reduction by an actinomycete, *Arthrobacter acrytallopoietes* ES 32. *Biol. Trace Elem. Res* 97:183–194

Camargo FAO, Bento FM, Jacques RJS (2007) Uso de microrganismos para remediação de metais. In: Ceretta CA, Silva LS, Reichert JM (eds) *Tópicos em Ciência do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Minas Gerais, pp 468–496

Chatziefthimou A, Crespo-Medina M, Wang Y et al (2007) The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotropic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs. *Extremophiles* 11:469–479

Chien M, Nakahata R, Ono T, Miysuke K, Endo G (2012) Mercury removal and recovery by immobilized *Bacillus megaterium* MB1. *Frontiers Chem Sci Eng* 6:192-197

Cruz Medina JÁC et al (2013) Isolation and Characterization of Mercury Resistant *Bacillus* sp. from Soils with an Extensive History as Substrates for Mercury Extraction in Mexico, *Geomicrobiol J* 30:454-461

Dasari MA, Kiatsimkul PP, Sutterlin, Suppes GJ (2005) Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Appl Catal A-Gen*, 281:225–231

Dash HR, Das S (2012) Bioremediation of mercury and importance of bacterial *mer* genes. *Int Biodeterior Biodeg* 75:207–213

Dash HR, Mangwani N, Das S. (2013) Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21:2642-53

Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ Pirrone N (2013) Mercury as a global pollutant: Sources, pathways, and effects. *Environ Sci Technol* 47:4967-4983

Erbe JL, Taylor KB, Hall LM (1995) Metalloregulation of the cyanobacterial *smt* locus: identification of SmtB binding sites and direct interaction with metals. *Nucleic Acids Res* 23:2472–2478

Escapa A, Manuel MF, Morant A, Gomez X, Guiot SR, Tartakovsky B (2009) Hydrogen production from glycerol in a membraneless microbial electrolysis cell. *Energy Fuels* 23:4612-4618

Farrell RE, Germida JJ, Huang PM (1993). Effects of chemical speciation in growth media on the toxicity of mercury(II). *Appl Environ Microbiol* 59:1507–1514

Felske ADM, Fehr W, Pauling BV, Von Canstein H, Wagner-Döbler I (2003) Functional profiling of mercuric reductase (*merA*) genes in biofilm communities of a technical scale biocatalyzer. *BMC Microbiol* 3-2.

Fortunato R, Crespo JG, Reis MAM (2005) Biodegradation of thiomersal containing effluents by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. *Water Research* 39:3511–3522

Ghosh S, Sadhukhan PC, Ghosh DK, Chaudhuri J, Mandal A (1996) Studies on the effect of mercury and organomercurial on the growth and nitrogen fixation by mercury-resistant *Azotobacter* strains. *J Applied Microbiol* 80:319–326

Guerrero J, Tayà C, Guisasola A, Baeza JA (2012) Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res* 46:2983–2991

Hobman JL (2007) MerR family transcription activators: similar designs different specificities. *Mol Microbiol* 65:1275–1278

Johnson DT, Taconi KA (2007). The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Progress* 26:338-348

Kannan SK, Krishnamoorthy R (2006) Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury: A case study in Pulicat lake north of Chennai, South East India. *Sci Total Environ* 367:341–353

Keramati P, Hoodaji M, Tahmourespour A (2012) Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to Mercury isolated from dental clinic effluent. *Afr J Microbiol Res* 5:831–837

Kono M, O'Hara K, Arai Y, Fukuda H, Asakawa M, Nakahara H (1985) Inactivation and sedimentation of mercury from organomercurials by *Klebsiella pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 28:213–217

Li J, Zhang L, Wu Y, Liu Y, Zhou P, Wen S et al (2009) A national survey of polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) in human milk in China. *Chemosphere* 75:1236–1242

Liebert CA, Wireman J, Smith, Summers AO (1997) Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Appl Environ Microbiol* 63:1066–1076

Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev* 109:4644–4681

Maxson P (2005) Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales. In: Pirrone N, Mahaffey KR (eds) Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World. Springer: New York, pp 25-50

Mortazavi S, Rezaee A, Khavanin A, Varmazyar S, Jafarzadeh M (2005) Removal of mercuric chloride by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. *J Biol Sci* 5:269–273

Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL (2006) Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol Lett* 28:1755–1759

Naja GM, Volesky B (2010) Treatment of metal-bearing effluents: removal and recovery. In: Wang LK, Chen JP, Hung YT, Shammas NK (eds) Handbook on heavy metals in the environment. CRC Press, Boca Raton, pp 247–291

Narita M, Chiba K, Nishizawa H et al (2003) Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. *FEMS Microbiol Lett* 223:73–82

Ní Chadhain, SM, Schaefer JK, Crane S, Zylstra GJ, Barkay T (2006) Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. *Environ Microbiol* 8:1746–1752

Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:730–750

Nikel PI, Ramirez MC, Pettinari MJ, Méndez BS, Galvagno MA (2010) Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing *adhE* from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Appl Microbiol* 109:492–504

Oregaard G, Sørensen SJ (2007). High diversity of bacterial mercuric reductase genes from surface and sub-surface floodplain soil (Oak Ridge, USA). *ISME J* 1:453–467

Osborn AM, Bruce KD, Strike, Ritchie DA (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol Rev* 19:239–262

Pepi M et al (2010) Mercury-resistant bacterial strains *Pseudomonas* and *Psychrobacter* spp. isolated from sediments of Orbetello Lagoon (Italy) and their possible use in bioremediation processes. *Int Biodeter Biodegr* 65:85–91

Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, et al (2010) Global Mercury Emissions to the Atmosphere from Natural and Anthropogenic Sources *Atmos. Chem Phys* 10: 5951–5964

Ramamoorthy S, Kushner DJ (1975) Binding of mercury and other heavy metal ions by microbial growth media. *Microb Ecol* 2:162-176

Rossi DM, Costa JB, Souza EA, Peralba MCR, Ayub MAZ (Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. *Renew Energ* 39:223-227

Rodriguez MAA, Gozzi A, Abreu Filho BA, Zanin GM, Moraes FF (2012). Potential of *Klebsiella oxytoca* for 1,3-propanediol production from glycerol under excess substrate conditions. *Afr J Biotechnol* 11:12675–12681

Sadhukhan S, Ghosh J, Chaudhuri DK, Ghosh A (1997) Mandal mercury and organomercurial resistance in bacteria isolated from freshwater fish of wetland fisheries around Calcutta *Environ Pollut* 97:71–78

Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, Palmer M, Blackmon B, Tomkins J, Sadowsky J (2004) *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70:4402–4407

Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Arbor, New York

Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27: 30–39

Silver S, Hobman JL (2007) Mercury microbiology: resistance systems, environmental aspects, methylation, and human health. *Microbiol Monographs* 6:357-370

Sone Y, Mochizuki Y, Koizawa K, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M (2013) Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68. *AMB Express* 3:41

Sorkhoh N et al (2010) Soil bacteria with the combined potential for oil utilization, nitrogen fixation, and mercury resistance *Int. Biodeterior Biodegrad* 64:226–231

Summers AO (1992) Untwist and shout: a heavy metal responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 174:3097–3101

Thompson JC, He BB (2006) Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl Eng Agric* 22:261-265

Torà JA, Baeza JA, Carrera J, Oleszkiewicz JA (2011) Denitritation of a high-strength nitrite wastewater in a sequencing batch reactor using different organic carbon sources. *Chemical Engineering Journal* 172:994-998

UNEP. <http://www.chem.unep.ch/mercury/report/GMA-report-TOC.htm>.
acessado em 23 de Setembro de 2013

Vetriani C et al (2005) Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* 71:220–226

Waldron KJ, Robinson, NJ (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal *Nat Rev Microbiol* 7:25-35

Wagner-Döbler I (2003) Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater *Appl Microbiol Biotechnol* 62:124–133

Yazdani SS, Gonzales R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curren Opin Biotechnol* 18:213-219.

Yuan Q, Sparling R, Lagasse P, Lee YM, Taniguchi D, Oleszkiewicz JA (2010) Enhancing biological phosphorus removal with glycerol. *Water Sci Technol* 61:1837-1843

Zeng AP, Sabra W (2011) Microbial production of diols as platform chemicals: recent progress. *Curr Opin Biotechnol* 22:749–757

Zhang R, Wang Y, Gu JD (2006). Identification of environmental plasmid-bearing *Vibrio* species isolated from polluted and pristine marine reserves of Hong Kong and resistance to antibiotics and mercury. *Antoine van Leeuwenhoek* 89:307-315

Zhang W, Chen L, Liu D (2012) Characterization of a marine-isolated mercury resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1305–1314

Zeroual Y, Moutaouakkil A, Blaghen M (2001) Volatilization of mercury by immobilized bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) in different support by using fluidized bed bioreactor. *Curr Microbiol* 43:322–327

3.2 RESULTADOS II

Biorremocão de metais e mecanismos relacionados à resistência de *Pseudomonas* sp. B50D

Resumo

A contaminação do ambiente por metais pesados tem aumentado nos últimos anos devido as atividades industriais. Na perspectiva das pesquisas envolvendo metais, a urgência está em estudar micro-organismos com diferentes mecanismos de resistência, a fim de se encontrar candidatos potenciais a biorremocão de ambientes com contaminações metálicas mais complexas. Os objetivos deste estudo foram avaliar a remoção de mercúrio em meio de cultura por quatro micro-organismos resistentes ao Hg, analisar a remoção de mercúrio na presença de Cd, Ni e Pb, assim como, estimar a remoção de Cd, Ni e Pb e conhecer os mecanismos envolvidos na resistência aos metais do isolado *Pseudomonas* sp. B50D. Os quatro isolados removeram mercúrio em meio de cultivo sem adição de outros metais com taxas de remoção entre 62 a 95%. O isolado *Pseudomonas* sp B50D foi o que apresentou melhor desempenho quando avaliada remoção de mercúrio concomitante a outros metais. Sua capacidade de remover Hg na presença de Cd foi de 75%, Ni e Pb (91%) . Além da remoção do mercúrio o isolado removeu 60% (Cd), 90% (Ni) e 85% de Pb. *Pseudomonas* sp. B50D apresenta como mecanismos de resistência aos metais a redução, biossorção, produção de biofilme e produção de sideróforos, sendo um candidato com potencial aplicação na biorremediação de efluentes com contaminações metálicas complexas.

Introdução

A contaminação do ambiente por metais tem aumentado nos últimos anos devido as mais diversas atividades industriais. Os resíduos gerados pela indústria metalúrgica, petroquímica, de baterias, de cloro-soda e mineração, podem conter um ou mais metais pesados tóxicos, apresentando problemas de co-contaminação (Kadirvelu, 1998). Os metais não são biodegradáveis e têm tendência a biomagnificação na cadeia trófica causando sérios impactos na saúde do homem e nos ecossistemas (Li et al., 2013). Entre os metais, o cádmio, mercúrio, chumbo e níquel são extremamente tóxicos em baixas concentrações (Waalkes et al., 1992; Fu, 2011), exigindo especial atenção ao tratamento de efluentes e resíduos contaminados antes de serem liberados ao ambiente.

A remediação de ambientes contaminados com cátions metálicos tóxicos tem empregado convencionalmente, técnicas físico-químicas que incluem precipitação, filtração e recuperação eletroquímica. Assim como, separação por membrana, escavação, depósito de resíduos em aterros sanitários ou ainda recobrimento do sítio contaminado. Essas técnicas são pouco eficazes, tem custo elevado e geralmente produzem resíduos adicionais com maior potencial de contaminação (Camargo et al., 2007; Naja & Volesky 2010).

Nos últimos anos, têm se dado maior atenção aos métodos biológicos de remediação de metais pesados, devido ao baixo custo de operação, alta eficiência de remoção, bom desempenho em baixas concentrações de metais (Teemu et al., 2008) e por serem alternativas mais

ecologicamente corretas (Mishra & Malik, 2013). Nesse contexto, as bactérias são candidatas promissoras por apresentarem sistemas especializados de resistência aos metais (Nies, 1999). Entre os mecanismos de resistência aos metais, alguns deles como bioacumulação, biossorção, redução, oxidação (Nies, 1999), produção de sideróforos (Schalk et al., 2011; Braud et al., 2009b) e formação de biofilmes (Taga & Bassler, 2003; von Bodman et al., 2003) podem ser explorados para a desenvolvimento de tecnologias limpas e de apoio as tradicionais no controle da poluição por metais.

Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade das bactérias removerem mercúrio de ambientes contaminados por esse metal. No entanto, pouca pesquisa tem sido feita no que diz respeito à remoção de mercúrio em ambientes co-contaminados por outros metais. Na perspectiva das pesquisas envolvendo metais, a urgência está em estudar micro-organismos com diferentes mecanismos de resistência, a fim de se encontrar potenciais candidatos a biorremoção de ambientes com contaminações de diversas origens. Deste modo, os objetivos deste estudo foram avaliar a remoção de mercúrio por quatro micro-organismos resistentes ao Hg, analisar a remoção de mercúrio na presença de metais como Cd, Ni e Pb, estimar a remoção de Cd, Ni e Pb e conhecer os mecanismos envolvidos na resistência aos metais do isolado *Pseudomonas sp.*B50D.

Material e métodos

Micro-organismos

As bactérias *Pseudomonas putida* C50A, *Pseudomonas* sp. B50D, *Alcaligenes faecalis* U21 e *Brevundimonas* sp.U22 foram isoladas e identificadas em trabalhos anteriores a partir de resíduos e efluentes contaminados com metais.

Preparo de células para os ensaios

Os inóculos bacterianos dos ensaios nos diferentes meios de cultivo foram padronizados como descrito abaixo.

Cada isolado resistente ao mercúrio foi inoculado em meio de cultura contendo HgCl_2 (10 μM) incubado por 24 h a 30 ± 2 ° C sob agitação de 130 rpm. Os inóculos foram padronizados em 10^7 UFC mL^{-1} iniciais pela turbimetria, analisando a densidade óptica a 600 nm e a correspondente quantidade de UFC mL^{-1} em placas. Frascos com meio de cultura não inoculado serviram como controle negativo.

Análise dos genes *merA* e *merB* por PCR

Para a extração de DNA, colônias isoladas foram incubadas em meio de cultura Luria Bertani por 24 horas a 30°C, para posteriormente passarem pelo processo de extração de DNA. O DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. Para verificar se a extração de DNA foi

eficiente, 20 μL do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a amplificação dos genes *mer* foi realizada uma reação contendo 5 μL de 10x tampão de PCR, 1,5 μL de 25 mM MgCl_2 , 1 μL de 10 mM dNTPs, 0,02 U de Taq DNA polymerase (Denville, NJ), 0,5 μL de 20 pmol μL^{-1} de cada primer (forward e reverse), 16,75 μL de água ultrapura e 1 μL de DNA. Para a detecção dos genes *merA* foram utilizados os primers A1 F (ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT) e A5 R (ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC) (Liebert et al. 1997) (1238 pb). O programa básico de amplificação constou de 1 ciclo a 95 °C por 5 min, seguido de 29 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 2 min, e 90 °C por 3 min, 1 ciclo final de 5 min a 72 °C. Para a detecção dos genes *merB* foram utilizados os primers IA34F (TTGGATCCATGAAGCTCGCCCCAT) e IA35R (TTGGTACCCTAGATGACATGACAT) (Santos-Goldelman et al. 2014) (640 pb). O programa de amplificação constou de 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 °C, 1 min a 72 °C, 1 ciclo final de 10 min a 70 °C.

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas em iluminação ultravioleta.

Remoção de mercúrio, cádmio, chumbo e níquel pelos isolados em meio LB

Aproximadamente 10^7 UFC mL^{-1} dos isolados foram inoculados em meio LB contendo 10 μM de HgCl_2 e a esse meio foi adicionado cádmio, chumbo ou níquel. As concentrações testadas foram: CdCl_2 (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4

mM), NiCl_2 (0,25; 0,5; 1 e 1,5) e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0,25; 0,5; 1; 1,5 mM). Após a incubação de 24 h, amostras foram retiradas para determinação de pH, biomassa (DO 600 nm), mercúrio, cádmio, níquel e chumbo remanescentes.

A remoção de CdCl_2 , NiCl_2 e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ foi avaliada utilizando a metodologia de Li et al., 2013 com modificações. Dois mL do meio de cultivo foram centrifugados por 3 min a 5000 RPM e sobrenadante digerido com ácido nítrico (20%) e perclórico (10%). A concentração do metal na solução diluída foi mensurada por espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer optima 7000 DV).

A determinação de mercúrio remanescente nas amostras foi realizada conforme metodologia EPA 7471B, utilizando o método de espectrofotometria de absorção atômica/geração de vapor frio. O equipamento utilizado para este experimento foi da marca Perkin Elmer (Analyst 100). Inicialmente, foi retirado 100 μL da amostra homogeneizada do cultivo bacteriano. Essa amostra foi tratada com 5 mL de H_2SO_4 (98%), 2 mL de HNO_3 (65%) e 10 mL de uma solução de KMnO_4 (70 g L^{-1}). Após esse procedimento, a mistura foi submetida à temperatura de 121°C e 1,5 ATM por 15 min. Em seguida, adicionou-se 50 mL de água deionizada e 6 mL de CINH_2OH_2 (100 g L^{-1}). Então o mercúrio foi convertido a forma de Hg^0 pelo tratamento com uma solução de SnCl_2 (50 g L^{-1}). O mercúrio elementar formado foi analisado em espectrofotômetro de absorção atômica, com a medida da absorbância 253,7 nm.

Em todos os tratamentos foi utilizado como controle negativo meio de cultura LB contendo metal e não inoculado e como controle positivo meio de cultura LB inoculado sem metal.

Caracterização da resistência aos metais e mecanismos de resistência de *Pseudomonas* sp. B50D.

Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O isolado *Pseudomonas* sp. B50D foi testado quanto a concentração mínima inibitória de HgCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em placas de poliestireno de 96 poços em meio LB contendo diferentes concentrações dos metais avaliados. Após inoculação os cultivos foram incubados por 48 horas a 30 ± 2 °C sob agitação de 100 rpm e o crescimento avaliado visualmente pela turvação do meio de cultura. A menor concentração de metal capaz de inibir o crescimento microbiano foi considerada a concentração mínima inibitória (CMI). Como controle negativo foi utilizado meio de cultura LB não inoculado e como controle positivo meio de cultura LB sem metal.

Concentração Mínima Biocida (CMB)

O isolado *Pseudomonas* sp. B50D foi testado quanto a concentração mínima biocida de HgCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em placas de poliestireno de 96 poços em meio LB contendo diferentes concentrações dos metais avaliados. O meio de cultura inoculado foi incubado por 48 horas a 30 ± 2 °C sob agitação de 100 RPM. Após 48 h de incubação, 25 µL da cultura foi inoculada

em placas de Petri contendo meio Agar nutriente. A concentração biocida foi verificada após o período de 72 h de incubação a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, pela presença ou ausência de crescimento microbiano nas placas. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura LB não inoculado e como controle positivo meio de cultura LB sem metal.

Ensaio de bioacumulação e bioissorção

O metal acumulado na superfície celular e intracelular foi determinado de acordo com Li et al, 2013 com modificações. Ao meio de cultivo LB contendo 0,1 mM de CdCl_2 , NiCl_2 ou $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 10^7 UFC ml^{-1} do isolado B50D foi inoculado e incubado por 24 h sob agitação de 130 RPM a 30°C . Após a incubação, 10 ml do cultivo foram centrifugados por 3 min a 5000 RPM e as células bacterianas do pellet foram lavadas duas vezes com água ultrapura. As células foram ressuspensas em 10 mL^{-1} de Etilenlenodiamino tetra acético (EDTA) 20 mM e deixadas em repouso por 30 min. Após esse período a solução foi centrifugada e o sobrenadante bem como as células foram digeridas em ácido nítrico e perclórico a 130°C por 2 h e os metais quantificados por espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer optima 7000 DV).

Formação de biofilmes

A formação de biofilmes foi quantificada conforme metodologia de Dash et al., 2013. Em placas de 96 poços foram adicionados 200 μL de meio de cultura LB inoculados com 10^7 UFC/ml de células do isolado *Pseudomonas*

sp. B50D. As concentrações e os de metais testadas foram: NiCl_2 0,25 mM e 0,5 mM, HgCl_2 10 μM e 25 μM , CdCl_2 0,1 e 0,2 mM e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,25 e 0,5 mM. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura LB não inoculado e como controle positivo meio de cultura LB sem os metais.

Após 72 h de incubação a 30°C sem agitação, o meio de cultura foi removido e as placas lavadas 3 vezes com solução salina a 0,9% e deixadas para secar por 45 min a 30°C. A coloração das células aderidas foi feita com violeta a 1% por 10 min. Posteriormente, o corante foi retirado e feita a lavagem com solução salina a 0,9% 5 vezes sendo a última lavagem realizada com etanol 95%. A quantificação do biofilme formado foi feita pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Detecção de sideróforo em solução pelo método do CAS

Todas as bactérias foram avaliadas quanto a produção de sideróforos após 24h de incubação a 30°C com um inóculo inicial de 10^7 UFC por mL de meio de cultivo. O meio para análise quantitativa da produção de sideróforos foi o caldo nutriente (3 g L^{-1} de extrato de carne e 5 g L^{-1} de peptona bacteriológica). Ao meio de cultivo descrito anteriormente foram adicionados os metais NiCl_2 0,25; 0,5 e 1 mM, HgCl_2 10, 25 e 10 μM , CdCl_2 0,1; 0,2 e 0,3 mM e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,25 e 0,5 e 1 mM. Foram utilizados dois controles, o primeiro contendo meio de cultivo nutriente inoculado sem os metais e o segundo contendo apenas o meio de cultivo sem inoculação e com adição dos metais..

A metodologia para quantificação de sideróforo em solução foi efetuada conforme (Schwyn & Neiland, 1987) com modificações. A solução de

cromoazurol S (CAS) foi feita como descrito a seguir. Seis mL de HDTMA 10 mM foram adicionados em balão volumétrico de 100 mL e diluído em água ultra pura. Uma mistura de 1,5 mL de ferro III (1mM Fe₃Cl₃ em HCl 10 mM) e 7,5 mL de solução CAS (2 mM) foi adicionada ao balão volumétrico. Piperazina anidra 4,307g foi dissolvida em água ultra pura e 6,25 mL de HCl 12 M foram adicionados. Essa solução (pH 5,6) foi adicionada ao balão volumétrico até completar os 100 mL.

Uma alíquota 2 mL do cultivo foi centrifugada por 5 min a 14000 RPM. Retirou-se 1 ml do sobrenadante e adicionou-se a 1 mL da solução de CAS. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 630 nm. Foi utilizado como branco o meio de cultura não inoculado com a adição dos metais. O cálculo para a produção de sideróforos será realizado da seguinte maneira: $A - A_b$ (A=absorbância da amostra, A_b = absorbância do branco) (Schwyn & Neiland, 1987).

Resultados e Discussão

Quatro bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio previamente isoladas foram avaliadas. Todos os isolados avaliados apresentaram capacidade de remover mercúrio do meio de cultivo (Tabela 1), sendo que os isolados *Pseudomonas* sp.B50D e *Alcaligenes faecalis* U21 foram os que apresentaram melhores resultados, removendo aproximadamente 90% do mercúrio presente no meio de cultivo. Inúmeros trabalhos têm mostrado que bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem capacidade de remover mercúrio (Giovanella et al. 2010, Zhang et al. 2012; Cabral et al. 2013,

Sone et al. 2013). Resultados semelhantes foram observados por Giovanella et al, 2010 quando avaliou a remoção de mercúrio por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Bactérias do gênero *Alcaligenes* também foram caracterizadas e descritas como removedoras de mercúrio por De et al. 2008 e Gupata & Nirwan, 2014. O isolado *Brevundimonas* sp.U22 foi o isolado que demonstrou menor capacidade de remoção de mercúrio (62%). Bactérias classificadas como *Brevundimonas* ainda não foram caracterizadas com relação a remoção de Hg, provavelmente devido a reclassificação de espécies de *Pseudomonas* como *Brevundimonas*.

Tabela 1. Identificação do Isolado bacteriano, remoção de Hg (%) em meio de cultura Lúria Bertani e biomassa (DO 600 nm).

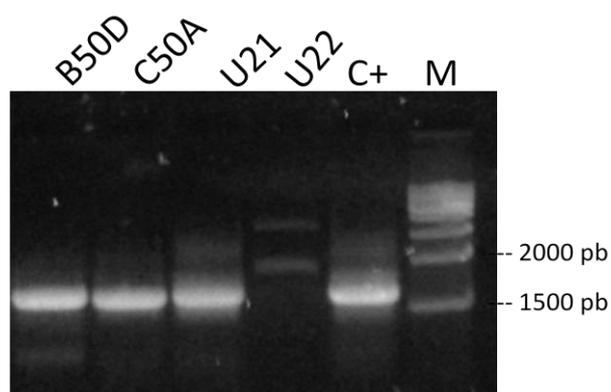
Isolado	Hg Removido (%)	Biomassa (DO 600 nm)
<i>Pseudomonas putida</i> C50A	85,78,±2,23b	1,81±0,08
<i>Pseudomonas</i> sp.B50D	91,66±2,081a	1,76±0,12
<i>Alcaligenes faecalis</i> U21	95,72±1,88a	2,18±0,20
<i>Brevundimonas</i> sp.U22	62,33±3,61c	1,32±0,16

Valores em colunas com diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Três isolados bacterianos tiveram os genes *merA* amplificados (*P. putida* C50A, *Pseudomonas* sp.B50D e *A. faecalis* U21). Os genes *merA* não foram detectados no isolado *Brevundimonas* sp., assim como não foi possível detectar os genes *merB* em nenhum dos isolados avaliados (Figuras 1 A e B). Liebert et al., (1997) constataram a presença dos genes *merB* utilizando hibridização e PCR em apenas 18% dos isolados resistentes ao mercúrio orgânico. Santos-Gandelman et al., 2014 utilizando os mesmos primers

empregados neste estudo, identificaram os genes *merB* em 10 dos 21 isolados avaliados, sendo que todos os positivos eram resistentes a metilmercúrio. No presente estudo, não foi avaliada a concentração inibitória das formas orgânicas de mercúrio, mas a inorgânica divalente (HgCl_2). Assim, estudos complementares com o emprego de outros primers para *merB* e o teste da concentração inibitória de formas orgânicas de mercúrio poderiam ser realizadas para elucidar a presença ou ausência dos genes *merB*.

(A) *merA*



(B) *merB*

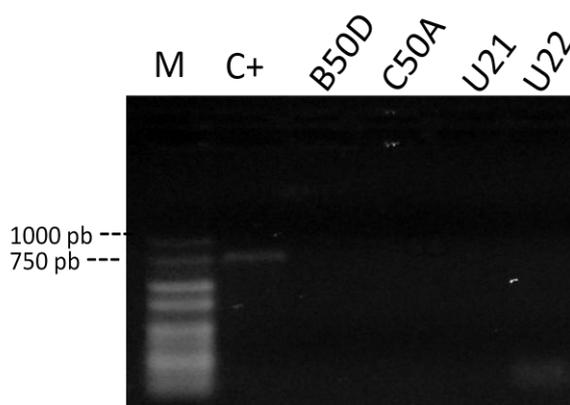


Figura1. Amplificação dos produtos da PCR referentes aos genes *merA* (A) e *merB* (B). As linhas são identificadas com o nome do isolado bacteriano. A letra M se refere ao marcador de peso molecular e C+ o controle positivo.

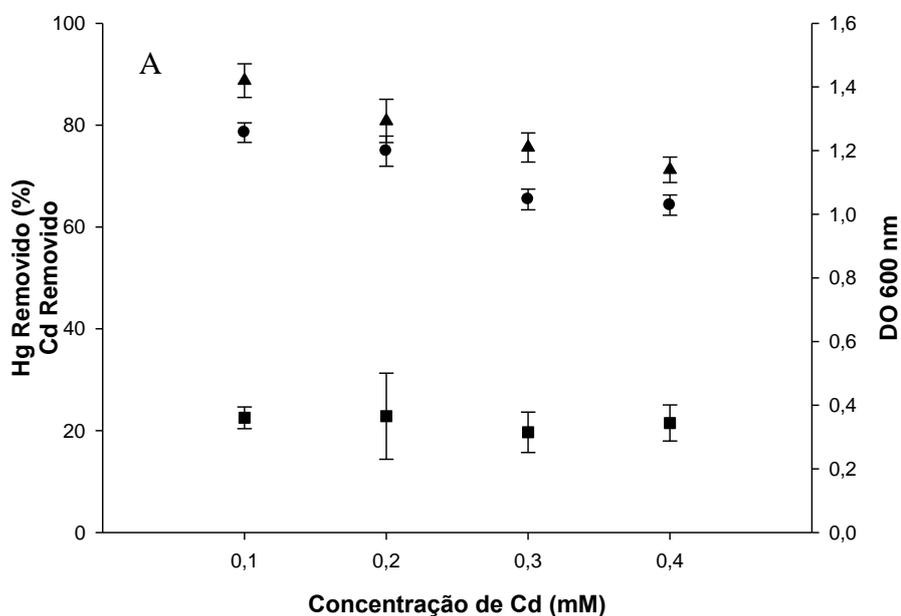
Nas Figuras 2 A, B, C e D podemos observar a remoção de mercúrio e de cádmio pelos diferentes isolados. Quando o cádmio foi adicionado ao meio de cultivo a capacidade dos isolados removerem mercúrio foi afetada negativamente, exceto para o isolado *Alcaligenes faecalis* U21 que manteve a capacidade de remoção (90%) até a penúltima concentração testada (0,3 mM), apresentando um decréscimo pouco acentuado na concentração de 0,4 mM. Na primeira concentração de cádmio testada (0,1 mM), a capacidade do isolado *Pseudomonas* sp. B50D remover mercúrio sofreu pouca influência, sendo que na dose mais alta de cádmio (0,4 mM) ele ainda foi capaz de remover 75% do mercúrio presente no meio de cultivo. A diminuição da remoção do mercúrio pode estar relacionada à inibição da enzima mercúrio redutase pela presença de outro metal no meio. No estudo de Ray et al., (1993) o cádmio inibiu 100% da atividade da enzima mercúrio redutase no extrato bruto de *Beijerinckia mobilis* na concentração de 10 μ M.

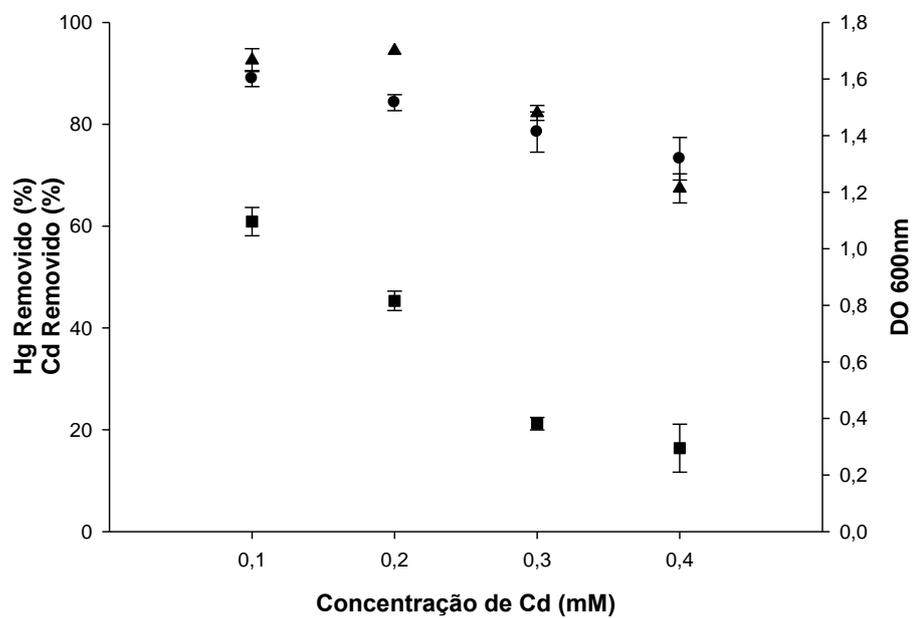
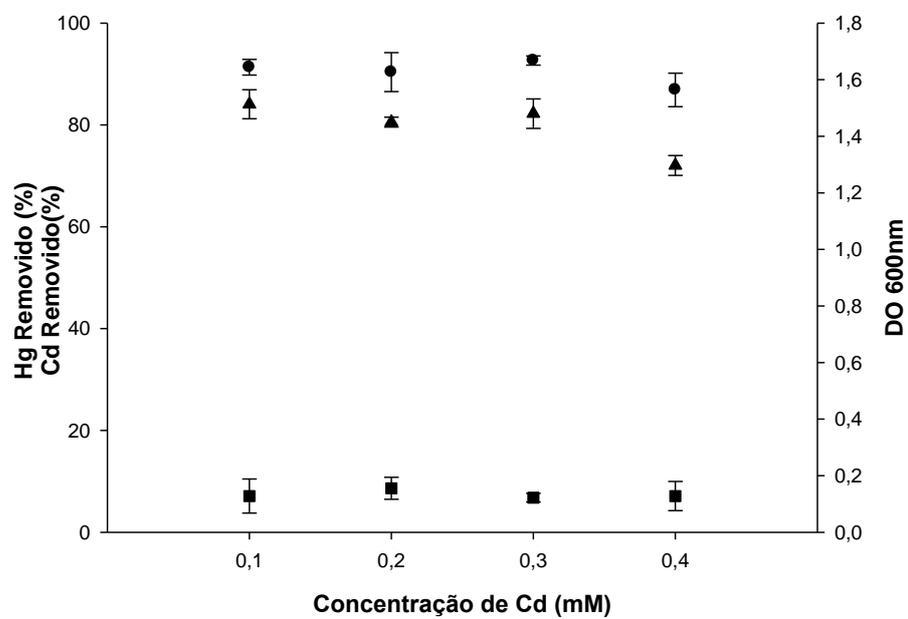
De modo geral, o crescimento bacteriano diminuiu com o aumento das concentrações de cádmio no meio. Queda significativa foi verificada no crescimento do isolado *Brevundimonas* sp. U22, enquanto que para os outros isolados o cádmio promoveu uma resposta negativa menos acentuada (Figuras 2 A, B, C e D).

O isolado *Pseudomonas* sp. B50D removeu aproximadamente 60% do cádmio do meio de cultivo na concentração 0,1 mM e 45% na concentração 0,2 mM. Porém, foi verificada queda significativa da remoção na concentração 0,3 mM e 0,4mM (Figura 1B). Wang et al. 1997 também observaram queda na remoção com o aumento da concentração de cádmio no meio. Isso pode ser

atribuído a saturação da superfície celular disponível para biossorção (Vullo et al., 2008). Os isolados *Pseudomonas putida* C50A, *Alcaligenes faecalis* U21 e *Brevundimonas* sp. U22 foram pouco efetivos, removendo no máximo 20% do Cd (Figuras 1 A, C e D). Desta maneira, esses isolados são pouco indicados para utilização em biorremediação de cádmio.

A) *Pseudomonas putida* C50A



B) *Pseudomonas* sp. B50DB) *Alcaligenes faecalis* U21

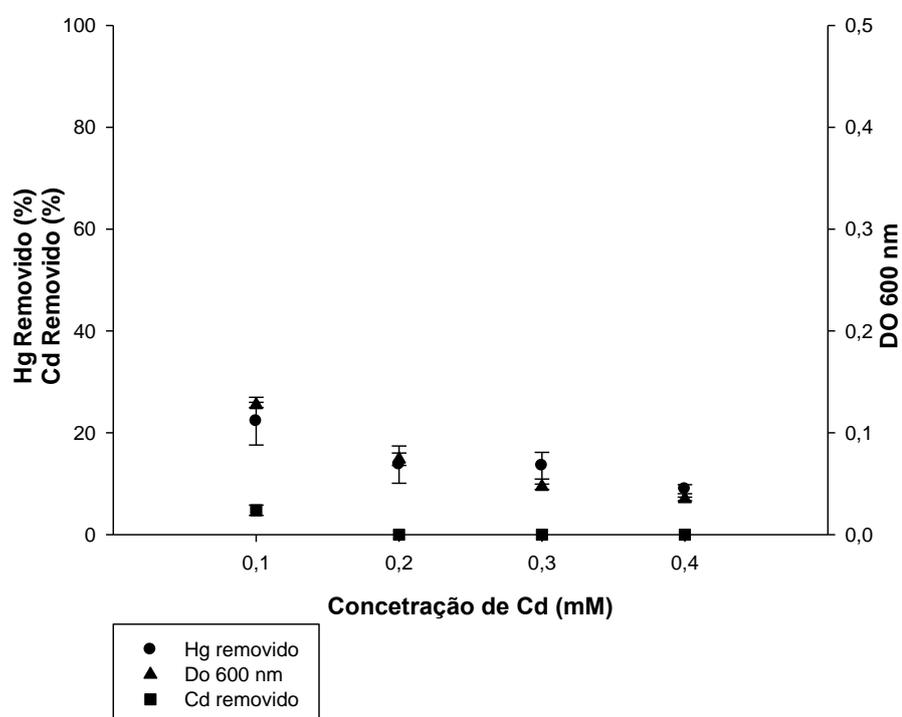
D) *Brevundimonas* sp. 22

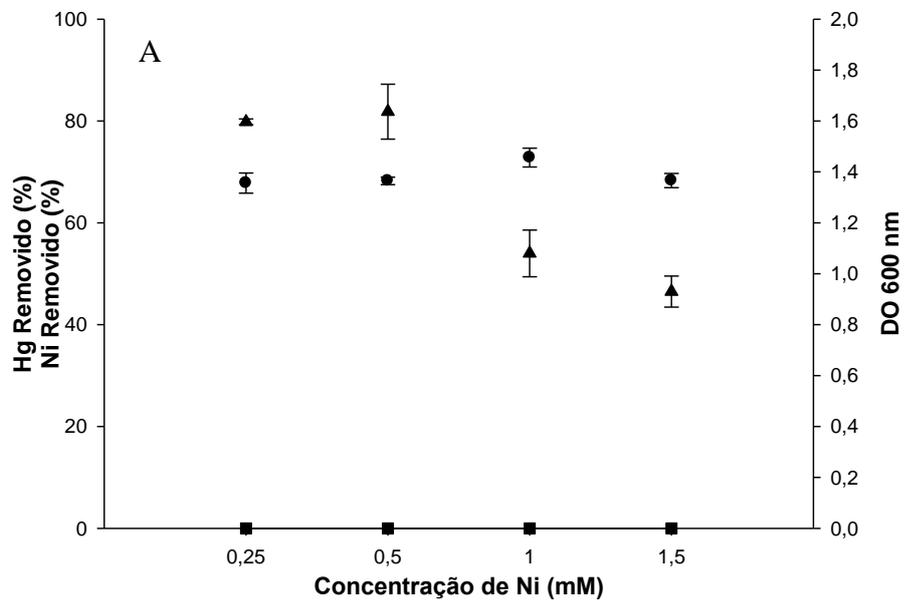
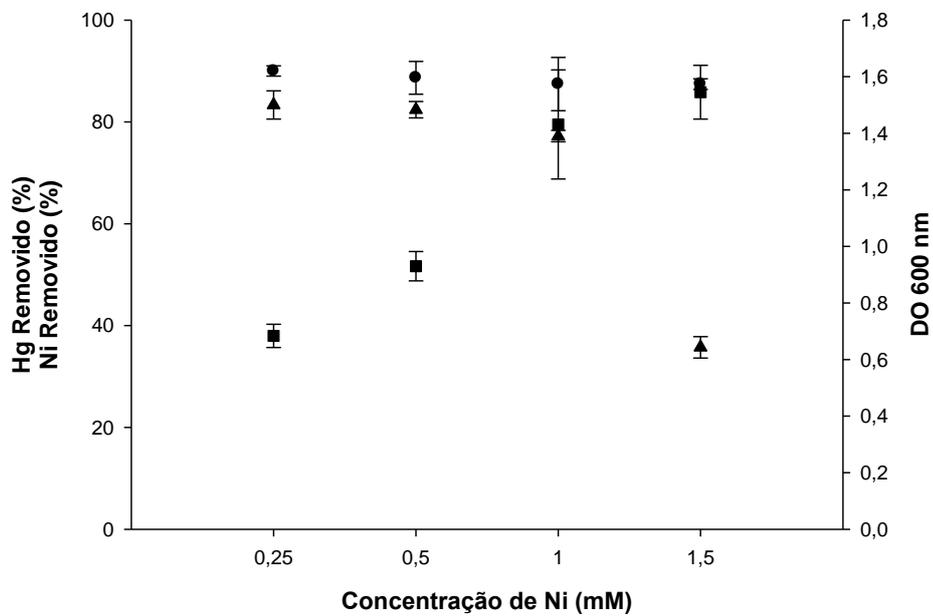
Figura 2. Remoção de mercúrio e cádmio em meio de cultura LB e crescimento bacteriano após 24 horas de incubação dos isolados *Pseudomonas putida* C50A (A), *Pseudomonas* sp. B50D (B), *Alcaligenes faecalis* U21 (C) e *Brevundimonas* sp. 22 (D).

O níquel apresentou efeito negativo na capacidade dos isolados removerem mercúrio, exceto para o isolado *Pseudomonas* sp. B50D que manteve a capacidade de remoção do mercúrio mesmo com as mais altas concentrações de níquel testadas (Figuras 3 A, B, C e D).

Todos os isolados tiveram o crescimento diminuído em função do aumento das doses de níquel no meio de cultivo, sendo que os isolados *Alcaligenes faecalis* U21 e *Brevundimonas* sp. U22 foram os mais sensíveis, perdendo a capacidade de crescimento a partir da concentração de 1 mM.

Os isolados *Pseudomonas putida* C50A e *Brevundimonas* sp. U22 não foram capazes de remover o níquel do meio de cultivo (Figuras 3 A e D), enquanto que o isolado *Alcaligenes faecalis* U21 removeu apenas 10% do

níquel na primeira concentração testada (Figura 3 C). Diferentemente dos três isolados, a bactéria *Pseudomonas* sp. B50D promoveu a remoção de até 90% do níquel em solução (Figura 2 B), sendo que a mesma teve uma resposta positiva conforme a dose de níquel foi aumentada. Isso pode estar relacionado à condição de estresse sofrida pela bactéria com o aumento das concentrações de níquel. Em caso de estresse metálico, alguns micro-organismos podem expressar genes relacionados à produção de metalotioneínas (Morby et al., 1993), biofilmes (Harrison et al., 2007) e sideróforos (Li et al., 1997). Essas estratégias de sobrevivência podem levar a complexação, imobilização, remoção e precipitação dos metais (Gadd, 2001). Asthana et al., (1995) avaliaram células imobilizadas de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* e constataram remoção de 50% de remoção do níquel. Resultado semelhante foi verificado por Wong & Fung (1997) quando estudaram uma cepa de *Enterobacter* sp. e por Cayllaua et al., (2009) quando avaliaram um isolado de *Rhodococcus opacus*.

A) *Pseudomonas putida* C50AB) *Pseudomonas* sp. B50D

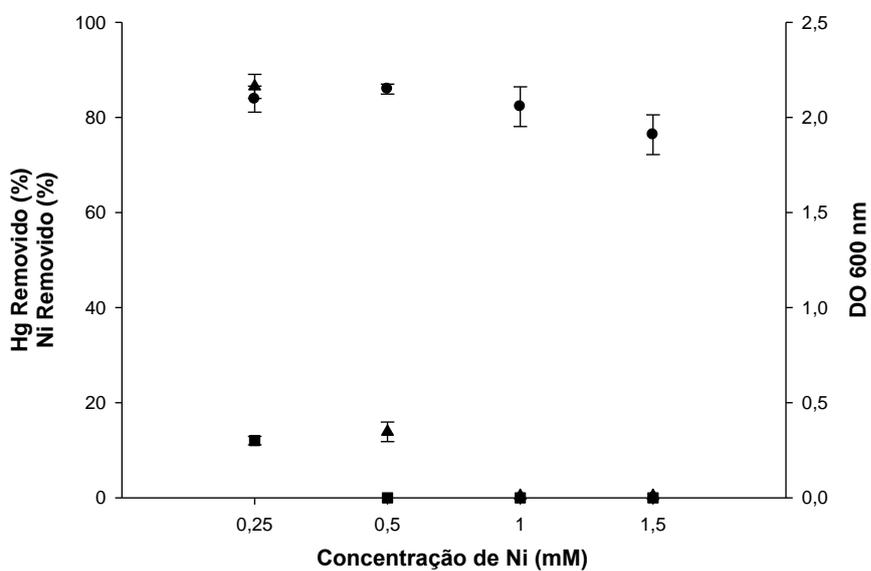
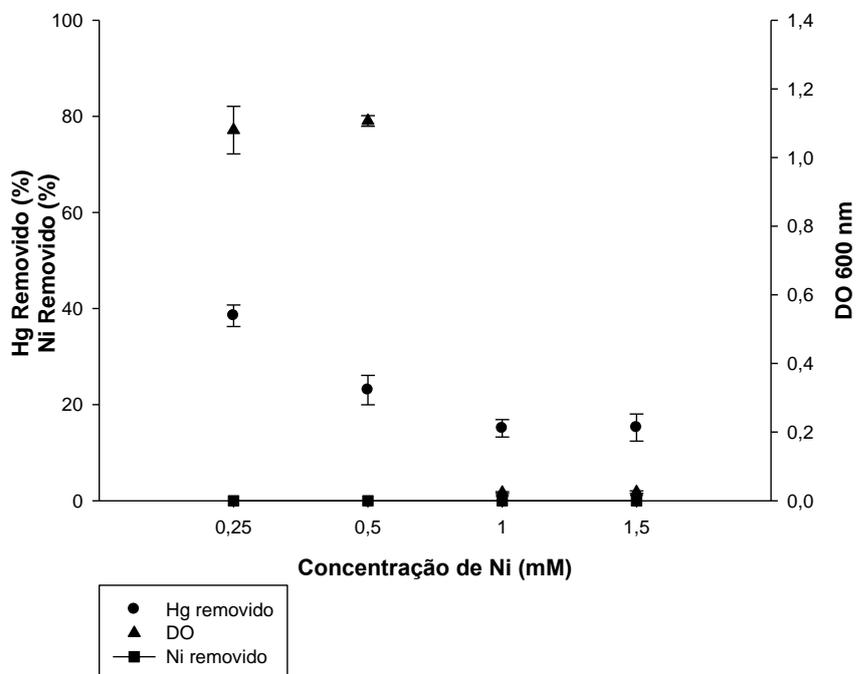
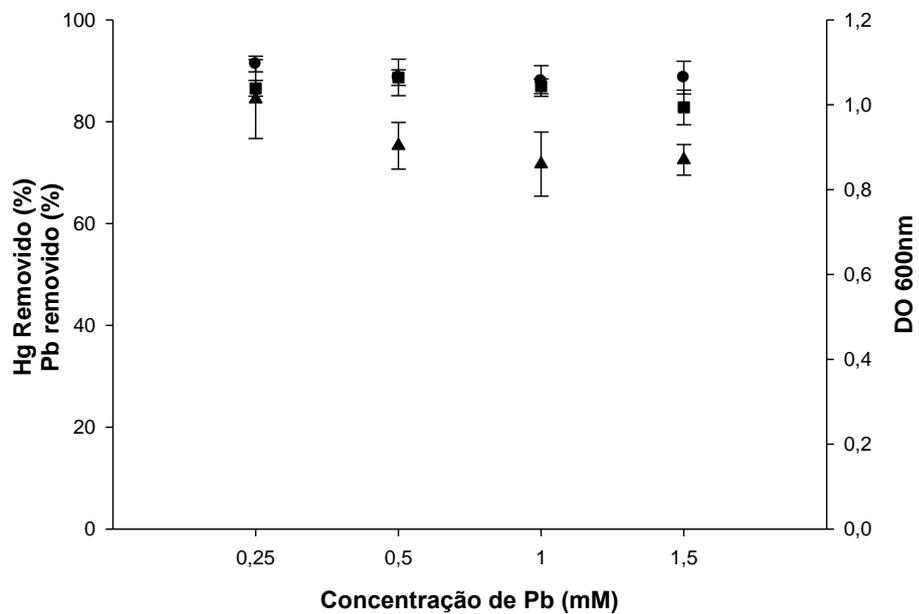
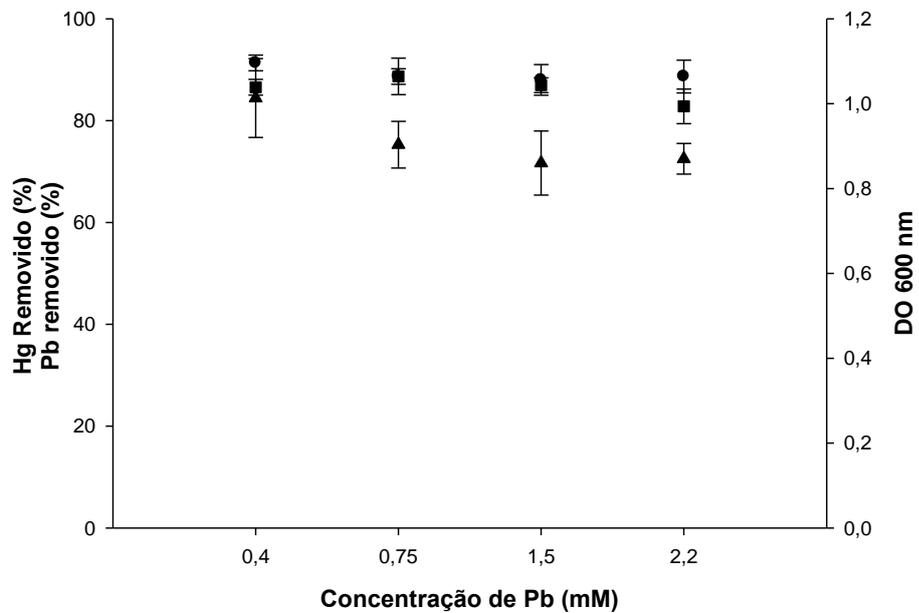
C) *Alcaligenes faecalis* U21D) *Brevundimonas* sp. U22

Figura 3. Remoção de mercúrio e níquel em meio de cultura LB e crescimento bacteriano após 24 h de incubação dos isolados *Pseudomonas putida* C50A (A), *Pseudomonas* sp. B50D (B), *Alcaligenes faecalis* U21 (C) e *Brevundimonas* sp. U22 (D).

Com a adição de chumbo ao meio de cultivo os isolados *Pseudomonas putida* C50A e *Brevundimonas* sp. U22 (Figuras 3 A e D) tiveram suas capacidades de remoção de Hg diminuídas, enquanto que os isolados *Pseudomonas* sp. B50D e *Alcaligenes faecalis* U21 mantiveram a capacidade de remoção (91 e 95%) respectivamente, mesmo nas concentrações mais altas estudadas (Figuras 4 B e C).

O crescimento de todos os isolados foi afetado negativamente pelo Pb sendo que a resposta negativa é ampliada conforme a concentração de chumbo aumenta (Figuras 4 A, B, C e D). O efeito tóxico do chumbo para as células bacterianas está relacionado a mudanças de conformação de ácidos nucleicos e proteínas, perturbação nas funções da membrana celular e na fosforilação oxidativa (Jarosławiecka & Piotrowska-Seget, 2014).

O isolado *Pseudomonas* sp. B50D promoveu a remoção de 85% do chumbo em solução em todas as concentrações testadas (Figura 4 B). Resultado similar de remoção de Pb foi relatado por De et al., (2008) quando avaliaram um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao mercúrio. Embora o isolado *Pseudomonas* sp. B50D tenha apresentado excelente resposta de remoção ao chumbo, os isolados *Pseudomonas putida* C50A, *Alcaligenes faecalis* U21 e *Brevundimoas* sp.U22 não seguiram o mesmo comportamento sendo inábeis na remoção de Pb (Figuras 3 A, C e D).

A) *Pseudomonas putida* C50AB) *Pseudomonas* sp. B50D

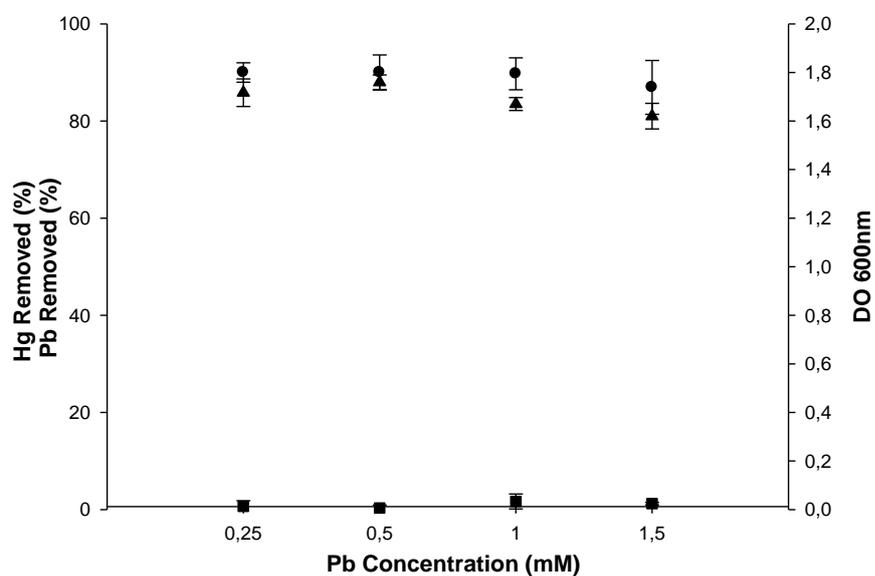
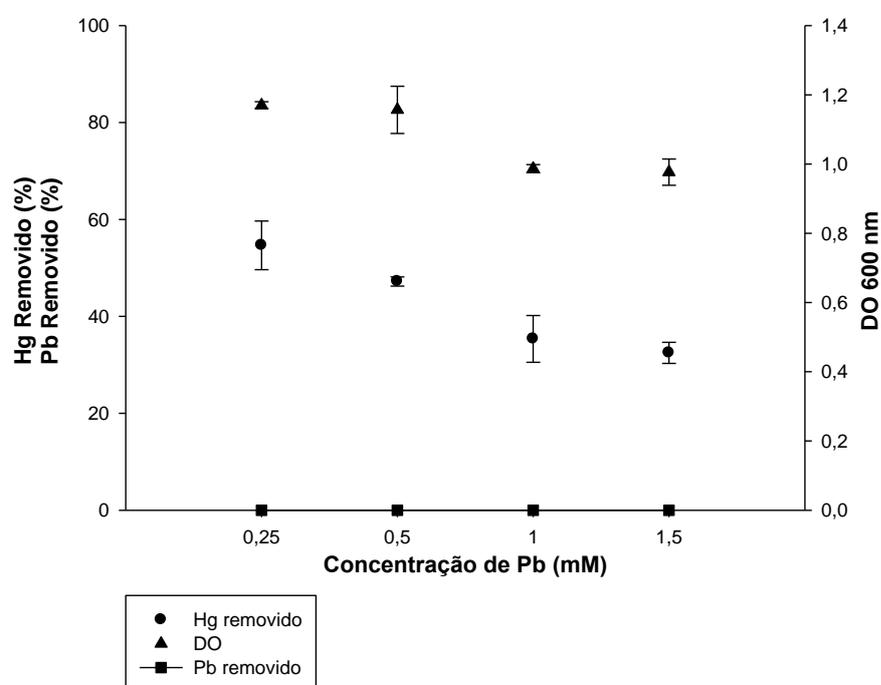
C) *Alcaligenes faecalis* U21D) *Brevundimonas* sp. U22

Figura 4. Remoção de mercúrio e chumbo em meio de cultura LB e crescimento bacteriano após 24 h de incubação dos isolados *Pseudomonas putida* C50A (A), *Pseudomonas* sp. B50D (B), *Alcaligenes faecalis* U21 (C) e *Brevundimonas* sp. U22 (D).

O isolado *Pseudomonas* sp. B50D apresentou alto nível de resistência aos metais avaliados (Tabela 2). A concentração inibitória mínima variou de 0,87 a 18 mM e a concentração biocida mínima variou entre 0,95 e 180 mM. Entre os metais avaliados, o mercúrio foi o mais tóxico apresentando CMI de 0,87 mM e CMB de 0,95 mM. No que se refere à resistência bacteriana aos metais, numerosos estudos têm demonstrado a existência de bactérias multimetal resistentes (Abou-Shanab et al., 2007; Cabral et al., 2012; De et al., 2008; Keramati et al., 2011). Essa constatação está intimamente relacionada ao mecanismo de co-resistência encontrado em bactérias. A co-resistência ocorre quando vários genes de resistência estão inseridos no mesmo segmento genético como os plasmídeos e transposons, levando a um fenótipo bacteriano de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro (Baker-Austin et al., 2006; Sarma et al., 2010).

Tabela 2. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima biocida (CMB) dos metais para o isolado *Pseudomonas* sp. B50D.

Metal	CMI (mM)	CMB (mM)
Cd	3	80
Hg	0,87	0,95
Ni	3	180
Pb	18	30

Para elucidar os mecanismos de resistência aos metais do isolado *Pseudomonas* sp B50D, o local da bioacumulação foi avaliado. Conforme os resultados da tabela 3, podemos verificar que para os três metais avaliados

(Cd, Ni e Pb) o montante maior de acumulação se dá na superfície celular. Chumbo e cádmio foram bioacumulados no interior da célula, mas em baixas concentrações, enquanto que o níquel não foi verificado no interior da célula. Um dos mecanismos que os micro-organismos usam para evitar a toxicidade dos metais é de limitar o seu movimento através do envelope celular (Bruins et al 2000). Paredes celulares de bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa complexa com fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e várias proteínas. Os fosfolípidos da membrana externa possuem grupos fosforilados podendo esses também ser uma região de adsorção nesse tipo de células (Beveridge & Murray, 1980; Graham & Beveridge, 1994). Beveridge (1989) sugere que um componente significativo do metal adsorvido em células de bactérias Gram-negativas é a ligação aos grupos fosforila da membrana externa e estruturas associadas, como os fosfolípidos e os lipopolissacarídeos, enquanto que o peptidoglicano estaria menos associado à adsorção nesse tipo de bactérias. Além disso, muitos micro-organismos sintetizam polímeros extracelulares (EPS) que se ligam a cátions metálicos tóxicos, protegendo os componentes essenciais da célula (Bruins et al., 2000).

Tabela 3. Concentração de metais na superfície celular e no interior da célula de *Pseudomonas* sp. B50D.

Metal	Concentração do metal adicionado ao meio (μM)	Concentração intracelular do metal (μM)	Metal bioadsorvido na superfície celular (μM)
Cd	100	0,927 \pm 0,31	50,63 \pm 1,18
Ni	100	0	21,43 \pm 1,81
Pb	100	4,15 \pm 0,69	78,82 \pm 5,01

Em comparação ao controle, a adição de cádmio, chumbo, mercúrio e níquel teve resposta positiva significativa na produção de biofilmes (Figura 5). Esse resultado corrobora com os obtidos por Dash et al., 2013 quando avaliaram a produção de biofilme de um isolado de *Bacillus thuringiensis* na presença e ausência de mercúrio. Os biofilmes desempenham papel importante na sobrevivência dos micro-organismos na presença de altas concentrações de agentes antimicrobianos, inclusive metais (Sarkar & Chakaborty, 2008). Este tipo de resposta pode ser vista como um processo de diversificação fenotípica dependente da concentração de espécies metálicas (Harrison et al., 2007). No entanto, a resposta molecular dos micro-organismos em biofilme expostos a esse tipo de estresse ainda não foi elucidada (Sarkar e Chakaborty, 2008).

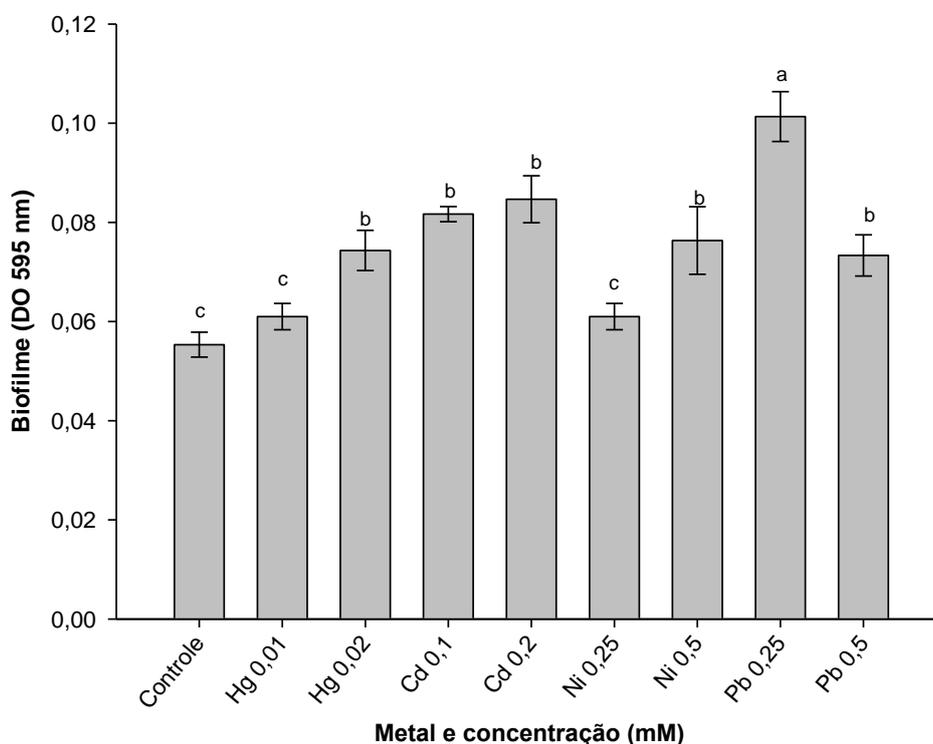


Figura 5. Biofilme formado por *Pseudomonas* sp. B50D na presença dos diferentes metais. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,01$).

O mercúrio, níquel e chumbo promoveram um aumento na produção de sideróforos pelo isolado *Pseudomonas* sp. B50D em relação ao controle (tabela 4). Marcadamente o mercúrio e o níquel geraram um efeito positivo na produção de sideróforos, dependendo do aumento da concentração dos mesmos no meio de cultivo. Já o cádmio, não estimulou a produção de sideróforos em nenhuma das concentrações testadas. Estudos anteriores mostram que os metais como mercúrio, chumbo e níquel podem estimular a produção de sideróforos (Dao et al., 2001; Naik & Dubey, 2011; Braud et al., 2009). Os metais podem estar envolvidos diretamente nas vias de biossíntese ou na regulação dos sideróforos (Hofte et al., 1994), ou interferirem na complexação do ferro com os sideróforos, de maneira a diminuir a

concentração de ferro solúvel no meio, o que leva a maior produção de sideróforos pelo micro-organismo (Dimkpa et al.,

2008). Quantidades maiores de sideróforos no meio podem proteger as bactérias da toxicidade dos metais, já que eles são quelados no meio extracelular e não podem ser difundidos para dentro da célula (Braud et al, 2009).

Tabela 4. Influência dos metais na produção de sideróforos de *Pseudomonas* sp. B50D

Metal	Concentração do Metal (mM)	Unidades de Sideróforos (%)
Controle	0	26,68±1,88
Hg	0,01	38,23±3,46
	0,02	45,87±2,13
	0,05	61,25±3,81
Cd	0,1	28,04±1,99
	0,2	27,78±0,80
	0,3	26,81±1,86
Ni	0,25	33,81±0,8
	0,5	39,33±2,08
	1	55,64±2,37
Pb	0,25	55,64±3,51
	0,5	56,48±3,14
	1	57,59±0,94

Conclusões

O isolado *Pseudomonas* sp. B50D foi o que apresentou melhor desempenho quando avaliada remoção de mercúrio concomitante a outros

metais. Apresenta como mecanismos de resistência aos metais a redução, bioadsorção, produção de biofilme e produção de sideróforos, sendo um candidato com potencial aplicação na biorremediação de efluentes com contaminações metálicas complexas.

Referências Bibliográficas

ABOU-SHANAB, R. A.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J.S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v. 68, p. 360–367, 2007.

ASTHANA, R.K.; CHATTERJEE, S.; SINGH, S.P., Investigations on nickel biosorption and its remobilization. **Process in Biochemistry**, v. 30, p. 729-734, 1995.

BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 355-384, 2003.

BAKER-AUSTIN, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 176–182, 2006.

BARKAY, T.; WAGNERDOBLER, I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, p. 1-52, 2005.

BEVERIDGE, T.J. & MURRAY R.G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 141, n. 2, p. 876-887, 1980.

BEVERIDGE, J.T. Role of design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annual Review of Microbiology**, v. 43, p. 147–171, 1989.

BLACKE et al. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 1365-1376, 1993.

BRAUD, A.; HOEGY, F.; JEZEQUEL, K.; LEBEAU, T.; SCHALK, I.J. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 1079–1091, 2009.

BRAUD, A.; HANNAUER, M.; MILSIN, G. L. A.; SCHALK, I. J. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.:5317–5325, 2009.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 45, p. 198–207, 2000.

CABRAL, L.; GIOVANELLA P.; GIANELLO, C.; BENTO, F. M.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O. Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. **Biodegradation**. V. 24, p. 319-331, 2013.

CAMARGO F. A. O.; BENTO, F. M.; JACQUES, R. J. S. Uso de microrganismos para remediação de metais. In: Ceretta CA, Silva LS, Reichert JM (eds) **Tópicos em Ciência do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Minas Gerais, pp 468–496, 2007.

CAYLLAHUA, J. E. B.; CARVALHO, R. J. E.; TOREM, M. L. Evaluation of equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters for biosorption of nickel(II) ions onto bacteria strain *Rhodococcus opacus*. **Minerals Engineering**, v. 22, n. 15, p. 1318-1325, 2009.

DAO, K. H. T.; HAMER, K. E.; CLARK, C. L.; HARSHMAN, L. G. Pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* exposed to metals or an oxidative stress. **Ecological Applications**, v. 9, p. 441 – 448, 2001.

DASH, H.R.; MANGWANI, N.; DAS S. Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. **Environmental Science Pollution Research**, v. 21, p. 2642-2653, 2014.

DE, J. N.; RAMAIAH, L.; VARDANYAN Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. **Marine Biotechnology**, v. 10, n.4, p.471-477, 2008.

DIMKPA, C.O. et al. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere**, v. 74, p. 19–25. 2008.

EPA 7471B; Mercury in Solid or Semisolid Waste - Manual Cold-Vapor Technique. Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7471b.pdf>>, acesso em Jan. 2009.

FU, F.L.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 407–418. 2011.

GADD, G. M. Microbial metal transformations. **Journal Microbiology**. v. 39, p. 83–88, 2001.

GIOVANELLA, P.; BENTO, F.; CABRAL, L. et al. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova**, v. 34, p. 232–236, 2011.

GRAHAM, L.L.; BEVERIDGE, T.J. Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1413-1421, 1994.

GUPTA, S.; NIRWAN, J. Evaluation of mercury biotransformation by heavy metal-tolerant *Alcaligenes* strain isolated from industrial sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, p. 995-1002, 2014.

HARRISON, J. J.; CERI, H.; TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 5, p. 927-938, 2007.

HOFTE, M. et al. The *sss* gene product, which affects pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, is a site-specific recombinase. **Molecular Microbiology**, v. 14, p. 1011–1020, 1994.

JAROSLAWIECKA, A.; PIOTROWSKA-SEGET Z. Lead resistance in micro-organisms. **Microbiology**, v. 160, p. 12–25, 2014.

KADIRVELU, K., PALANIVEL, M., KALPANA, R., RAJESWARI, S. Activated carbon from agricultural product, for the treatment of dyeing industry wastewater. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 263–265, 2000.

KANNAN, S.K; KRISHNAMOORTHY R. Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury: A case study in Pulicat lake north of Chennai, South East India. **Science of the Total Environment**, v. 367, p.341–353, 2006.

KERAMATI, P.; HOODAJI, M.; TAHMOURESPOUR, A. Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 831–837, 2011.

LI, C., XU, Y., JIANG, W., DONG, X., WANG, D., LIU, B. Effect of NaCl on the heavy metal tolerance and bioaccumulation of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 46–52, 2013.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; WILLIAMS, K.E. Silver resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag^+ and are deficient in porins. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6127– 6132, 1997.

LIEBERT C. A.; WIREMAN, J.; SMITH SUMMERS, A. O. Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora

of primates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1066–1076, 1997.

MEENA, A.K.; MISHRA, G.K.; RAI, P.K.; RAJAGOPAL, C.; NAGAR, P.N. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using carbon aerogel as an adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, p. 161–170, 2005.

MISHRA, A.; MALIK, A. Recent advances in microbial metal bioaccumulation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 1162–1222, 2013.

MORBY, A.P.; TURNER, J.S.; HUCKLE, J.W.; ROBINSON, N.J. SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: Identification of a Zn-inhibited DNA-protein complex. **Nucleic Acid Research**. v. 21, n. 4, p. 921-925, 1993.

NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. **Current Microbiology**, v. 62, p. 409–414. 2011.

NAJA, G. M.; VOLESKY, B. Treatment of metal-bearing effluents: removal and recovery. In: Wang LK, Chen JP, Hung YT, Shammass NK (eds) **Handbook on heavy metals in the environment**. CRC Press, Boca Raton, pp 247–29, 2010.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 730–750, 1999.

OSBORN, A. M.; BRUCE, K.D.; STRIKE, R. D. A. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 239–262, 1997.

RAMAIAH, DE. J.; VARDANYAN, L. N. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 471-477, 2008.

RAY, S. et al. Studies on the mercury volatilizing enzymes in nitrogen-fixing *Beijerinckia mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 184-186, 1993.

SANTOS-GOLDELMAN et al. Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 3, p. 585-590, 2014.

SARKAR, S.; CHAKRABORTY, R. Quorum sensing in metal tolerance of *Acinetobacter junii* BB1A is associated with biofilm production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, p. 160–165, 2008.

SARMA, B.; ACHARYA, C.; JOSHI, S. R. Pseudomonads: A versatile bacterial group exhibiting dual resistance to metals and antibiotics. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2828- 2835, 2010.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**. v. 13, p. 2844–2854, 2011.

SILVER S. 1996 BACTERIAL HEAVY METAL RESISTANCE: New Surprises. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 753-789, 1996.

SONE, Y.; MOCHIZUKI, Y.; KOIZAWA, K.; NAKAMURA, R.; PAN-HOU, H.; ITOH, T.; KIYONO, M. Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68. **AMB Express**, v. 3, p 41, 2013.

TAGA, M.E.; BASSLER, B.L. Chemical communication among bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. v. 100, p. 14549–14554, 2003.

TEEMU, H.; SEPPO, S.; JUSSI, M.; RAIJA, T.; KALLE, L. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 170–175, 2008.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p. 455–482, 2003.

VULLO, D.L.; CERETTI, H. M.; DANIEL, M. A.; RAMIREZ, S. A. M.; ZALTS, A. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5574-5581, 2008.

WAALKES, M.P.; COOGAN, T.P.; BARTER, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 75–201, 1992.

WANG, C.L. et al. Cadmium removal by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4075–4078, 1997.

WONG, P. K.; FUNG, K. Y. Removal and recovery of nickel ion (Ni²⁺) from aqueous solution by magnetite-immobilized cells of *Enterobacter* sp. 4-2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p.116 –121, 1997.

ZHANG, W.; CHEN, L.; LIU, D. Characterization of a marine-isolated mercury resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1305–1314, 2012.

3.3 RESULTADOS III

Remoção de mercúrio de efluente industrial por *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1.

Resumo

Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade das bactérias removerem mercúrio em meios de cultura. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta da remoção do mercúrio pelas bactérias resistentes em efluentes industriais, ou ainda, efluentes co-contaminados com outros metais. Nesse sentido, este estudo teve como objetivos avaliar a resistência dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1 ao mercúrio e a outros metais, analisar a capacidade desses isolados em remover mercúrio na presença de Cd, Ni e Pb, identificar a presença dos genes *merA* e *merB*, estimar a remoção de Cd, Ni e Pb, investigar o efeito da aplicação dos isolados bacterianos e consórcio no tratamento de efluentes contaminados com mercúrio e outros metais. Os dois isolados possuem o gene *merA*, enquanto que o gene *merB* só foi detectado no isolado *Pseudomonas* sp. B50A. Em meio de cultura, os isolados removeram aproximadamente 80% do mercúrio, 60 % do cádmio, porém não removeram chumbo e níquel. A capacidade dos isolados e do consórcio removerem mercúrio do efluente variou de 70 a 75%. Porém, com a adição de múltiplos metais no efluente a remoção do mercúrio foi inibida. Os isolados avaliados neste trabalho são recomendados para tratamento de efluentes contaminados com mercúrio, contudo contaminações mais complexas (com outros metais) exigem a utilização concomitante de outros métodos ou ainda outros micro-organismos não avaliados neste estudo.

Introdução

A contaminação pelo mercúrio afeta os componentes bióticos do ambiente e causa inúmeros problemas a saúde humana (UNEP). O mercúrio é emitido para o ambiente por inúmeras fontes naturais e antropogênicas, por meio de combinações complexas, envolvendo reações químicas, físicas e biológicas (Maxson, 2005; Driscoll et al., 2013).

As fontes antrópicas mais frequentes de mercúrio são as indústrias petroquímicas, eletrônicas, equipamentos de medição, tintas e cloro-soda, além da utilização na extração de ouro e como amálgamas dentárias (Maxson, 2005). Os resíduos gerados por estas indústrias, podem conter um ou mais metais pesados tóxicos, apresentando problemas de co-contaminação (Kadirvelu, 1998). Entre os metais, o cádmio, mercúrio, chumbo e níquel são extremamente tóxicos em baixas concentrações (Waalkes et al., 1992; Fu, 2011), deste modo, eles merecem particular atenção no que se refere ao tratamento adequado de efluentes e resíduos contaminados pelos mesmos antes de serem liberados ao ambiente.

A remediação de ambientes contaminados com cátions metálicos tóxicos tem empregado convencionalmente, técnicas físico-químicas que incluem precipitação, filtração e recuperação eletroquímica. Assim como, separação por membrana, escavação, depósito de resíduos em aterros sanitários ou ainda recobrimento do sítio contaminado. Essas técnicas são pouco eficazes, tem custo elevado e geralmente produzem resíduos adicionais com maior potencial de contaminação (Camargo et al., 2007; Naja & Volesky, 2010).

Nos últimos anos, têm se dado maior atenção aos métodos biológicos de remediação de metais pesados, devido ao baixo custo de operação, alta eficiência de remoção, bom desempenho em baixas concentrações de metais (Teemu et al., 2008) e por serem alternativas ecologicamente corretas (Mishra & Malik, 2013). Nesse contexto, as bactérias são candidatas promissoras por apresentarem sistemas especializados de resistência aos metais (Nies, 1999). Apesar de o mercúrio ser tóxico, tanto para células eucarióticas quanto para procarióticas, alguns micro-organismos possuem mecanismos de resistência a esse metal. Entre eles podem-se destacar bombas de efluxo, quelação por polímeros enzimáticos, precipitação, biometilação e redução enzimática (Boening, 2000); relacionado ao operon *mer*. Bactérias que possuem operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o Hg (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg (0) (Nies, 1999; Barkay et al., 2003; Barkay & Wagner-Döbler, 2005).

Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade das bactérias removerem mercúrio em meios de cultura. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta da remoção do mercúrio pelas bactérias resistentes em efluentes industriais, ou ainda, efluentes co-contaminados com outros metais. Nesse sentido, este estudo teve como objetivos avaliar a resistência dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1 ao mercúrio e a outros metais, identificar a presença dos genes *merA* e *merB*, analisar a capacidade desses isolados em remover mercúrio na presença de Cd, Ni e Pb, estimar a remoção de Cd, Ni e Pb, investigar o efeito da aplicação dos isolados bacterianos e consórcio no tratamento de efluentes contaminados com

mercúrio e outros metais, analisar o comportamento dos isolados e da comunidade microbiana do efluente durante a remoção do mercúrio.

Material e métodos

Micro-organismos

As bactérias *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1 foram isoladas e identificadas em trabalhos anteriores a partir de resíduos contaminados com metais (artigo submetido para publicação).

Caracterização do Efluente

O efluente industrial utilizado neste estudo foi obtido na empresa gerenciadora de resíduos industriais UTRESA de Estância Velha – RS. Esse efluente é originado a partir da decomposição dos resíduos sólidos contidos em células do aterro, e sofreu tratamento primário e secundário antes de ser contido nas lagoas de estabilização de onde foi coletado. Os parâmetros químicos do efluente foram determinados com metodologia reconhecida pela Rede Metrológica/RS, conforme NBR ISSO/IEC 17025:2005 (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do efluente

Parâmetro/unidade	Efluente
Al (mg L ⁻¹)	0,1
As (mg L ⁻¹)	n.d.
B (mg L ⁻¹)	0,9
Cd(mg L ⁻¹)	n.d.
Pb (mg L ⁻¹)	n.d.
Cl (mg L ⁻¹)	1125
Cu (mg L ⁻¹)	n.d.
Cr (mg L ⁻¹)	0,365
Mg Total (mg L ⁻¹)	0,8
Hg (mg L ⁻¹)	n.d.
Ni (mg L ⁻¹)	0,02
Ca (mg.L ⁻¹)	30
Na (mg.L ⁻¹)	495
P (mg.L ⁻¹)	2,8
N amoniacal (mg.L ⁻¹)	182
N Total Kjeldahl (mg.L ⁻¹)	217
Zn (mg.L ⁻¹)	0,008
pH	7,2
DBO ₅ (mg.L ⁻¹)	100
DQO	280
Condutividade elétrica ($\mu\text{s.cm}^{-1}$)	4440

n.d. = não detectado.

Preparo de células para os ensaios

Para os ensaios em meio de cultura cada isolado foi inoculado em meio de cultura LB (Tryptona bacteriológica 10 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹) contendo HgCl₂ (10 μ M) incubado por 24 h a 30 \pm 2 ° C sob agitação de 130 rpm. Os inóculos foram padronizados em 10⁷ UFC mL⁻¹ iniciais pela turbimetria, analisando a densidade óptica a 600 nm e a correspondente quantidade de UFC mL⁻¹ em placas. Frascos com meio de cultura não inoculado serviram como controle negativo.

Para os ensaios em efluente cada isolado foi inoculado em meio de cultura LB (Tryptona bacteriológica 10 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹) contendo HgCl₂ (10 μ M) incubado por 24 h a 30 \pm 2 ° C sob agitação de

130 rpm. Após o período de incubação os cultivos foram centrifugados por 5 min a 10000 RPM sendo o sobrenadante descartado. Em seguida as células foram ressuspensas em uma solução de NaCl 0,9%, centrifugadas por 5 min a 10000 rpm. Esse procedimento foi repetido 3 vezes com a finalidade de remover todo o meio de cultivo LB. Os inóculos foram padronizados em 2×10^7 UFC mL⁻¹ iniciais pela turbimetria, analisando a densidade óptica a 600 nm e a correspondente quantidade de UFC mL⁻¹ em placas. Frascos com meio de cultura não inoculado serviram como controle negativo.

Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória foi determinada pela utilização de meio de cultura LB contendo HgCl₂, NiCl₂, CdCl₂ e Pb (NO₃)₂ em diferentes concentrações. Os isolados bacterianos foram incubados por 48 horas a 30 ± 2 °C sob agitação de 100 rpm e o crescimento avaliado visualmente pela turvação do meio de cultura. A menor concentração de metal capaz de inibir o crescimento microbiano foi considerada a concentração mínima inibitória (CMI). Como controle negativo foi utilizado meio de cultura LB não inoculado e como controle positivo meio de cultura LB sem metal.

Concentração Mínima Biocida (CMB)

Os isolados foram testados quanto a concentração mínima biocida de HgCl₂, NiCl₂, CdCl₂ e Pb (NO₃)₂ em placas de poliestireno de 96 poços em meio LB contendo diferentes concentrações dos metais avaliados. O meio de cultura inoculado foi incubado por 48 horas a 30±2°C sob agitação de 100

RPM. Após 48 h de incubação, 25 µL da cultura foi inoculada em placas de Petri contendo meio Agar nutriente. A concentração biocida foi verificada após o período de 72 h de incubação a 30±2°C, pela presença ou ausência de crescimento microbiano nas placas. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura LB não inoculado e como controle positivo meio de cultura LB sem metal.

Análise dos genes *merA* e *merB* por PCR

Para a extração de DNA, colônias isoladas foram incubadas em meio de cultura Luria Bertani por 24 horas a 30°C, para posteriormente passarem pelo processo de extração de DNA. O DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. Para verificar se a extração de DNA foi eficiente, 20 µL do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

As reações das PCRs continham: 5 µL de 10x tampão de PCR, 1,5 µL de 25 mM MgCl₂, 1 µL de 10 mM dNTPs, 0,02 U de Taq DNA polymerase (Denville, NJ), 0,5 µL de 20 pmol µL⁻¹ de cada primer (forward e reverse), 16,75 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA. Para a detecção dos genes *merA* foram utilizados os primers A1 F (ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT) e A5 R (ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC) (Liebert et al. 1997) (1238 pb). O programa básico de amplificação constou de 1 ciclo a 95 °C por 5 min, seguido de 29 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 2 min, e 90 °C por 3 min, 1 ciclo final de 5 min a 72 °C. Para a detecção dos genes *merB* foram utilizados os primers IA34F (TTGGATCCATGAAGCTCGCCCCAT) e IA35R

(TTGGTACCCTAGATGACATGACAT) (Santos-Goldelman et al. 2014) (640 pb). O programa de amplificação constou de 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 °C, 1 min a 72 °C, 1 ciclo final de 10 min a 70 °C. Como controle negativo foi utilizado a reação de PCR sem adição de DNA.

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas em iluminação ultravioleta.

Remoção de mercúrio, cádmio, chumbo e níquel em meio de cultura LB

Aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹ dos isolados foram inoculados em meio LB contendo cádmio, chumbo, mercúrio ou níquel. As concentrações testadas foram: CdCl₂ (0,1mM), HgCl₂ (10µM), NiCl₂ (0,25) e Pb (NO₃)₂ (0,25 mM). Após a incubação de 24 h, amostras foram retiradas para determinação de pH, biomassa (DO 600 nm), mercúrio, cádmio, níquel e chumbo remanescentes.

A remoção de Cd, Ni e Pb foi avaliada utilizando a metodologia de Li et al. 2013 com modificações. Dois mL do meio de cultivo foram centrifugados por 3 min a 5000 RPM e sobrenadante digerido com ácido nítrico (20%) e perclórico (10%). A concentração do metal remanescente na solução diluída foi mensurada por espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer optima 7000 DV).

A determinação de mercúrio remanescente nas amostras foi realizada conforme metodologia EPA 7471B, utilizando o método de espectrofotometria de absorção atômica/geração de vapor frio. O equipamento

utilizado para este experimento foi da marca Perkin Elmer (Analyst 100). Inicialmente, foi retirado 100 μL da amostra homogeneizada do cultivo bacteriano. Essa amostra foi tratada com 5 mL de H_2SO_4 (98%), 2 mL de HNO_3 (65%) e 10 mL de uma solução de KMnO_4 (70 g L^{-1}). Após esse procedimento, a mistura foi submetida à temperatura de 121°C e 1,5 ATM por 15 min. Em seguida, adicionou-se 50 mL de água deionizada e 6 mL de CINH_2OH_2 (100 g L^{-1}). Então o mercúrio foi convertido a forma de Hg^0 pelo tratamento com uma solução de SnCl_2 (50 g L^{-1}). O mercúrio elementar formado foi analisado em espectrofotômetro de absorção atômica, com a medida da absorvância 253,7 nm.

Em todos os tratamentos foi utilizado como controle negativo meio de cultura LB não inoculado e adicionado os metais e como controle positivo meio de cultura LB inoculado sem a adição dos metais.

Remoção de mercúrio na presença de outros metais

Os ensaios foram realizados em meio de cultura LB contendo HgCl_2 na concentração de $10 \mu\text{M}$ e adição de outro metal ao meio de cultura em diferentes concentração. As concentrações testadas foram: CdCl_2 (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mM), NiCl_2 (0,25; 0,5; 1 e 1,5) e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0,25; 0,5; 1; 1,5 mM). Após a incubação de 24 h, amostras foram retiradas para determinação da biomassa (DO 600 nm) e mercúrio remanescente. A determinação analítica do mercúrio e o cálculo da concentração remanescente foram feitos conforme descrito para o ensaio anterior.

Remoção de mercúrio em efluente e análise da variação da comunidade bacteriana pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os testes de remoção de mercúrio em efluente foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de efluente. O efluente foi contaminado artificialmente com 10 μM de HgCl_2 e os inóculos foram preparados conforme descrito no item preparo de células para os ensaios.

Primeiramente foi feito um ensaio preliminar para verificar a remoção do Hg em função do pH do efluente. Nesse ensaio, o pH do efluente foi ajustado para 6, 7, 8 e 9 com a adição de HCl ou NaOH. O efluente inoculado foi incubado por 48 h a 30 °C sob agitação de 130 rpm. Após o período de incubação amostras foram retiradas, digeridas e o mercúrio remanescente mensurado conforme descrito nos itens anteriores.

Posteriormente, o ensaio para avaliar a remoção de Hg ao longo do tempo de incubação com adição dos isolados e consórcio foi estudado. Nessa etapa, o pH do efluente foi ajustado para 6, o efluente foi inoculado e incubado a 30 °C sob agitação de 130 rpm por 15 dias. Análises de mercúrio remanescente e crescimento celular (UFC mL^{-1}) foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h e 15 dias.

Em todos os tratamentos foi utilizado como controle negativo o efluente contendo o mercúrio, porém não inoculado com os isolados bacterianos.

A análise da comunidade bacteriana ao longo da remoção do mercúrio no efluente foi efetuada utilizando a técnica de eletroforese em gel

com gradiente desnaturante (DGGE). Para isso, 700 µL do efluente foram removidos nos tempos 0, 24 e 72 h e 15 dias e feita a extração de DNA. Para a extração de DNA foi utilizado o kit PowerSoil DNA Isolation (MO BIO Inc., Laboratories, USA), e o processo de extração realizado de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação dos genes da região 16S rRNA por PCR foi realizada utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores universais pA8f-GC (59-CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GCG-GGC-GGGCG-GGG-GCA-GGG-GAG-AGT-TTG-ATC-CTGGCT-CAG-39) e KPRUN518r (59-ATTACCGCGGCTG CTGG-39) (Maila et al., 2006). A amplificação dos genes foi realizada em solução tampão contendo 1 U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 µL de DNA em um volume final de 25 µl. As condições da amplificação da PCR foram 3 min a 95 °C, seguida por 33 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C, e extensão final de 7 min a 72 °C. Os amplicons obtidos foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante como descrito por Muyzer et al. (1993). Os géis foram de 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1 m:m), e apresentou um gradiente desnaturante de 25% a 55% de formamida e uréia. O DGGE foi realizado a 200V, durante 3 horas e 30 minutos no DCode TM System (Bio-RadInc., Hercules, USA) em tampão de corrida 1X TAE. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A aquisição das imagens foi feita por fotodocumentador. Os perfis de bandas gerados por DGGE foram comparados utilizando-se o software Gel Pro-Analyzer 3.1 seguida

pela análise visual dos perfis gerados. O índice de diversidade de espécies de Shannon-Wiener foi obtido de acordo com Rodrigues (2014).

Remoção de mercúrio, cádmio, chumbo e níquel em efluente

Os testes de remoção de Hg e outros metais em efluente foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de efluente, pH 6. O efluente foi contaminado artificialmente concomitantemente com 10 μM de HgCl_2 , NiCl_2 0,25 mM, CdCl_2 0,1 mM e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,25 mM. O efluente foi inoculado com um consórcio bacteriano de *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1 e a concentração inicial de células foi de 2×10^7 UFC mL^{-1} , sendo 1×10^7 UFC mL^{-1} para cada isolado. O efluente inoculado foi incubado a 30 °C por 15 dias e análises de mercúrio, cádmio, níquel e chumbo remanescente e crescimento celular (UFC mL^{-1}) foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h e 15 dias.

Em todos os tratamentos foi utilizado como controle negativo o efluente contendo os metais, porém não inoculado com os isolados bacterianos e a taxa de remoção calculada conforme fórmula descrita anteriormente.

Resultados e Discussão

Como pode ser observado na Tabela 2, ambos os isolados apresentaram alta resistência aos metais avaliados. A concentração mínima inibitória variou de 0,92 mM para o mercúrio a 18 mM para o chumbo. Já a concentração mínima biocida variou de 0,99 mM para o mercúrio e mais de 300 mM para o níquel. Bactérias do gênero *Pseudomonas* geralmente apresentam

alta resistência a diversos metais. Malik & Aleen, 2011 avaliaram 144 bactérias deste gênero e observaram alto índice de resistência aos diferentes metais avaliados. Assim como neste estudo, Zhang et al., 2012; Kang et al., 2014 ao estudarem a resistência aos metais de isolados de *Pseudomonas* também verificaram que o mercúrio foi o mais tóxico, sendo o que apresenta as menores concentrações inibitórias.

No que se refere à resistência bacteriana aos metais, numerosos estudos têm demonstrado a existência de bactérias multimetal resistentes (Abou-Shanab et al., 2007; De et al., 2008; Keramati et al., 2011). Esta constatação está intimamente relacionada ao mecanismo de co-resistência encontrado em bactérias. A co-resistência ocorre quando vários genes de resistência estão inseridos no mesmo segmento genético como os plasmídeos e transposons, levando a um fenótipo bacteriano de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro (Baker-Austin et al., 2006, Sarma et al., 2010).

Tanto *Pseudomonas* sp. B50A quanto *Pseudomonas putida* V1 tiveram os genes da enzima mercúrio redutase amplificados (Tabela 2). No entanto, para os genes da enzima mercúrio liase (*merB*) apenas a *Pseudomonas* sp B50A foi positiva. Cabral et al., 2013 avaliaram a resistência de *P. putida* V1 à forma orgânica de mercúrio e constataram resistência desse isolado a forma metilada de Hg. Embora esse isolado tenha sido caracterizado como removedor de metil mercúrio e resistente, os genes referentes à enzima mercúrio liase não foram detectados pelos autores, assim como no presente estudo que utilizou outros oligonucleotídeos iniciadores. O sistema *mer* é o

modo mais comum de resistência bacteriana ao mercúrio (Osborn et al., 1997; Barkay et al., 2003), porém outros mecanismos podem estar envolvidos que não foram avaliados neste estudo.

Tabela 2. Valores da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima biocida (CMB) dos metais e presença (+) e ausência (-) dos genes *merA* e *merB* nos isolados avaliados.

Isolado	CMI (mM)				CMB (mM)				Genes <i>mer</i>	
	Cd	Hg	Ni	Pb	Cd	Hg	Ni	Pb	A	B
<i>Pseudomonas</i> sp. B50A	2	0,92	7	18	11	0,99	>300	50	+	+
<i>Pseudomonas putida</i> V1	3	0,92	5	18	30	0,99	230	50	+	-

Após 24 h de incubação em meio de cultura ambos os isolados removeram aproximadamente 80% do mercúrio adicionado ao meio de cultivo. A remoção de mercúrio por cepas resistentes também foi constatada por outros autores (Giovanella et al. 2010, Zhang et al. 2012; Cabral et al. 2013 e Sone et al. 2013) que avaliaram bactérias do gênero *Pseudomonas*. Em geral, muitos isolados resistentes ao mercúrio possuem os genes do operon *mer* que codificam proteínas com função reguladora, de transporte, ligação extracelular e a mercúrio redutase (Silver & Hobman, 2007). Bactérias que possuem operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o Hg (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg (0), o que leva a uma remoção efetiva do mercúrio presente no meio (Barkay et al., 2003; Barkay & Wagner-Döbler, 2005).

A resposta da remoção do cádmio foi positiva para ambos os isolados (~ 60%), enquanto que a remoção de níquel e chumbo foi pouco

efetiva, ficando entre 1,7 e 6,5%. Possivelmente o cádmio foi bioissorvido pelas células durante o crescimento bacteriano. Beveridge (1989) sugere que um componente significativo do metal adsorvido em células de bactérias Gram-negativas é a ligação aos grupos fosforila da membrana externa e estruturas associadas, como os fosfolipídeos e os lipolissacarídeos, enquanto que o peptidoglicano estaria menos associado à adsorção nesse tipo de bactérias. Além disso, muitos micro-organismos sintetizam polímeros extracelulares (EPS) que se ligam a cátions metálicos tóxicos, protegendo os componentes essenciais da célula (Bruins et al., 2000). Além disso, em caso de estresse metálico, alguns micro-organismos podem expressar genes relacionados à produção de metalotioneínas (Morby et al., 1993), biofilmes (Harrison et al., 2007) e sideróforos (Li et al., 1997). Essas estratégias de sobrevivência podem levar a complexação, imobilização, remoção e precipitação dos metais (Gadd, 2001).

Tabela 3. Remoção de metais em meio de cultura LB após 24 h de incubação a 30 °C.

Metal	Metal Removido (%)	
	<i>Pseudomonas</i> sp. B50A	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> V1
Cd	64,00±2,66	60,88±2,77
Hg	82,24±2,15	83,67±1,25
Ni	1,72±0,24	6,50±0
Pb	5,96±1,51	5,58±0,27

O cádmio afetou significativamente de forma negativa a capacidade dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *P. putida* V1 removerem Hg do meio de cultivo e o crescimento celular (Figura 1). Embora o cádmio tenha interferido na remoção do Hg, o máximo efeito negativo foi de 10% nas maiores doses testadas, o que significa um resultado promissor do ponto de vista prático. A queda das taxas de remoção do Hg com o aumento das concentrações de cádmio pode estar relacionada a redução da biomassa ou queda da atividade da enzima mercúrio redutase. É possível que tenha ocorrido a ligação dos íons de cádmio com um grupo funcional essencial da mercúrio redutase, resultando numa mudança conformacional ou apenas ocupando o sítio ativo da enzima. No estudo de Ray et al., (1993) o cádmio inibiu 100% da atividade da enzima mercúrio redutase no extrato bruto de *Beijerinckia mobilis* na concentração de 10 μ M. Por outro lado, Gachuy (1997), não constatou queda de atividade enzimática na redutase estudada após a adição de cádmio, ao contrário do cálcio e cobre que inibiram parcialmente a enzima estudada.

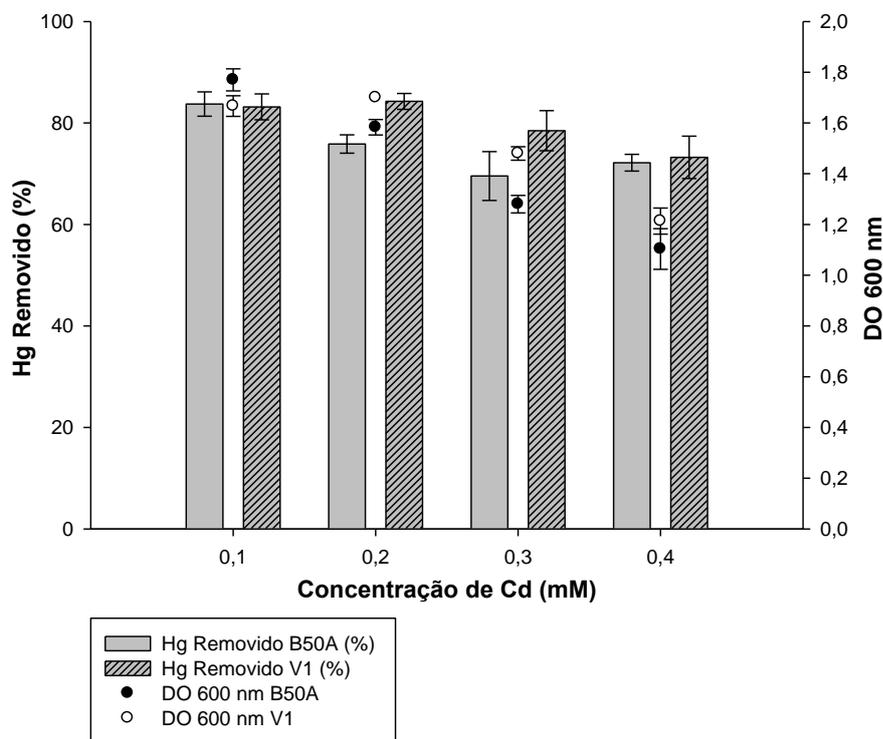


Figura 1. Remoção de Hg e crescimento bacteriano após 24 horas de incubação em meio LB suplementado com CdCl_2 por *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1.

Para o isolado *Pseudomonas* sp. B50A o níquel promoveu diminuição significativa na capacidade de remoção do Hg em 8%, e proporcionou um aumento pouco acentuado no crescimento celular (Figura 2). Já para o isolado *P. putida* V1 o efeito foi positivo na segunda concentração testada (0,50 mM) tanto para a remoção de Hg quanto para o crescimento celular (Figura 2). Para as concentrações acima de 0,5 mM houve uma discreta diminuição na remoção de Hg e diminuição significativa no crescimento celular. Em baixas concentrações o níquel é requerido como cofator para várias enzimas bacterianas, entre elas, ureases, desidrogenases, COA desidrogenase, metil coenzima M redutase e superóxido dismutase (Walsh &

Orme-Johnson, 1987; Mulrooney & Hausinger, 2003), o que pode explicar o aumento do crescimento dos isolados em algumas concentrações testadas. No entanto, em altas concentrações o níquel é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio, deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas e geração de radicais livres (Das, 2009), podendo deste modo interferir no crescimento e permanência de células viáveis.

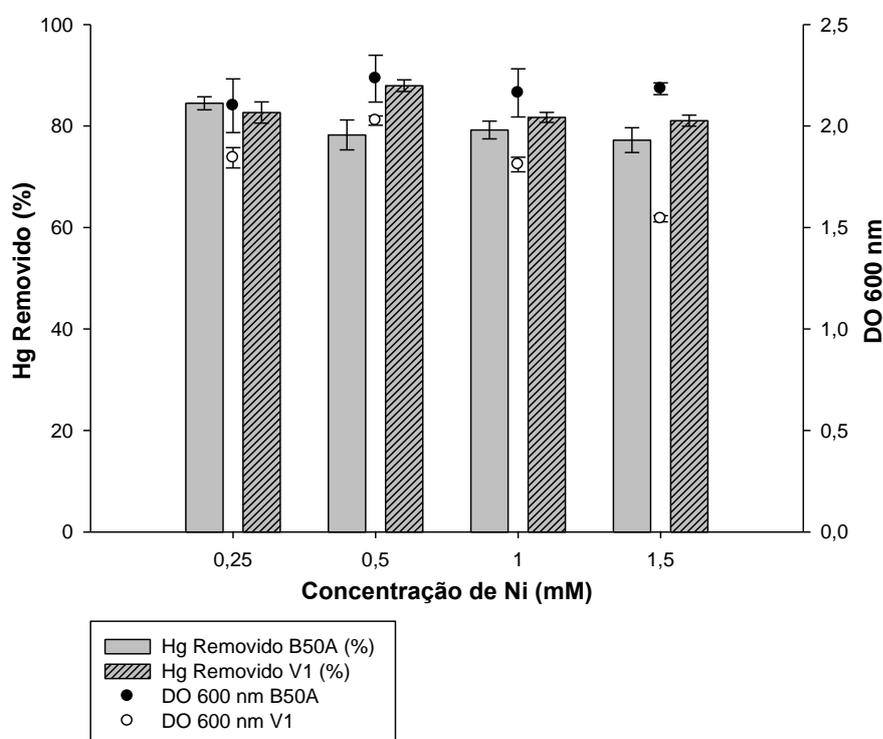


Figura 2. Remoção de Hg e crescimento bacteriano após 24 horas de incubação em meio LB suplementado com NiCl_2 por *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1.

O aumento da concentração de chumbo não comprometeu a capacidade dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *P. putida* V1 removerem Hg do meio de cultivo (Figura 3). Já o crescimento teve uma queda significativa a

partir da primeira concentração testada para *Pseudomonas* sp. B50A, enquanto que o crescimento de *P. putida* V1 não foi influenciado. O efeito tóxico do chumbo para as células bacterianas está relacionado a mudanças de conformação de ácidos nucleicos e proteínas, perturbação nas funções da membrana celular e na fosforilação oxidativa (Jarosławiecka & Piotrowska-Seget, 2014), que podem explicar o decréscimo da biomassa no caso de *Pseudomonas* sp. B50A. Quanto ao isolado *P. putida* V1, pode-se supor que o mesmo possua um sistema de remoção de Pb baseado em bombas de efluxo que é o modo mais comum de resistência ao chumbo (Nies, 1999) e assim não ser afetado pelas doses crescentes de Pb no meio de cultivo.

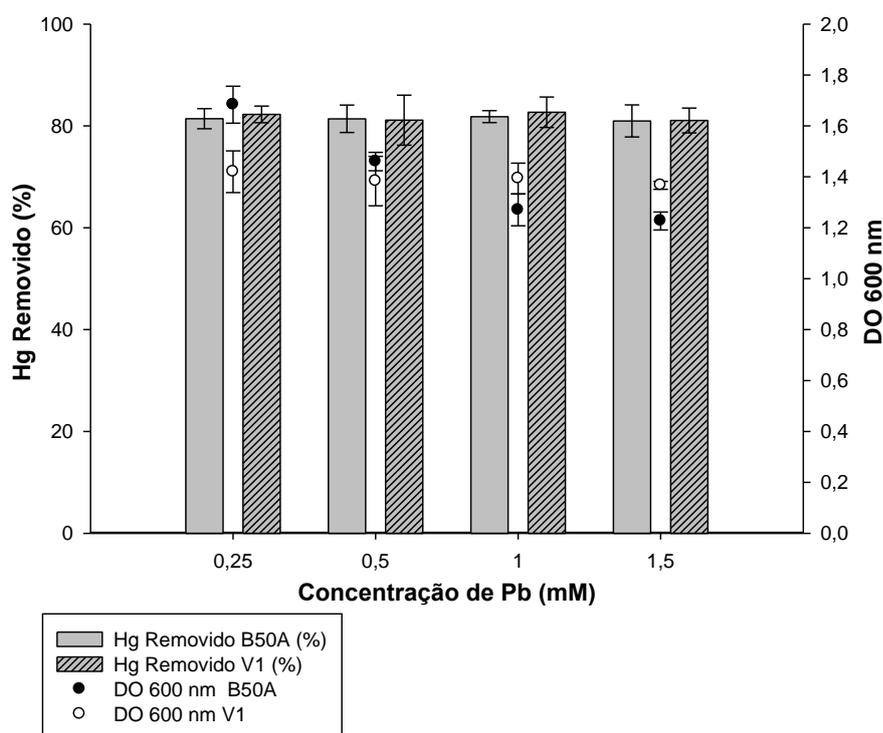


Figura 3. Remoção de Hg e densidade óptica após 24 horas de incubação em meio LB suplementado com $Pb(NO_3)_2$ por *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1.

De modo geral, o aumento do pH do efluente proporcionou uma resposta negativa na remoção de Hg pelos isolados (Tabela 3). A resposta negativa do aumento do pH foi mais acentuada para o isolado *Pseudomonas* sp. B50A que para o isolado *Pseudomonas putida* V1, sendo que para ambos os isolados a remoção foi inibida aproximadamente 100% em pH 9. Tanto *Pseudomonas* sp. B50A quanto *P. putida* V1 apresentaram queda na remoção de mercúrio quando o pH foi aumentado de 6 para 7, indicando que esse decréscimo na remoção não está relacionado ao estresse fisiológico. Esses resultados sugerem que para os pHs mais baixos avaliados, os efeitos do pH estejam mais relacionados a especiação química do mercúrio, já que as mesmas variam de acordo com o pH (Morel et al., 1998) o que torna o mercúrio mais ou menos disponível para os micro-organismos. Kelly et al., 2003 demonstraram que pequenas variações no pH podem influenciar na biodisponibilidade do mercúrio para as bactérias, de modo que em pHs mais ácidos ocorre maior captação de mercúrio para o interior da célula bacteriana. Nos pHs mais extremos avaliados (8 e 9) é presumível que além da influência da baixa biodisponibilidade do mercúrio ocorra também um estresse fisiológico.

Tabela 3. Capacidade de remoção de Hg pelos isolados em efluente industrial em função da variação do pH.

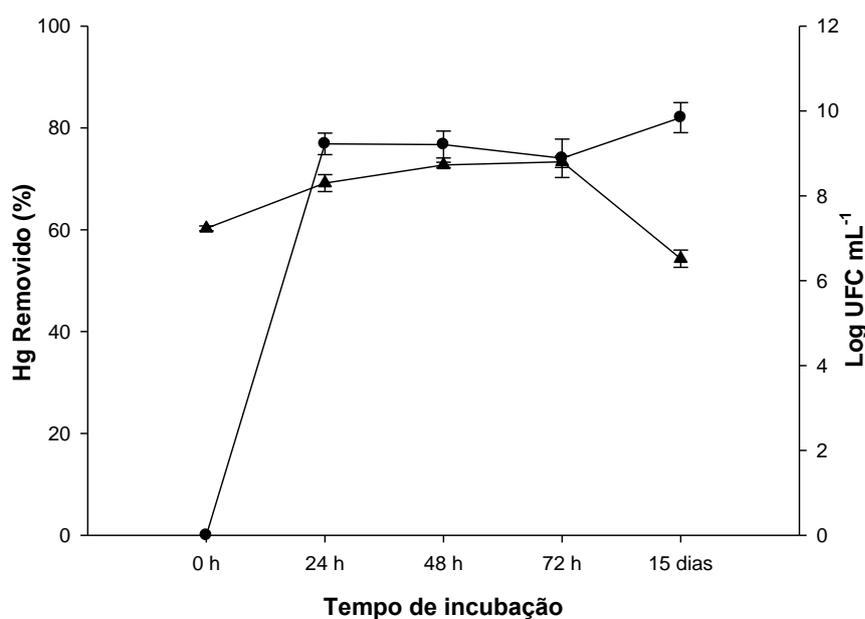
pH do Efluente	Hg Removido (%)	
	<i>Pseudomonas</i> sp. B50A	<i>Pseudomonas putida</i> V1
6	76,73±2,63a	59,37±3,55a
7	69,82±3,72b	54,11±1,30ab
8	61,08±1,98c	51,05±2,15b
9	2,18±0,38d	2,2±0,33c

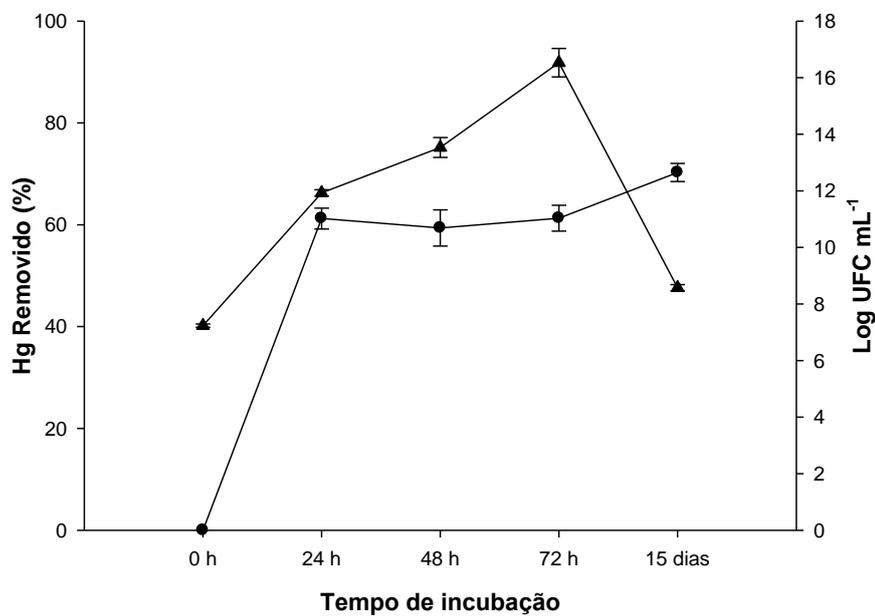
Valores em colunas com diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

A remoção de mercúrio pelos isolados *Pseudomonas* sp. B50A, *P. putida* V1 e em consórcio foi avaliada durante 15 dias (Figuras 4 A, B e C). A remoção do mercúrio não teve aumento significativo com a ampliação do tempo de incubação para o isolado *Pseudomonas* sp. B50A, permanecendo em torno de 75%. Quanto ao crescimento, não foi observada resposta positiva expressiva nas primeiras 72 h de incubação e aos 15 dias houve queda significativa no crescimento celular (Figura 4 A). Para o isolado *Pseudomonas putida* V1 a remoção de Hg teve aumento significativo aos 15 dias de incubação, sendo removido 70% do mercúrio adicionado ao efluente. Houve crescimento da população até às 72 h de incubação sofrendo uma redução de biomassa aos 15 dias (Figura 4 B). Em consórcio, a remoção de Hg foi dependente do tempo de incubação, embora isso tenha ocorrido apenas nas primeiras 48 h e após este período não houve diferença significativa na taxa de remoção (~75%). O crescimento teve uma fase lag inicial de até 48 h, uma fase logarítmica às 72 h e aos 15 dias foi observada queda no crescimento do consórcio (Figura 4 C).

A taxa máxima de remoção (80%) verificada no tratamento do efluente, mesmo com longo período de incubação, pode ser atribuída a deficiência de nutrientes ao longo do período para manter a população inoculada ativa. Nos três tratamentos houve uma fase de declínio na população bacteriana aos 15 dias de incubação, o que significa perda de viabilidade e morte celular. Além disso, a composição química do efluente pode interferir na biodisponibilidade do mercúrio para os micro-organismos, já que o mercúrio é facilmente complexado nos sólidos em suspensão e outros componentes orgânicos e inorgânicos do efluente (Canstein et al., 1999). Outra possibilidade diz respeito a enzima mercúrio redutase que é fortemente dependente dos íons em solução, sendo difícil prever a funcionalidade da mesma em um ambiente complexo como um efluente industrial.

A) *Pseudomonas* sp. B50A



B) *Pseudomonas putida* V1

C) Consórcio

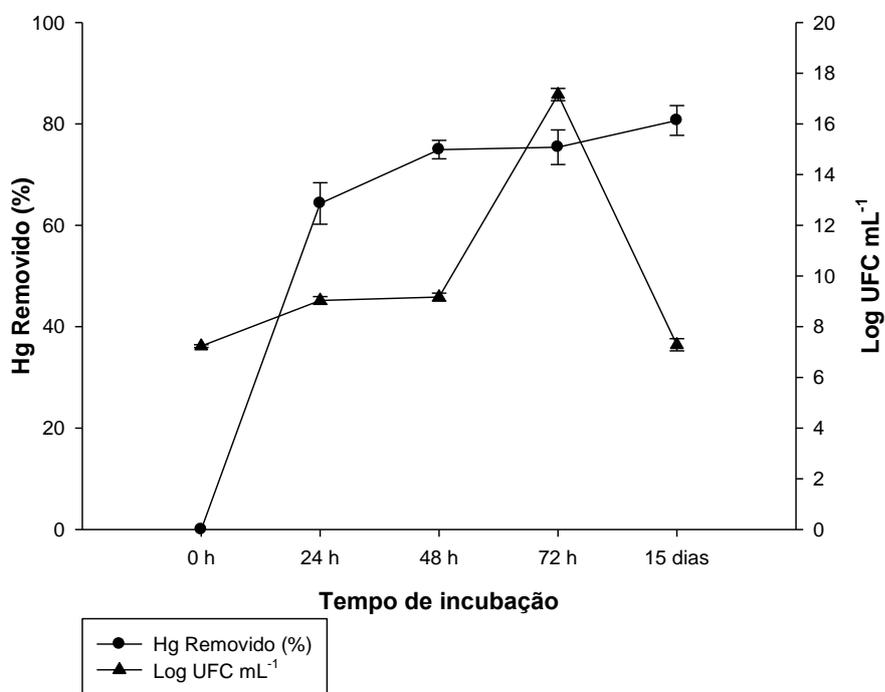


Figura 4. Remoção de mercúrio e crescimento bacteriano em efluente industrial ao longo do tempo. *Pseudomonas* sp. B50A (A), *Pseudomonas putida* V1 (B) e consórcio (C).

Para analisar as mudanças no perfil da comunidade bacteriana e verificar a permanência do inóculo durante a remoção de mercúrio no efluente industrial foram realizadas análises de PCR-DGGE e calculado o índice de Shannon-Wiener (Figura 5) (Tabela 4).

Nas primeiras 72 h de incubação houve pouca mudança na estrutura da comunidade bacteriana, sendo que os amplicons referentes ao inóculo dos isolados estão presentes até os 15 dias de incubação (figura 5). Canstein et al., 2002 ao avaliarem sete isolados resistentes ao mercúrio no tratamento de efluente da indústria de cloro e soda, também constataram a persistência do inóculo até o final do experimento.

Quando analisada a diversidade do controle (sem adição dos isolados) no tempo zero, observamos a baixa diversidade de bactérias no efluente industrial, podendo essa característica ser atribuída à recalcitrância do efluente ou conforme Müller et al., (2002) à limitações da própria técnica de PCR-DGGE para detectar a abundância de espécies.

Com maior período de incubação (15 dias), verifica-se que as comunidades bacterianas tanto do controle como nos diferentes tratamentos é incrementada, apresentando perfis de comunidade não relacionados. A maioria dos estudos relata uma diminuição na diversidade como resultado da pressão de seleção de um poluente (Nymam, 1999; Ramirez-Saad et al., 2000; Whiteley et al., 2001). Porém neste estudo, mesmo o controle que permaneceu com altas concentrações de mercúrio, teve um incremento na comunidade bacteriana no decorrer do período de incubação. Isso pode estar relacionado à temperatura de incubação, ao pH que foi ajustado para 6 ou ainda pelo

aumento da concentração de oxigênio devido a agitação orbital. As modificações das condições iniciais do efluente podem ter estimulado a microbiota nativa e eventualmente algumas espécies tolerantes podem ter aumentado em número (Canstein et al., 2002), o que explicaria o resultado observado.

Conforme o índice de Shannon-Wiener (tabela 4), com o tratamento do efluente utilizando os isolados e consórcio, tem-se uma maior diversidade bacteriana aos 15 dias de incubação se comparado ao controle. Isso se deve, provavelmente, por consequência da remoção do mercúrio do efluente no decorrer do período. Nessas condições, a população autóctone que permanecia latente no efluente pode ter sido estimulada. Eichner et al., 2000 e Yan, 2011 também verificaram que com o tempo, após a redução da concentração do poluente a diversidade bacteriana aumenta.

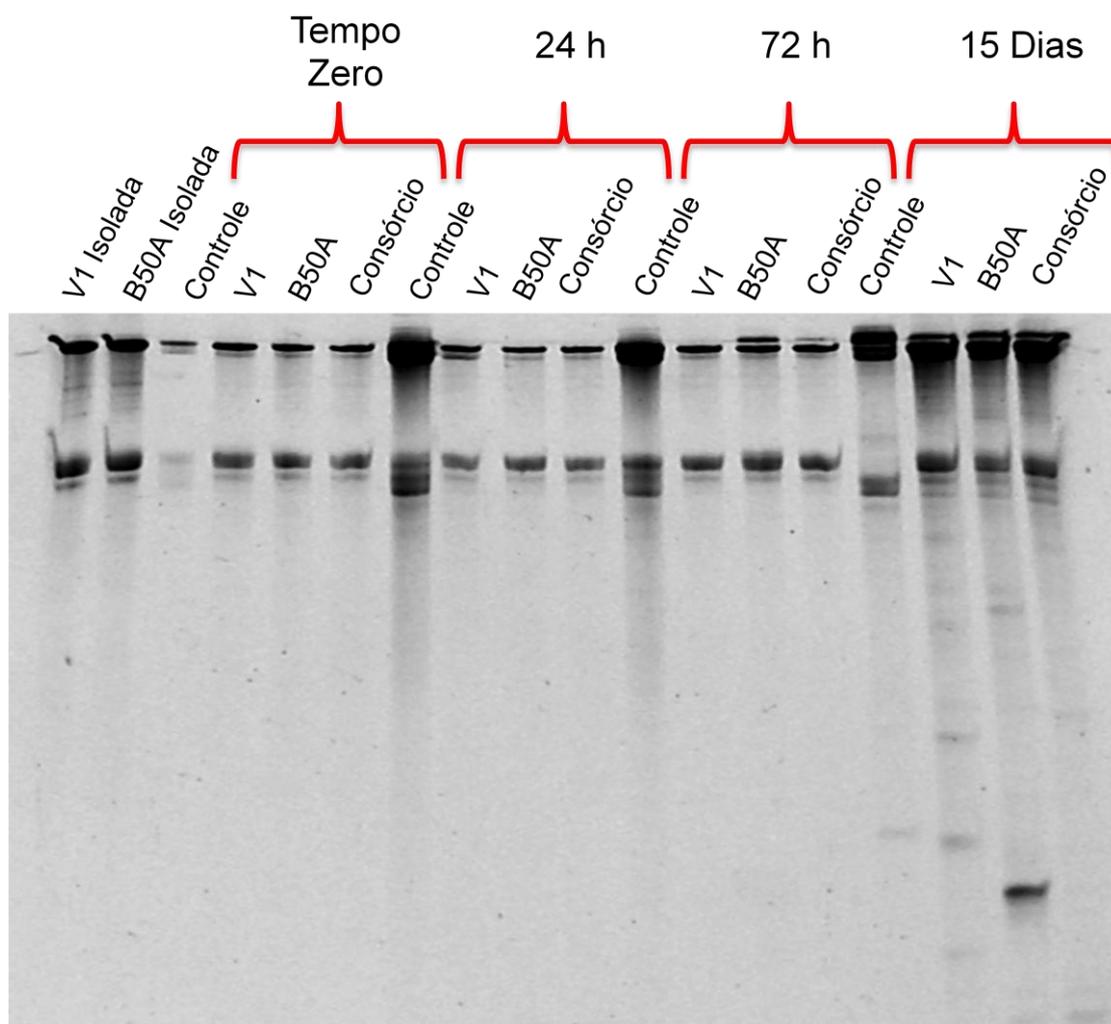


Figura 5. Comparação do perfil da comunidade bacteriana durante o tratamento do efluente industrial contaminado com mercúrio utilizando DGGE, com base na amplificação dos genes da região 16S rDNA.

Tabela 4. Determinação do Índice de diversidade de espécie H' (Shannon-Wiener) no tratamento de efluente industrial nos diferentes tempos avaliados.

Tempo de incubação	Tratamento	Índice de Shannon-Wiener (H')
	V1 (cultura pura)	0,7782
	B50A (cultura pura)	0,7782
Zero	controle	0,6990
	Isolado V1	0,7782
	Isolado B50A	0,7782
	Consórcio	0,7782
	controle	0,6321
24 horas	Isolado V1	0,7782
	Isolado B50A	0,8451
	Consórcio	0,7782
	controle	0,6021
72 horas	Isolado V1	0,6990
	Isolado B50A	0,8451
	Consórcio	0,7782
	controle	0,9031
15 dias	Isolado V1	1,1461
	Isolado B50A	1,0792
	Consórcio	1,0414
	controle	0,9031

Quando mercúrio, níquel, cádmio e chumbo foram adicionados simultaneamente no efluente, houve uma diminuição significativa no crescimento do consórcio microbiano nas primeiras 24 h de incubação (Figura 5). Pode-se perceber que o consórcio se manteve em fase lag até às 72h de incubação, tendo um aumento de biomassa aos 15 dias, no entanto esse aumento ficou próximo à contagem do inóculo inicial. Efeito negativo significativo foi verificado na capacidade do consórcio remover mercúrio e os outros metais. Embora o crescimento do consórcio tenha sido baixo, a resposta

de remoção parece estar relacionada ao aumento da contagem microbiana no efluente.

Esses resultados sugerem que a presença de múltiplos metais impõe uma resposta tóxica maior em comparação a exposição aos metais individualmente, já que as concentrações inibitórias desses metais foram bastante altas. O efeito sinérgico do Hg, Cd, Ni e Pb e da toxicidade do próprio efluente, causou inibição do crescimento do consórcio bacteriano levando a uma resposta pouco efetiva no que se refere a remoção do mercúrio e dos outros metais no efluente industrial.

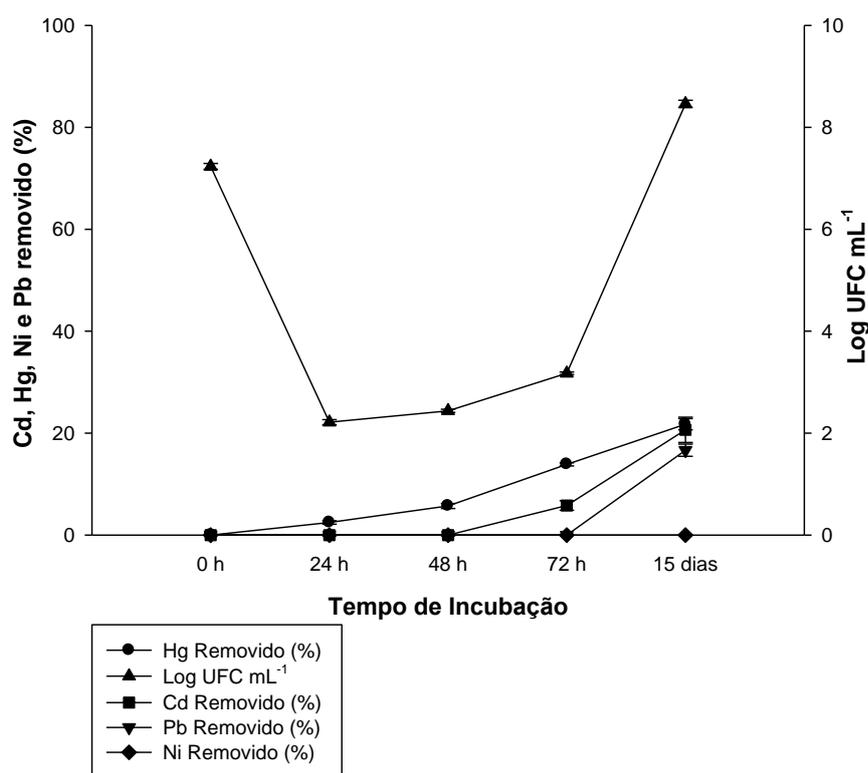


Figura 5. Remoção de mercúrio, cádmio, níquel e chumbo em efluente industrial pelo consórcio de *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1.

Conclusões

Os isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1 possuem alta resistência ao mercúrio, cádmio, níquel e chumbo. A presença dos genes *merA* indicam que a remoção do mercúrio se dá por volatilização. A remoção de mercúrio não é comprometida com a presença de outros metais em meio de cultura. Embora os isolados e o consórcio sejam competentes em remover mercúrio do efluente, quando na presença de múltiplos metais ocorre inibição do crescimento e perda da habilidade de remover Hg. A análise da estrutura da comunidade bacteriana pela técnica de PCR-DGGE mostra que é possível determinar a sobrevivência do inóculo durante a remoção do mercúrio, sendo que esse método pode ser utilizado para monitoramento dos mesmos durante o tratamento de efluentes. Os isolados avaliados neste trabalho são recomendados para tratamento de efluentes contaminados com mercúrio, contudo contaminações mais complexas (com outros metais) exigem a utilização concomitante de outros métodos ou ainda outros micro-organismos não avaliados neste estudo.

Referências bibliográficas

- ABOU-SHANAB, R. A.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J.S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v. 68, p. 360–367, 2007.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 176–182, 2006.
- BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 355-384, 2003.

BARKAY, T; WAGNER-DOBLER, I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, p. 1-52, 2005.

BEVERIDGE, T.J. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annual Review of Microbiology**, v. 43, p 147-171,1989.

BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p.1335-1351, 2000.

BRUINS, M.R.; KAPIL, S.; OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p.198-207, 2000.

Cabral L, Giovanella P, Gianello C, Bento FM, Andrezza R, Camargo FAO Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. **Biodegradation**, v. 24, p.319-331, 2013.

CAMARGO FAO, BENTO FM, JACQUES RJS (2007) **Uso de microrganismos para remediação de metais**. In: Ceretta CA, Silva LS, Reichert JM (eds) Tópicos em Ciência do Solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Minas Gerais, pp 468–496.

CANSTEIN, H. VON; KELLY, S.; LI, Y.; WAGNER-DOBLER; I. Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2829-2837, 2002.

DRISCOLL, C.T.; MASON, R.P.; CHAN, H.M.; JACOB, D.J.; PIRRONE, N. Mercury as a global pollutant: Sources, pathways, and effects. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p.:4967-4983, 2013.

EICHNER, C.A.; ERB, R.W.; TIMMIS, K.N.; WAGNER-DÖBLER, I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 102–109, 1999.

FU, F.L.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 407–418, 2011.

GACHHUY, J. R. et al. Studies on Mercury-detoxicating Enzymes from a Broad-Spectrum Mercury-Resistant Strain of *Flavobacterium rigense*. **Folia Microbiologica**, v.42, p. 337-343, 1997.

GADD, G. M. Microbial metal transformations. **Journal Microbiology**. v. 39, p. 83–88, 2001.

HARRISON , J. J.; CERI, H.; TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews – Microbiology**. v. 5, p. 927-938, 2007.

KANG, C.; WU, P.; LI, Y.; RUAN, B.; ZHU, N.; DANG, Z. Estimates of heavy metal tolerance and chromium(VI) reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB93066: chromium(VI) toxicity and environmental parameters optimization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 2733-46, 2014.

KELLY, C.A.; RUDD, J.W.M.; HOLOKA, M.H. Effect of pH on mercury uptake by aquatic bacterium: implications for Hg cycling. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 2941– 2946, 2003.

KERAMATI, P.; HOODAJI, M.; TAHMOURESPOUR, A. Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. **African Journal of Microbiology Research**, p. 5, v. 831–837, 2011.

KUSAL, K. DAS. A comprehensive review on nickel (II) and chromium VI toxicities - possible antioxidant (*Allium sativum* Linn) defences, **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 2, p. 43 -50, 2009.

LI, C., XU, Y., JIANG, W., DONG, X., WANG, D., LIU, B. Effect of NaCl on the heavy metal tolerance and bioaccumulation of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 46–52, 2013.

LIEBERT C. A.; WIREMAN, J.; SMITH SUMMERS, A. O. Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1066–1076, 1997.

MAILA, M.P.; RANDIMA, P.; DRONEN, K.; CLOETE, T.E. Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. **Journal of Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 303–310, 2006.

MALIK, A.; ALEEM, A. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 178, p. 293–30, 2011

MAXSON, P. Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales. In: Pirrone N, Mahaffey KR (eds) **Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World**. Springer: New York, pp 25-50, 2005.

MISHRA, A.; MALIK, A. Recent advances in microbial metal bioaccumulation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 1162–1222, 2013.

Método EPA 7471B; *Mercury in Solid or Semisolid Waste - Manual Cold-Vapor Technique*;

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7471b.pdf>, acessada em Janeiro de 2009.

MORBY, A.P.; TURNER, J.S.; HUCKLE, J.W.; ROBINSON, N.J. SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene smtA: Identification of a Zn-inhibited DNA-protein complex. **Nucleic Acid Research**, v. 21, n. 4, p. 921-925, 1993.

MOREL, F.M.M.; KRAEPIEL, A.M.L.; AMYOT, M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 543-566, 1998.

MÜLLER, A.K.; WESTERGAARD, K.; CHRISTENSEN, S.; SORENSEN, S.J. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. **Microbial Ecology**, v. 44, p. 49 – 58, 2002.

MULROONEY, S.B.; HAUSINGER, R.P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 239-261, 2003.

MUYZER, G.; DE WAAL, D.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695–700, 1993.

NAJA, G. M.; VOLESKY, B. Treatment of metal-bearing effluents: removal and recovery. In: Wang LK, Chen JP, Hung YT, Shammas NK (eds) **Handbook on heavy metals in the environment**. CRC Press, Boca Raton, pp 247–29, 2010.

NIES DH Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 730–750, 1999.

NYMAN, J. A. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils. **Microbial Ecology**, v. 37, p.152–162, 1999.

OSBORN, A.M.; BRUCE, K.D.; STRIKE, Pp.; RITCHIE, D.A. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 239–262, 1997.

RAMIREZ-SAAD, H. C.; SESSITSCH, A.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D. Bacterial community changes and enrichment of Burkholderia-like bacteria induced by chlorinated benzoates in a peat-forest soil-microcosm. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 591–598, 2000.

RAY, S. et al. Studies on the mercury volatilizing enzymes in nitrogen-fixing *Beijerinckia mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 184-186, 1993.

RODRIGUES, W.C. 2007. DivEs - Diversidade de Espécies - Guia do Usuário. Seropédica: Entomologistas do Brasil. 9 p. Disponível em: http://www.ebras.bio.br/dives/dives2_guia_user.pdf.

SANTOS-GOLDELMAN et al. Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 3, p. 585-590, 2014.

SARMA, B.; ACHARYA, C.; JOSHI, S.R. Pseudomonads: A versatile bacterial group exhibiting dual resistance to metals and antibiotics. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2828- 2835, 2010.

SILVER, S.; HOBMAN, J. L. Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental Aspects, Methylation, and Human Health. **Microbiology Monographs**, v. 6, p. 357-370, 2007.

TEEMU, H.; SEPPO, S.; JUSSI, M.; RAIJA, T.; KALLE, L. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 170–175, 2008.

UNEP. <http://www.chem.unep.ch/mercury/report/GMA-report-TOC.htm>. acessada em 23 de Setembro de 2013.

WAALKES M.P.; COOGAN, T.P.; BARTER, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 175–201, 1992.

WALSH, C.T. & ORME-JOHNSON, W.H. Nickel enzymes. **Biochemistry**, v. 26, p. 4901-4906, 1987.

WHITELEY, M.; OTT, J.R.; WEAVER, E.A.; MCLEAN, R.J. Effects of community composition and growth rate on aquifer biofilm bacteria and their susceptibility to betadine disinfection. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 43–52, 2001.

YAN, R.; YANG, F.; WU, Y.; HU, Z.; NATH, B.; YANG, L.; FANG, Y. Cadmium and mercury removal from non-point source wastewater by a hybrid bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9927–9932, 2011.

ZHANG, W.; CHEN, L.; LIU, D. Characterization of a marine-isolated mercury resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1305–1314, 2012..

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS

Apesar de o mercúrio ser tóxico, tanto para células eucarióticas quanto para procarióticas, alguns micro-organismos possuem mecanismos de resistência a esse metal. Bactérias que possuem operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o mercúrio (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg (0) (Nies, 1999; Barkay et al., 2003; Barkay & Wagner-Döbler, 2005; Zhang & Wang, 2006; Dash & Das, 2012).

Nos últimos anos, têm se dado maior atenção aos métodos biológicos de remediação de metais pesados, devido ao baixo custo de operação, alta eficiência de remoção, bom desempenho em baixas concentrações de metais (Teemu et al., 2008) e por serem alternativas mais ecologicamente corretas (Mishra & Malik, 2013). Nesse contexto, as bactérias são candidatas promissoras por apresentarem sistemas especializados de resistência aos metais (Nies, 1999).

Este trabalho avaliou a viabilidade da utilização do glicerol residual como fonte de carbono para a remoção biológica de Hg, pesquisou bactérias para remediação de ambientes com contaminações complexas e aplicou a técnica de bioaugmentação no tratamento de efluentes industriais contaminados com mercúrio e co-contaminados com outros metais.

No primeiro estudo, trinta e cinco isolados resistentes ao Hg foram avaliados quanto ao crescimento em glicerol como única fonte de carbono. Destes, oito isolados bacterianos apresentaram crescimento após 48 h de incubação em MM1 acrescido de glicerol comercial (99%) e foram selecionados para os demais experimentos.

Apenas os isolados *Pseudomonas* sp. B50A, *P. mirabilis* M50C e *K. pneumoniae* PLB apresentaram crescimento em meio de cultivo contendo glicerol residual como fonte de carbono sem adição de extrato de levedura. Os três isolados degradaram o glicerol e removeram Hg do meio de cultivo, porém o crescimento bacteriano foi afetado negativamente pelo meio de cultivo se comparado ao meio LB. Isso pode ser devido a composição do glicerol residual que contém substâncias associadas como o hidróxido de sódio e metanol que podem inibir o crescimento bacteriano (Thompson & He, 2006).

Os melhores resultados para remoção de Hg e degradação do glicerol foram obtidos utilizando os isolados *Serratia marcescens* M25C (85 e 100%), *Klebsiella pneumoniae* PLB (90 e 100%), *Klebsiella oxytoca* U14 (90 e 100%) e *Arthrobacter* sp. U3 (80 e 65%) e com adição de 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura no meio de cultivo. É provável que essa resposta positiva esteja relacionada ao incremento nutricional fornecido pelo extrato de levedura. Já que o mesmo, além de fornecer fonte extra de nitrogênio e vitaminas, também possui fonte de carbono que pode ser utilizada para a produção da biomassa (Níkel et al., 2010).

São escassos os estudos que reportam bactérias do gênero *Arthrobacter* como removedoras de mercúrio e nenhuma informação está

disponível referindo-se ao potencial de degradar glicerol residual. Esses actinomicetos representam potencial para o uso direto no ambiente, pois possuem baixa patogenicidade (Bernasconi et al., 2004), e crescem mais rapidamente do que outras espécies bacterianas em ambientes estressados, como em pHs alcalinos e contaminados com metais (Camargo et al., 2004). Isso se deve a sua versatilidade metabólica e a capacidade que possuem de desintoxicar/degradar xenobióticos orgânicos e metais (Sajjaphan, 2004). Neste estudo foi apresentada a caracterização inicial do isolado *Arthrobacter* sp. U3 e as informações obtidas sugerem que esta linhagem pode ser utilizada como tecnologia de baixo custo para tratamento de efluentes contaminados com Hg e com baixas taxas de carbono metabolizável.

Na perspectiva das pesquisas envolvendo metais, a urgência está em estudar micro-organismos com diferentes mecanismos de resistência, a fim de se encontrar candidatos potenciais a biorremediação de ambientes com contaminações mais complexas. Deste modo, no segundo artigo desta tese procurou-se investigar a remoção de mercúrio na presença de outros metais, abordar a possibilidade da utilização de um micro-organismo capaz de remover além do mercúrio, outros metais e investigar quais os mecanismos de resistência aos metais estão envolvidos.

A remoção de mercúrio na presença de outros metais foi observada. O isolado *Pseudomonas* sp B50D foi o que apresentou melhor desempenho quando avaliada remoção de mercúrio concomitante a outros metais. Sua capacidade de remover Hg na presença de Cd foi de 75%, havendo diferença significativa negativa em comparação a remoção sem adição de Cd. Enquanto

que na presença de Ni e Pb ele manteve a capacidade inicial de remoção de Hg (91%). A diminuição da remoção do Hg pode estar relacionada à inibição da enzima mercúrio redutase pela presença do cádmio no meio. Sugerimos essa justificativa baseada no apoio do estudo conduzido por Ray et al., (1993), em que constatou que o cádmio inibiu 100% da atividade da enzima mercúrio redutase no extrato bruto de *Beijerinckia mobilis* na concentração de 10 µM. Além da remoção do mercúrio, o isolado removeu 60% (Cd), 90% (Ni) e 85% de Pb. Em nosso estudo foi verificada queda significativa da remoção de Cd quando a concentração foi aumentada para 0,3 mM e 0,4mM. Wang et al., (1997) também observaram queda na remoção com o aumento da concentração de Cd no meio. Essa resposta pode estar relacionada a saturação da superfície celular disponível para biossorção (Vullo et al., 2008). Diferentemente do cádmio, o níquel apresentou resposta positiva nas maiores doses testadas. Isso pode estar relacionado à condição de estresse sofrida pela bactéria com o aumento das concentrações de níquel. Em caso de estresse metálico, alguns micro-organismos podem expressar genes relacionados à produção de metalotioneínas (Morby et al.,1993), biofilmes (Harrison et al., 2007) e sideróforos (Li et al., 1997) que podem levar a complexação, imobilização, e precipitação dos metais (Gadd, 2001).

No que se refere a resistência aos metais, *Pseudomonas* sp. B50D foi multimetal resistente. Essa informação nos revela que provavelmente esse isolado possui o mecanismo de co-resistência, o qual pode resultar num fenótipo de múltiplos mecanismos de resistência permitindo uma defesa celular mais ampla (Baker-Austin et al., 2006, Sarma et al., 2010).

Para elucidar os mecanismos de resistência aos metais do isolado *Pseudomonas* sp B50D, foram avaliados o local da bioacumulação, produção de biofilmes e produção de sideróforos.

Verificamos que para os três metais avaliados (Cd, Ni e Pb) o montante maior de acumulação ocorre na superfície celular. A parede celular das bactérias pode impedir o fluxo de íons metálicos para o interior da célula a partir da bioissorção em sua estrutura complexa. Os fosfolípidos da membrana externa possuem grupos fosforilados podendo também ser uma região de adsorção nesse tipo de células (Beveridge & Murray, 1980; Graham & Beveridge, 1994).

Muitos micro-organismos sintetizam polímeros extracelulares (EPS) que se ligam a cátions metálicos tóxicos, protegendo os componentes essenciais da célula (Bruins et al., 2000). Cádmio, chumbo, níquel e mercúrio estimularam a produção de biofilmes pelo isolado *Pseudomonas* sp. B50D. Esse tipo de resposta pode ser vista como um processo de diversificação fenotípica dependente da concentração de espécies metálicas (Harrison et al., 2007).

Essas características (bioissorção na parede celular e produção de biofilmes) têm um significado relevante no que se refere a tratamento de efluentes contaminados com metais, pois a bioissorção vem sendo apontada como uma biotecnologia promissora para remoção de poluentes em solução (Tsezos, 2001; Volesk, 2007; Fu & Wang, 2011).

Os metais Hg, Ni e Pb promoveram um aumento na produção de sideróforos pelo isolado *Pseudomonas* sp. B50D em relação ao controle.

Marcadamente o mercúrio e o níquel geraram um efeito positivo na produção de sideróforos, dependendo do aumento da concentração dos mesmos no meio de cultivo. Já o cádmio, não estimulou a produção de sideróforos em nenhuma das concentrações testadas. Estudos anteriores mostram que os metais como mercúrio, chumbo e níquel podem estimular a produção de sideróforos (Dao et al., 2001; Naik & Dubey, 2011; Braud et al., 2009). A produção de sideróforos induzida por metais tóxicos sugere que esses quelantes, podem exercer um papel importante na tolerância das bactérias aos metais pesados (Li et al., 1997). O complexo metal/sideróforo gerado no meio extracelular reduz a concentração de metais livres, e afeta a difusão destes para dentro da célula (a massa molecular metal/sideróforo não difunde via porinas). Assim, a concentração intracelular de metais tóxicos se mantém baixa e conseqüentemente a tolerância microbiana ao metal aumenta (Schalk et al., 2011).

Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade das bactérias removerem mercúrio em meios de cultura. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta da remoção do mercúrio pelas bactérias resistentes em efluentes industriais, ou ainda, efluentes co-contaminados com outros metais. Nesse sentido, o terceiro estudo desta tese buscou avaliar esta possibilidade no tratamento de efluentes industriais.

O efluente industrial utilizado neste estudo foi obtido na empresa gerenciadora de resíduos industriais UTRESA de Estância Velha – RS. Pelo fato deste efluente conter baixas concentrações dos metais de interesse nesse estudo, ele foi artificialmente contaminado com os metais.

Tanto *Pseudomonas* sp B50A quanto *Pseudomonas putida* V1 apresentaram alta resistência aos metais avaliados. A concentração mínima inibitória variou de 0,92 mM para o mercúrio a 18 mM para o chumbo. Já a concentração mínima biocida variou de 0,99 mM para o mercúrio e mais de 300 mM para o níquel. Bactérias do gênero *Pseudomonas* geralmente apresentam alta resistência a diversos metais. Malik & Aleen, (2011) avaliaram 144 bactérias desse gênero e observaram alto índice de resistência aos diferentes metais avaliados. Assim como neste estudo, Zhang et al., (2012) e Kang et al., (2014) ao estudarem a resistência aos metais de isolados de *Pseudomonas* também verificaram que o mercúrio foi o mais tóxico, sendo o que apresenta as menores concentrações inibitórias.

Em meio de cultura ambos os isolados removeram aproximadamente 80% do mercúrio. O mecanismo mais comum para remoção de mercúrio por bactérias resistentes ocorre por volatilização. Embora neste estudo tenha sido avaliada de forma indireta a capacidade de volatilização (quantificação da concentração remanescente), é bastante provável que a remoção do Hg pelos isolados tenha ocorrido por volatilização, pois foi confirmada a presença do gene *merA* pela técnica de PCR.

Quando avaliada a remoção de Cd em meio de cultura, a resposta foi positiva para ambos os isolados (~ 60%), enquanto que a remoção de níquel e chumbo foi pouco efetiva, ficando entre 1,7 e 6,5%. Em caso de estresse metálico, alguns micro-organismos podem expressar genes relacionados à produção de metalotioneínas (Morby et al.,1993), biofilmes (Harrison et al., 2007) e sideróforos (Li et al., 1997). Essas são estratégias de

sobrevivência que podem levar a complexação, imobilização, remoção e precipitação dos metais (Gadd, 2001), protegendo componentes essenciais da célula.

O cádmio afetou significativamente de forma negativa a capacidade dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *P. putida* V1 removerem Hg. Ainda que o cádmio tenha interferido na remoção do Hg, o máximo efeito negativo foi de 10% nas maiores doses testadas, o que significa um resultado promissor do ponto de vista prático.

Para o isolado *Pseudomonas* sp. B50A o níquel promoveu diminuição significativa na capacidade de remoção do Hg em 8%, já para o isolado *P. putida* V1 o efeito foi positivo na segunda concentração testada (0,50 mM) para a remoção de Hg enquanto que concentrações acima de 0,5 mM geraram uma discreta diminuição na remoção mercúrio. Em altas concentrações o níquel é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio, deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas e geração de radicais livres (Das, 2009), podendo deste modo interferir no crescimento e permanência de células viáveis.

O aumento da concentração de chumbo não comprometeu a capacidade dos isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *P. putida* V1 removerem Hg do meio de cultivo, evidenciando que a co-contaminação por esse metal pode não ser um impedimento do uso em efluentes.

De modo geral, o aumento do pH do efluente proporcionou uma resposta negativa na remoção de Hg pelos isolados, sendo que para ambos os isolados a remoção foi inibida aproximadamente 100% em pH 9. Esses

resultados sugerem que para os pHs mais baixos avaliados, os efeitos do pH estejam mais relacionados a especiação química do mercúrio, já que as mesmas variam de acordo com o pH (Morel et al., 1998) o que torna o mercúrio mais ou menos disponível para os micro-organismos. Nos pHs mais extremos avaliados (8 e 9) é presumível que além da influência da baixa biodisponibilidade do mercúrio ocorra também um estresse fisiológico.

A remoção de mercúrio pelos isolados *Pseudomonas* sp. B50A, *P. putida* V1 e em consórcio foi avaliada em efluente industrial durante 15 dias e a taxa máxima de remoção foi de 80%. Essa resposta verificada no tratamento do efluente, mesmo com longo período de incubação, pode ser atribuída a deficiência de nutrientes ao longo do período para manter a população inoculada ativa. Além disso, a enzima mercúrio redutase pode ter sido inibida pelos íons em solução e outros constituintes do efluente, sendo difícil prever a funcionalidade da mesma em um ambiente complexo como um efluente industrial. Como o mercúrio é facilmente complexado nos sólidos em suspensão e outros componentes orgânicos e inorgânicos do efluente (von Canstein et al., 1999), pode ter permanecido indisponível para as bactérias atuarem de forma efetiva na remoção.

Para analisar as mudanças no perfil da comunidade bacteriana e verificar a permanência do inóculo durante a remoção de mercúrio no efluente industrial foram realizadas análises de PCR-DGGE e calculado o índice de Shannon-Wiener.

Nas primeiras 72 h de incubação houve pouca mudança na estrutura da comunidade bacteriana. Porém foi observado que os amplicons referentes

ao inóculo dos isolados adicionados, foram identificados pela banda no gel até os 15 dias de incubação. Canstein et al., (2002) avaliaram a capacidade de remoção de Hg de sete isolados bacterianos, em biorreatores durante 81 dias no tratamento de efluente da indústria de cloro e soda e também constataram a persistência do inóculo até o final do experimento. Os autores utilizaram para isso a técnica RISA onde o perfil de comunidade é avaliado em gel de poliacrilamida, como no presente estudo.

Com maior período de incubação (15 dias), verifica-se que as comunidades bacterianas tanto do controle como nos diferentes tratamentos (com adição dos isolados bacterianos resistentes) é incrementada, apresentando perfis de comunidade não relacionados. A maioria dos estudos relata uma diminuição na diversidade como resultado da pressão de seleção de um poluente (Nymam, 1999; Ramirez-Saad et al., 2000; Whiteley et al., 2001). Porém neste estudo, mesmo o controle que permaneceu com altas concentrações de mercúrio, teve um incremento na comunidade bacteriana no decorrer do período de incubação. Isso pode estar relacionado à temperatura de incubação, ao pH que foi ajustado para 6 ou ainda pelo aumento da concentração de oxigênio devido a agitação orbital. As modificações das condições iniciais do efluente podem ter estimulado a microbiota nativa e eventualmente algumas espécies tolerantes podem ter aumentado em número (Canstein et al., 2002), o que explicaria o resultado observado.

Conforme o índice de Shannon-Wiener que determina o índice de diversidade de espécies, com o tratamento do efluente utilizando os isolados e consórcio, tem-se uma maior diversidade bacteriana aos 15 dias de incubação

se comparado ao controle. Isso se deve, provavelmente, por consequência da remoção do mercúrio do efluente no decorrer do período. Nessas condições, a população autóctone que permanecia latente no efluente pode ter sido estimulada. Eichner et al., (2000) e Yan, (2011) também verificaram que com o tempo, após a redução da concentração do poluente a diversidade bacteriana aumenta.

Em nosso estudo não foi possível conhecer a composição da comunidade em nível de espécie, pois as amostras não foram enviadas para o sequenciamento antes da defesa da tese. Porém estes resultados serão incluídos no estudo para ser encaminhado para publicação.

Diferentes espécies de bactérias capazes de remover mercúrio vêm sendo isoladas e caracterizadas (Zhang et al., 2012; Cabral et al., 2013; Sone et al., 2013). Contudo, particularmente em efluentes, as limitações associadas ao processo não têm sido exploradas para uma melhor avaliação da real aplicabilidade da biorremediação por bactérias resistentes. Neste estudo, ficaram evidentes as dificuldades e a importância de se investigar o impacto das interações de diferentes agentes tóxicos e os problemas inerentes ao próprio efluente industrial. Revelando que o grande desafio é otimizar condições e procedimentos para manter os níveis de contaminantes, nutrientes e pH ideais para uma melhor atividade microbiana.

5. CONCLUSÕES

- Dez isolados Gram-negativos avaliados neste estudo possuem os genes *merA* e capacidade de remover Hg, o que confirma que a remoção para estes isolados ocorra por volatilização;

- Este trabalho demonstra a viabilidade da utilização de glicerol residual como fonte de carbono para remoção bacteriana do Hg de ambientes contaminados e com baixas concentrações de carbono;

- O isolado *Pseudomonas* sp. B50D foi o que apresentou melhor desempenho quando avaliada remoção de mercúrio concomitante a outros metais, sendo um candidato com potencial aplicação na biorremediação de efluentes com contaminações metálicas complexas;

- Os isolados *Pseudomonas* sp. B50A e *Pseudomonas putida* V1 são competentes em remover mercúrio do efluente, porém quando na presença de múltiplos metais ocorre inibição do crescimento e perda da habilidade de remover Hg. Deste modo são recomendados para tratamento de efluentes contaminados com mercúrio, contudo contaminações mais complexas (com outros metais) exigem a utilização concomitante de outros métodos ou ainda outros micro-organismos não avaliados neste estudo.

- Neste estudo, ficaram evidentes as dificuldades e a importância de se investigar o impacto das interações de diferentes agentes tóxicos e do próprio efluente industrial. Revelando que o grande desafio é otimizar condições e procedimentos para manter os níveis de contaminantes, nutrientes e pH ideais para uma melhor atividade da bactéria removedora de mercúrio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER-AUSTIN, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 176–182, 2006.

BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 355-384, 2003.

BARKAY, T.; WAGNERDOBLER, I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, p. 1-52, 2005.

BERNASCONI, E. et al., *Arthrobacter woluwensis* Subacute Infective Endocarditis: Case Report and Review of the Literatura. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 27-31, 2004.

BEVERIDGE, T..J. & MURRAY, R.G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **Jornal of Bacteriology**, v. 141, n. 2, p. 876-887, 1980.

BRAUD, A.; HOEGY, F.; JEZEQUEL, K.; LEBEAU, T.; SCHALK, I.J. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. **Environmental Microbiology**. v. 11, p. 1079–1091, 2009

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, p. 198–207. 2000.

Cabral L, Giovanella P, Gianello C, Bento FM, Andrezza R, Camargo FAO Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. **Biodegradation**, v. 24, p.319-331, 2013.

CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by an actinomycete, *Arthrobacter acrytallopoidetes* ES 32. **Biological Trace Element Research**, V. 97, p.183–194, 2004

CANSTEIN, H. et al. Removal of Mercury from Chloralkali Electrolysis Wastewater by a Mercury-Resistant *Pseudomonas putida* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5279-5284, 1999.

CANSTEIN, H. VON; KELLY, S.; LI, Y.; WAGNER-DOBLER; I. Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2829-2837, 2002.

DAO, K. H. T.; HAMER, K. E.; CLARK, C. L.; HARSHMAN, L. G. Pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* exposed to metals or an oxidative stress. **Ecological Applications**, v. 9, p. 441 – 448, 2001.

DASH, H.R.; DAS, S. Bioremediation of mercury and importance of bacterial *mer* genes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 75, p. 207–213, 2012

EICHNER, C.A.; ERB, R.W.; TIMMIS, K.N.; WAGNER-DÖBLER, I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 102–109, 1999.

FU, F.L.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 407–418. 2011.

GADD, G.M. Microbial metal transformations. **Journal Microbiology**. v. 39, p. 83–88, 2001.

GRAHAM, L.L., & BEVERIDGE, T.J. Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. **Jornal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, v. 1413-1421,1994.

HARRISON, J. J.; CERI, H.; TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 927-938, 2007.

KANG, C.; WU, P.; LI, Y.; RUAN, B.; ZHU, N.; DANG, Z. Estimates of heavy metal tolerance and chromium(VI) reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB93066: chromium(VI) toxicity and environmental parameters optimization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 2733-2746, 2014.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; WILLIAMS, K.E. Silverresistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6127– 6132, 1997.

MALIK, A.; ALEEM, A. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with

wastewater and groundwater. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 178, p. 293–30, 2011.

MISHRA, A.; MALIK, A. Recent advances in microbial metal bioaccumulation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 1162–1222, 2013.

MORBY, A.P.; TURNER, J.S.; HUCKLE, J.W.; ROBINSON, N.J. SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: Identification of a Zn-inhibited DNA-protein complex. **Nucleic Acid Research**. v. 21, n. 4, p. 921-925, 1993.

MOREL, F.M.M.; KRAEPIEL, A.M.L.; AMYOT, M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 543-566, 1998.

NYMAN, J. A. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils. **Microbial Ecology**, v. 37, p.152–162, 1999.

NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. **Current Microbiology**, v. 62, p. 409–414. 2011.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 730–750, 1999.

NIKEL, P.I.; RAMIREZ, M.C.; PETTINAR, I M.J.; MÉNDEZ, B.S.; GALVAGNO M.A. Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing *adhE* from *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of applied Microbiology**, V. 109, p. 492–504, 2010.

RAMIREZ-SAAD, H. C.; SESSITSCH, A.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D. Bacterial community changes and enrichment of Burkholderia-like bacteria induced by chlorinated benzoates in a peat-forest soil-microcosm. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 591–598, 2000.

RAY, S. et al. Studies on the mercury volatilizing enzymes in nitrogen-fixing *Beijerinckia mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 184-186, 1993.

SAJJAPHAN, K.; SHAPIR, N.; WACKETT, L.P.; PALMER, M.; BLACKMON, B.; TOMKINS, J.; SADOWSKY, J. *Arthrobacter aureescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4402–4407, 2004.

SARMA, B.; ACHARYA, C.; JOSHI, S.R. Pseudomonads: A versatile bacterial group exhibiting dual resistance to metals and antibiotics. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2828- 2835, 2010.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 2844–2854, 2011.

SONE, Y.; MOCHIZUKI, Y.; KOIZAWA, K.; NAKAMURA, R.; PAN-HOU, H.; ITOH, T.; KIYONO, M. Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68. **AMB Express**, v. 3, p 41, 2013.

TEEMU, H.; SEPPO, S.; JUSSI, M.; RAIJA, T.; KALLE, L. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 170–175, 2008.

THONPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.

TSEZOS, M. Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 241–243, 2001.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v. 41, p. 4017–4029, 2007.

VULLO, D.L.; CERETTI, H. M.; DANIEL, M. A.; RAMIREZ, S. A. M.; ZALTS, A. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5574-5581, 2008.

WANG, C.L. et al. Cadmium removal by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4075–4078, 1997.

WHITELEY, M.; OTT, J.R.; WEAVER, E.A.; MCLEAN, R.J. Effects of community composition and growth rate on aquifer biofilm bacteria and their susceptibility to betadine disinfection. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 43–52, 2001.

YAN, R.; YANG, F.; WU, Y.; HU, Z.; NATH, B.; YANG, L.; FANG, Y. Cadmium and mercury removal from non-point source wastewater by a hybrid bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9927–9932, 2011.

ZHANG, W.; CHEN, L.; LIU, D. Characterization of a marine-isolated mercury resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1305–1314, 2012.