

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA
REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

ÁLEF DA SILVA SOUSA

RESISTÊNCIA A METAIS EM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE
PLANTA AQUÁTICA

VOLTA REDONDA - RJ

2023

ÁLEF DA SILVA SOUSA

**RESISTÊNCIA A METAIS EM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE
PLANTA AQUÁTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Aline Chaves Intorne

VOLTA REDONDA - RJ

2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BEM
Gerada com informações fornecidas pelo autor

S725r Sousa, Álef da Silva
RESISTÊNCIA A METAIS EM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE PLANTA
AQUÁTICA / Álef da Silva Sousa. - 2023.
59 f.

Orientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro.
Coorientador: Aline Chaves Intorne.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta
Redonda, Volta Redonda, 2023.

1. Microrganismo. 2. Poluição Ambiental. 3.
Biorremediação. 4. Produção intelectual. I. Teodoro,
Carlos Eduardo de Souza, orientador. II. Intorne, Aline
Chaves, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense.
Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta
Redonda. IV. Título.

CDD - XXI

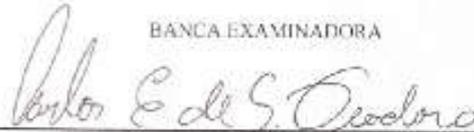
ÁLEF DA SILVA SOUSA

RESISTÊNCIA A METAIS EM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE PLANTA
AQUÁTICA

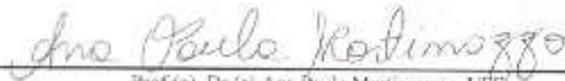
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Aprovada em 22 de dezembro de 2023.

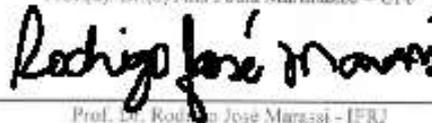
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro – UFF
Orientador



Prof.(a). Dr.(a) Ana Paula Martinazzo – UFF



Prof. Dr. Rodrigo José Marazzi - IFRJ

Volta Redonda
2023

Dedico este trabalho à minha mãe Marinete Sousa e ao meu pai Heleno José (*in memoriam*) que não está mais entre nós, mas continua sendo minha maior força na vida. Sua lembrança me inspira e me faz persistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda essa longa caminhada.

Ao professor Dr^o Carlos Eduardo de Souza Teodoro pela orientação e aprendizado constante por sempre viabilizar os experimentos realizados no Laboratório de Biotecnologia da UFF campus Volta Redonda (B26), por ter dado a oportunidade de realizar o estágio à docência que além da pesquisa foi outro grande aprendizado de fundamental importância em minha trajetória.

À professora Dr^a Aline Chaves Intorne por todo aprendizado adquirido, co-orientação e pela oportunidade de poder integrar o grupo de pesquisa em Microbiologia Ambiental onde houveram trocas essenciais para o desenvolvimento do meu projeto.

Aos colegas de laboratório na UFF, Pedro Saturno, Thiago Queiroz, Paula Alexandra. Aos alunos de IC Laura Maria e Leticia Reis; e aos colegas do grupo de pesquisa em Microbiologia Ambiental Glacielen Rineiro e Analyse Villanueva pelos momentos de aprendizado e entretenimento.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro através do fomento à pesquisa.

RESUMO

O Brasil apresenta uma das maiores bacias hidrográficas do mundo, acidentes como rompimento de barragens e lançamento de efluentes podem contaminar corpos hídricos com metais. Uma solução para descontaminação seria a biorremediação que é o uso de processos biológicos para tratar o ambiente, uma técnica de baixo custo e eficaz em termos ecológicos, pois, em geral, não causa poluição secundária. A desvantagem é que esse tratamento é cineticamente lento. Os microrganismos, por seu metabolismo rápido, podem acelerar o processo. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de resistência das bactérias *Rouhela ornithynolitica*, *Enterobacter asburiae* e *Serratia marcescens*, isoladas da planta aquática *T. domingensis* a Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) e o potencial de remoção desses metais no processo de biorremediação. Inicialmente, essas três bactérias foram selecionadas de uma Coleção de Microrganismos isolados de *T. domingensis*. Em seguida, essas bactérias foram cultivadas em meio Lurian Bertani (LB) por 24h sob agitação constante a 30 °C. Após este período, os microrganismos foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura LB contendo concentrações crescentes dos metais para encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) para cada cepa testada. Posteriormente o microrganismo *Serratia marcescens* que apresentou melhor resultado, foi selecionado juntamente com os metais em que ele melhor se desenvolveu, para realizar testes de absorção, onde 0,1 ml D_{600nm} . O do microrganismo foi inoculado em erlenmeyers contendo 50ml de meio LB e concentrações de 50 e 100ppm de Cádmio e Zinco separadamente, foram submetidos a agitação constante em shaker orbital a 175rpm em temperatura de 30 °C e retiradas alíquotas a cada 12h que posteriormente foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica tanto o sobrenadante quanto a suspensão. A cepa de *Serratia marcescens* apresentou crescimento até 1200ppm para o Zn; 300ppm para Ni; 300ppm para Cu e 600ppm para Cd e no teste de extração de metal a bactéria conseguiu extrair do meio em 36h, aproximadamente 40% para ambos os metais na maior concentração testada. Portanto, a bactéria mais promissora foi a *S. marcescens* podendo ser uma candidata para tornar o tratamento de efluentes industriais e de esgoto podendo conter Zinco e Cádmio, mais eficiente.

Palavras-chave: Biorremediação. Microrganismo. Poluição Ambiental.

ABSTRACT

Brazil has one of the largest river basins in the world, and accidents such as dam breaks and effluent discharges can contaminate water bodies with metals. One solution for decontamination would be bioremediation, which is the use of biological processes to treat the environment. This is a low-cost and effective technique in ecological terms, as it generally does not cause secondary pollution. The disadvantage is that this treatment is kinetically slow. Microorganisms, due to their rapid metabolism, can speed up the process. The aim of this study was to evaluate the resistance capacity of the bacteria *Routhela ornithinolitica*, *Enterobacter asburiae* and *Serratia marcescens*, isolated from the aquatic plant *T. domingensis*, to cadmium (Cd), copper (Cu), nickel (Ni) and zinc (Zn) and their potential for removing these metals in the bioremediation process. Initially, these three bacteria were selected from a Collection of Microorganisms isolated from *T. domingensis*. These bacteria were then cultivated in Lurian Bertani (LB) medium for 24 hours under constant agitation at 30 °C. After this period, the microorganisms were plated in Petri dishes containing LB culture medium with increasing concentrations of the metals in order to find the minimum inhibitory concentration (MIC) for each strain tested. Subsequently, the *Serratia marcescens* microorganism that showed the best results was selected, along with the metals in which it developed best, to carry out absorption tests, where 0.1 ml 600nmD. O of the microorganism was inoculated into erlenmeyers containing 50ml of LB medium and concentrations of 50 and 100ppm of Cadmium and Zinc separately. They were subjected to constant agitation in an orbital shaker at 175rpm at a temperature of 30 °C and aliquots were taken every 12 hours and then analyzed in an atomic absorption spectrophotometer, both the supernatant and the suspension. The *Serratia marcescens* strain grew up to 1200ppm for Zn; 300ppm for Ni; 300ppm for Cu and 600ppm for Cd and in the metal extraction test the bacterium managed to extract approximately 40% of both metals from the medium in 36 hours at the highest concentration tested. Therefore, the most promising bacterium was *S. marcescens*, which could be a candidate for making the treatment of industrial effluents and sewage containing zinc and cadmium more efficient.

Keywords: Bioremediation. Microorganisms. Environmental pollution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Crescimento da bactéria <i>S. marcescens</i> em meio de cultura LB sem glicose e suplementado com glicose 1%	33
Figura 2 Crescimento da bactéria <i>R. ornithinolytica</i> em meio de cultura LB sem glicose e suplementado com glicose 1%	33
Figura 3 Crescimento da bactéria <i>E. asburie</i> em meio de cultura LB sem glicose e suplementado com glicose 1%	34
Figura 4 Crescimento das bactérias em concentrações crescentes de ZnCl ₂	38
Figura 5 Área de Crescimento das cepas de bactérias em concentrações crescentes de CdCl ₂	39
Figura 6 Área de Crescimento das cepas de bactérias em concentrações crescentes de NiCl ₂	39
Figura 7 Área de Crescimento das cepas de bactérias em concentrações crescentes de CuCl ₂	40
Figura 8 Análise Morfológica das colônias de bactérias após 5 dias de exposição ao metal..	40
Figura 9 Crescimento da bactéria <i>Serratia marcescens</i> em Meio LB com 1% de Glicose suplementado com CdCl ₂	41
Figura 10 Crescimento da bactéria <i>Serratia marcescens</i> em Meio LB com 1% de Glicose suplementado com ZnCl ₂	42
Figura 11 Peso Seco em diferentes tempo e concentrações de CdCl ₂	44
Figura 12 Peso Seco em diferentes tempos e concentrações de ZnCl ₂	44
Figura 13 Quantidade de CdCl ₂ em PPM presente no Meio de Cultura	46
Figura 14 Quantidade de ZnCl ₂ em PPM presente no Meio de Cultura	47
Figura 15 Quantidade de Cádmio adsorvido na célula.....	49
Figura 16 Quantidade de Zinco adsorvido na célula.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cádmio, Cobre, Níquel e Zinco para os isolados bacterianos.....	34
Tabela 2 Porcentagem de remoção de metal em diferentes tempos	46
Tabela 3 Porcentagem de adsorção de metal na célula em diferentes tempos.....	48.

3. SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Metais pesados.....	15
2.1.1. Cádmió	16
2.1.2. Cobre	17
2.1.3. Zinco.....	18
2.1.4. Níquel.....	20
2.2. Biorremediação	22
2.3. Microrganismos Resistentes a metais.....	25
2.4. <i>Serratia marcescens</i>	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Microrganismos utilizados	29
4.2. Cultivo e manutenção dos microrganismos.....	29
4.3. Concentração inibitória mínima.....	29
4.4. Curva de Crescimento do Inóculo.....	30
4.5. Quantificação de biomassa.....	30
4.6. Biossorção de Cádmió e Zinco em soluções aquosas	30
4.7. Análise de Cádmió e Zinco adsorvidos nas células.....	31
4.8. Análise Estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1. Curva de Crescimento dos microrganismos.....	32
5.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	34

5.3. Crescimento da bactéria em meio aquoso com metal.....	40
5.4. Biomassa microbiana em estresse ao metal.....	43
5.5. Quantificação de metal o sobrenadante.....	44
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A preocupação mundial com os efeitos nocivos do uso indiscriminado de produtos químicos tóxicos e com o seu indevido descarte no ambiente vem crescendo, resultando na criação de diversas normas, estabelecidas em Leis e Decretos, que visam controlar a emissão de resíduos na natureza como a Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/2010), Política Nacional de Saneamento Básico (Lei 11.445/2007) e Leis de Crimes Ambientais Lei 9.605/1998 (BRASIL, 1998, 2007, 2010) Especificamente para metais pesados, as principais fontes de emissão são, dentre outros, as atividades metalúrgicas (CHAQUI et al., 1997), gases liberados pela queima de combustíveis fósseis (GIMENO-GARCÍA; ANDREU; BOLUDA, 1996), fabricação e descarte de baterias (PRASAD; ANDERSON; STEWART, 1995), aplicação de fertilizantes que contenham impurezas, e uso de pesticidas (GALLI; SCHUEPP; BRUNOLD, 1996). De acordo com Volesky (2001), os metais que mais representam um risco ambiental são, em ordem decrescente de toxicidade: cádmio, chumbo, mercúrio, cromo, cobalto, cobre, níquel, zinco e alumínio. Os três primeiros são os mais prejudiciais tanto ao homem quanto ao meio ambiente; enquanto cobre, cromo, zinco e níquel afetam os humanos por contato direto posto que são muito utilizados na fabricação de diversos acessórios.

A exploração e o uso de metais desempenham um papel crucial na sociedade moderna, impulsionando a inovação tecnológica e o desenvolvimento industrial. No entanto, essa dependência dos metais não vem sem custos significativos para o meio ambiente. A extração, processamento e descarte de metais geram uma série de problemas ambientais que ameaçam ecossistemas, recursos hídricos e a saúde humana. Desde a degradação do solo até a poluição do ar e da água, os impactos ambientais associados aos metais são uma preocupação crescente em todo o mundo. Além disso, a produção, o descarte e a reciclagem inadequados de produtos contendo metais contribuem para a poluição e a escassez de recursos naturais. No entanto, é importante destacar a importância de buscar soluções sustentáveis para mitigar esses impactos ambientais visando preservar o planeta e os recursos naturais para a atual e futuras gerações (GALVÃO, 2022).

Esses elementos químicos metálicos têm uma densidade relativamente alta e são caracterizados por suas propriedades tóxicas quando em concentrações elevadas no ambiente. Exemplos comuns de metais pesados incluem o mercúrio, chumbo, cádmio, cromo, arsênio e outros. Esses metais são amplamente utilizados na indústria, na agricultura e em várias aplicações tecnológicas, mas a sua liberação descontrolada no meio ambiente pode causar sérios

problemas. Os metais pesados são conhecidos por sua persistência no ambiente e pela capacidade de se acumularem em organismos vivos, levando a efeitos adversos na saúde humana e nos ecossistemas. As fontes de contaminação por metais pesados incluem a mineração, a indústria de manufatura, a queima de combustíveis fósseis, entre outras atividades humanas. Portanto, a gestão adequada e a redução das emissões de metais pesados são questões críticas para a preservação do meio ambiente e da saúde pública. A contaminação por metais pesados é um tópico de grande importância para o estudo da ecologia, toxicologia, química ambiental e a saúde pública, e medidas rigorosas são necessárias para minimizar seus impactos negativos (GALVÃO, 2022).

As plantas que crescem em locais contaminados por metais abrigam um grupo diversificado de microrganismos, que são capazes de tolerar alta concentração de metais além disso proporcionam uma série de benefícios às plantas (IDRIS et al., 2004; ZAREI et al., 2008, 2010). Entre os microrganismos envolvidos na fitorremediação, as bactérias da rizosfera podem melhorar diretamente o processo de remediação, alterando a biodisponibilidade do metal através da alteração do pH da água/solo, da liberação de quelantes e de reações de oxidação/redução (MA et al., 2011; RAJKUMAR et al., 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metais pesados

Os metais são um grupo particular de elementos que diferentemente dos poluentes orgânicos, não podem ser degradados por processos biológicos (MUHAMMAD et al., 2009). Neste sentido, o excesso de metais é prejudicial aos ecossistemas aquáticos, pois ao se acumularem no fundo do sedimento, começam a subir na cadeia alimentar, geralmente bioacumulando em níveis tróficos mais altos e podendo causar distúrbios crônicos e agudos em humanos e animais (GALL; BOYD; RAJAKARUNA, 2015). Mas vale lembrar que os metais nem sempre são tóxicos para os seres vivos. Alguns deles, por exemplo, Ni, Fe, Cu, Zn e Cr, quando em baixas concentrações, atuam como micronutrientes essenciais e cofatores de muitas enzimas. Por outro lado, outros como, Hg, Ag e Cd não possuem função biológica conhecida e mesmo em baixas concentrações são letais para plantas, microrganismos e seres humanos (KHAN et al., 2009).

A preocupação mundial com as questões ambientais aumentou consideravelmente, devido as contaminações crônica e aguda por metais geradas em áreas sujeitas à exploração de minérios, processos e produtos industriais, aplicação agrícola (MISHRA et al., 2019) e o risco iminente de acidentes ambientais, tais como, rompimento de barragens de rejeitos (THOMPSON et al., 2020). Visto essas situações e a falta de saneamento básico recorrente (DUBE et al., 2020), é necessário promover a inovação em tecnologias de descontaminação para poder remediar ou mitigar locais poluídos e promover a proteção dos ecossistemas, usando estratégias eficientes, ecológicas e baratas (ROYCHOWDHURY; DATTA; SARKAR, 2018).

Águas e solos podem ser contaminados por alta concentração de metaloides e metais vestigiais através de diversas fontes como: atividades industriais, fertilizantes e pesticidas, tintas, irrigação, derramamento petroquímico, lodo de esgoto, entre outros (HAIDER et al., 2021).

O termo metal traço é utilizado para determinar qualquer substância química metálica que tenha alta densidade e toxidez, mesmo em baixas concentrações (ZULFIQAR et al., 2019).

Os metais traços incluem elementos como alumínio (Al), arsênio (As), berílio (Be), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), níquel (Ni), e zinco (Zn) (KARIMPOUR et al., 2018).

A contaminação por metais traz passivos ao meio ambiente, prejudicando todos ecossistemas e também a saúde humana, pela ingestão de alimentos contaminados, contato com

corpos hídricos, consumo de água, redução da qualidade de alimentos redução de terras agricultáveis e conseqüentemente aumento da insegurança alimentar (HASSAN et al., 2019; ZULFIQAR et al., 2019) (RASUL et al., 2021).

2.1.1. Cádmio

A poluição do Cd nas águas subterrâneas e no solo é observada em todo o mundo (CHELLAIAH, 2018). O cádmio é extremamente biopersistente, mas tem efeitos toxicológicos e permanece residente por muitos anos após ser consumido pelos organismos (WEGGLER et al., 2004). A entrada de Cd antropogênico nas águas subterrâneas e no solo ocorre através da indústria metalúrgica, tráfego, aterros sanitários, mineração, incidentes, emissões de combustão e lodos de esgoto (BIGALKE et al., 2017). Da mesma forma, a utilização de fertilizantes fosfatados sintéticos que contêm Cd como impureza é uma causa comum para a elevação da concentração de Cd nas águas subterrâneas e no solo (KUBIER; PICHLER, 2019).

O cádmio é um componente de produtos refinados de petróleo como impureza (BUEKERS, 2007). Tem potencial para ser transferido para a cadeia alimentar e pode ser tóxico para a biota (HAIDER et al., 2021). As fontes de cádmio para transferência podem ser de caráter difuso ou local. Fontes locais, ou seja, instalações industriais, minas ou depósitos de minas descartados (CLOQUET et al., 2006) e de caráter difuso, ou seja, o reuso de águas residuais, as atividades atmosféricas e as atividades agrícolas são as principais fontes de distribuição de Cd no solo e no meio ambiente (KNAPPE et al., 2008). Globalmente, aterros sanitários, baterias de Cd-Ni e resíduos sólidos urbanos são as principais fontes de poluição por Cd (KHAN et al., 2017). O uso mais importante do Cd é em baterias de Cd-Ni, que são conhecidas por seu alto rendimento, baixa manutenção, longa vida útil e alta tolerância ao estresse elétrico e físico (WUANA; OKIEIMEN, 2011).

Os mecanismos envolvidos na absorção de Cd pelas raízes das plantas geralmente compreendem a rivalidade nos locais de absorção entre o Cd e outros minerais nutrientes com características químicas semelhantes (HASAN et al., 2019). O cádmio em minerais substitui o íon cálcio (Ca^{2+}) devido a ter carga idêntica e raio iônico e comportamento químico semelhantes (KUBIER; PICHLER, 2019). Pesquisas mostram que a concentração de Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^{2+} diminuiu em pepino (*Cucumis sativus*), milho (*Zea Mays*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e alface (*Lactuca sativa*) devido aos altos níveis de Cd no solo (NAZAR et al., 2012). Nas raízes de alface, houve relação antagônica entre Zn e Cd e sua absorção ativa (TRAN; POPOVA, 2013). Da mesma forma, outros minerais nutrientes, como o nitrato, não possuem características

químicas idênticas às do Cd, mas são afetados pela sua existência no solo (KUBIER; PICHLER, 2019). Inicialmente, o Cd entra nas raízes das plantas e danifica o sistema radicular e a morfologia da planta (HASAN et al., 2007). A absorção de cádmio através da membrana plasmática das células radiculares é regulada pela diferença de potencial eletroquímico entre a atividade do Cd no citosol e nos apoplastos da raiz (BENAVIDES et al., 2005).

2.1.2. Cobre

Diferentemente do Cádmio, o Cobre é um elemento essencial para os seres vivos (FESTA; THIELE, 2011). A principal fonte natural de Cu é o solo, que por sua vez varia de acordo com o material de origem. Solos sedimentares tendem a ter concentrações médias de Cu de aproximadamente 2 mg.kg^{-1} , enquanto que solos de origem basáltica possuem médias naturais em torno de 150 mg.kg^{-1} (HUGEN et al., 2013; OLIVEIRA, COSTA, 2004). No Brasil, concentrações de Cu total no solo de até 60 mg.kg^{-1} são considerados permitidos, sem a necessidade de intervenção, de acordo com os critérios e valores orientados para a qualidade de solos brasileiros (BRASIL, 2009).

Em âmbito global, uma das situações com maior ocorrência de contaminação com Cu são as áreas com o cultivo de frutíferas, onde ocorre a aplicação de fungicidas que contem Cu na sua composição podendo atingir o lençol freático ou os corpos hídricos por lixiviação. O acúmulo de Cu nessas áreas se deve ao longo período de uso, uma vez que se tem registro do uso do Cu no controle de doenças desde 1850 (FISHEL, 2010).

O cobre é um oligoelemento (minerais necessários em quantidades de 1 a 100 mg/dia por adultos) encontrado em altas concentrações no cérebro, fígado e rins. No entanto, devido ao seu tamanho, os ossos e os músculos contêm mais da metade do cobre do corpo (COLLINS; KLEVAY, 2011). O cobre está ligado à ceruloplasmina no fígado, que transporta o cobre do fígado para os tecidos periféricos. Aproximadamente 50% do cobre é excretado na bile, enquanto a metade restante é excretada por outras secreções gastrointestinais. Como tal, o trato gastrointestinal é o principal regulador da homeostase do cobre (MASON, 1979).

Embora o cobre seja necessário como um importante cofator catalítico na química redox para muitas proteínas, quando presentes em excesso, os íons de cobre livres podem causar danos aos componentes celulares. Um delicado equilíbrio entre a captação e o efluxo de íons de cobre determina a quantidade de cobre celular (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003). O excesso de cobre induz não apenas estresse oxidativo, mas também danos ao DNA e redução da proliferação celular. A ingestão de mais de 1 g de sulfato de cobre resulta em sintomas de

toxicidade. A toxicose por cobre pode ser classificada como primária quando resulta de um defeito metabólico hereditário e secundária quando resulta de ingestão elevada ou aumento de absorção ou excreção reduzida devido a processos patológicos subjacentes (OE et al., 2016). Copperiedus (toxicidade do cobre) pode ser causado pelo consumo de alimentos ácidos cozidos em panelas de cobre não revestidas ou pela exposição ao excesso de cobre na água potável ou outras fontes ambientais (FUENTEALBA; ABURTO, 2003).

Muitos casos de toxicidade do cobre são frequentemente o resultado do consumo acidental ou da instalação de fontes de água contaminadas, cremes tópicos contendo sal de cobre para tratamentos de queimaduras, alimentos ácidos cozidos em panelas de cobre não revestidas ou tentativas de suicídio (a dose letal de cobre ingerido é 10 a 20 g). O sulfato de cobre é um produto químico facilmente acessível em muitos países e até vendido sem receita. É comumente usado na agricultura como pesticida, na indústria do couro e na fabricação de cola caseira. A queima de sulfato de cobre em casas e lojas (como amuleto de boa sorte e para algumas atividades religiosas) é uma prática comum entre budistas e hindus. A cor azul brilhante da forma hidratada dos cristais de sulfato de cobre é atraente para as crianças e é um motivo frequente de envenenamento inadvertido (GAMAKARANAGE et al., 2011). A doença de Wilson é uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo acúmulo excessivo de cobre no organismo humano e é causada por uma variante no gene que codifica uma enzima cobre-ATPase (STURNIOLO et al., 1999).

A incidência de envenenamento por cobre varia muito de acordo com a região, mas é incomum nos países ocidentais; é mais comum nos países do sul da Ásia, onde é mais prevalente nas populações rurais. Os riscos de toxicidade do cobre são maiores para recém-nascidos e crianças, pois têm um sistema de excreção biliar imaturo e maior absorção intestinal. A sobrecarga de cobre também é uma característica da cirrose infantil indiana, da cirrose infantil tirolesa endêmica e da intoxicação idiopática por cobre (CORONADO et al., 2005).

2.1.3. Zinco

Outro elemento que atua como micronutriente nos seres vivos é o Zinco, trata-se de um metal essencial, a sua deficiência gera consequências negativas a saúde, porém, níveis elevados de exposição também podem ser prejudiciais, visto que pode ocorrer toxicidade. É comum ele estar presente nos alimentos, na água e no ar, além da exposição ocupacional, que ocorre através de poeiras e fumos de zinco metálico provenientes da mineração e fundição (KLAASSEN et al., 2012). Ele pode ser encontrado como sulfeto de zinco, óxido de zinco,

carbonato de zinco, cloreto de zinco, acetato de zinco entre outras formas na natureza. Como agente poluidor, o zinco é introduzido no ambiente por fontes antrópicas, como indústrias de óxido de zinco, tintas, farmacêuticas, fungicidas, pilhas e baterias (BRAVO, 2018).

O zinco é um metal de transição geralmente presente na natureza em seu estado divalente. É considerado um mineral essencial porque é necessário para a produção de centenas de enzimas em todo o corpo. A ingestão diária recomendada de zinco difere dependendo da população de pacientes, e a concentração normal de zinco no soro é de 109 a 130 microgramas/decilitro. Atua como cofator nas reações enzimáticas envolvidas na expressão do DNA, na estabilização da membrana, no metabolismo da vitamina A e nos sistemas gustativo e olfativo (TERRIN et al., 2015). Este vasto número de funções também contribui para a importância do zinco durante o crescimento e desenvolvimento fetal. Além disso, uma característica da função do zinco no organismo é a sua relação inversa com os níveis de cobre, e frequentemente faz parte das preparações farmacêuticas utilizadas no tratamento da doença de Wilson (CAMARATA; ALA; SCHILSKY, 2019) A toxicidade crônica do zinco se manifesta principalmente como deficiência de cobre (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001).

Como existem muitas fontes de zinco no meio ambiente, a exposição e a toxicidade não são incomuns. Há relatos de casos de toxicidade como resultado de inalação de fontes ocupacionais em ambiente de trabalho, uso excessivo de suplementos dietéticos, uso de creme para próteses dentárias (GREENBERG; VEARRIER, 2015).

A ingestão diária recomendada de zinco para adultos é de 15 mg. Os sintomas geralmente não se tornam evidentes até que a ingestão exceda aproximadamente 1 a 2 g de zinco (BARCELOUX, 1999a). Exposições tóxicas ocorreram pelas vias gastrointestinal, dérmica, respiratória e parenteral. A toxicidade inalatória pode variar em gravidade dependendo do composto específico envolvido, bem como da duração da exposição. Por exemplo, bombas de fumaça contendo cloreto de zinco podem causar dor no peito, irritação das vias aéreas e até mesmo um quadro clínico semelhante ao da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), com fibrose pulmonar como sequelas de longo prazo (MURRAY et al., 2018). Por outro lado, a inalação de óxido de zinco pode levar a uma entidade conhecida como "febre dos vapores metálicos", que geralmente ocorre secundária à exposição ocupacional. Nestes casos, os trabalhadores que sofrem exposição aos fumos através da soldadura, produção de ligas e soldadura de metal podem apresentar sintomas semelhantes aos da gripe, além de tosse e dispneia, presumivelmente devido aos efeitos diretos do zinco no epitélio pulmonar (GREENBERG; VEARRIER, 2015).

A maioria das ingestões agudas de zinco apresenta apenas sintomas gastrointestinais, tornando o diagnóstico extremamente difícil quando não há histórico relatado de exposição.

Existe uma probabilidade muito baixa de a toxicidade do zinco ser fatal; entretanto, o prognóstico depende muito da rapidez com que o paciente recebe o tratamento. Grandes ingestões intencionais têm maior probabilidade de causar toxicidade significativa (PLUM; RINK; HAASE, 2010).

As complicações da toxicidade do zinco incluem dispneia recorrente ou inflamação das vias aéreas após exposição por inalação ou efeitos gastrointestinais com desidratação e potencial sangramento gastrointestinal após ingestões. Os efeitos adicionais incluem letargia, anemia e tontura (PLUM; RINK; HAASE, 2010). Exposições crônicas podem causar efeitos na medula óssea e polineuropatia devido à deficiência concomitante de cobre. A toxicidade do zinco também prejudica o metabolismo do cobre, causando anemia. O consumo excessivo de zinco por um longo período de tempo aumenta o risco de câncer de próstata e de mortalidade relacionada ao câncer de próstata (GUMULEC et al., 2011).

2.1.4. Níquel

O níquel consumido representa cerca de 65% empregados na fabricação de aço inoxidável austenítico (ligas de aço inoxidável austenítico recebem entre 8 e 10,5% de níquel em sua composição (ABINOX, 2019) e outros 12% em superligas de níquel. Os 23% restantes são repartidos na produção de outras ligas metálicas, baterias recarregáveis, reações de catálise, cunhagens de moedas, revestimentos metálicos e fundição. O níquel assim como qualquer outro metal, pode ser encontrado em rochas que o contenham (ICZ, 2018).

O níquel carbonil é a causa da toxicidade aguda observada em exposições ocupacionais. Muitas vezes descrito como um líquido volátil incolor a amarelo, pode ter um odor de mofo ou fuligem, que é difícil de detectar em concentrações perigosas. O níquel carbonil encontra aplicações significativas em ambientes industriais como catalisador em reações de carbonilação envolvendo plástico, petróleo ou revestimento de aço (BARCELOUX, 1999b). O níquel é um conhecido culpado pela dermatite de contato e é encontrado em vários itens de uso diário, como produtos domésticos, roupas, cosméticos, equipamentos médicos e joias. Quando o suor interage com itens que contêm níquel, sais solúveis de níquel são liberados e podem ser absorvidos pela pele, levando a uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada. Uma vez sensibilizada, a hipersensibilidade ao níquel pode persistir indefinidamente (BARCELOUX, 1999b). Embora o contato com o níquel possa ocorrer através da dieta e de fontes naturais,

como solo e água, a exposição no local de trabalho é o local predominante para toxicidade significativa. O uso ocupacional pode ser observado no próprio refino do níquel, seja na fundição ou na recuperação. As indústrias incluem fabricantes de baterias, aço inoxidável, soldadores e refino de petróleo (SUNDERMAN, 1989).

A toxicidade do níquel pode ocorrer através de várias vias de exposição, incluindo inalação, ingestão, injeção e absorção dérmica. Os sintomas podem ocorrer imediatamente após a exposição ou ser tardios. A inalação pode causar disfunção respiratória, neurológica e hepática. Os achados pulmonares incluem pneumonite e lesão pulmonar aguda. Outros achados incluem edema cerebral, miocardite, alteração do estado mental e convulsões. Num relato de caso, a inalação de nanopartículas de níquel levou à síndrome do desconforto respiratório agudo, onde as nanopartículas foram encontradas em macrófagos do tecido pulmonar (BEGUM et al., 2022).

A ingestão de sais de níquel manifestará toxicidade aguda. Os sintomas gastrointestinais são proeminentes, incluindo náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal. Acredita-se que isso seja causado pela peroxidação lipídica, levando à ruptura da membrana celular com influxo de cálcio e morte celular (SUNDERMAN, 1989). A toxicidade parenteral pode ocorrer na hemodiálise se a água armazenada for mantida em um recipiente de níquel. Seus sintomas são semelhantes aos da toxicidade do níquel carbonil. A absorção dérmica pode levar à sensibilidade cutânea tipo IV, causando prurido e pápulas eritematosas. A dermatite tem duas fases; primeiro, a pele fica sensibilizada quando inicialmente exposta ao níquel e, na fase dois, a pele reexposta faz com que a alergia se manifeste como erupção cutânea (AHLSTRÖM et al., 2019).

A exposição pode vir de meios ambientais, incluindo solo, poeira vulcânica, poluição industrial, alimentos e água. A água doméstica pode conter níquel devido à corrosão dos tubos. O níquel não é um elemento essencial, mas é encontrado em vários alimentos. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA, a ingestão oral varia de 100 a 300 mcg por dia. O consumo diário de níquel oral é de cerca de 20 mcg e a inalação inclui 0,4 mcg. A absorção ocorre através da pele, trato gastrointestinal e pulmões. Nem todo níquel inalado é absorvido sistemicamente; pode ser tossido ou permanecer no trato respiratório, pois a solubilidade depende do composto de níquel. O níquel carbonil é altamente solúvel e facilmente absorvido. Os sais de níquel têm menor absorção e podem permanecer no trato gastrointestinal. A sua absorção também é retardada com a presença de alimentos no estômago (BARCELOUX, 1999b)

A absorção dérmica depende da potência e da integridade da pele (BASKETTER, 2021). O níquel atravessa a placenta e também pode ser encontrado em órgãos sólidos como coração, pulmões e fígado (RENU et al., 2021; REZUKE; KNIGHT; SUNDERMAN, 1987). A duração da exposição e a solubilidade do níquel afetam a deposição de níquel em áreas como o trato respiratório (TORJUSSEN; SOLBERG; HØGETVEIT, 1979). O níquel no sangue está principalmente ligado à albumina, com a presença da proteína transportadora níqueloplasmina. A distribuição do níquel no corpo varia dependendo da via de exposição. Após a exposição ao níquel carbonil, as concentrações mais altas de níquel são normalmente encontradas nos pulmões, cérebro, rins, fígado e glândulas supra-renais. Este padrão de distribuição destaca a afinidade do níquel por certos órgãos e tecidos e enfatiza os riscos potenciais à saúde associados à exposição a compostos de níquel (BARCELOUX, 1999b). Não se sabe que o níquel apresenta toxicidade cumulativa, o que significa que não tende a se acumular no corpo ao longo do tempo. Em vez disso, é eliminado principalmente pela urina e fezes. A eliminação do níquel segue uma cinética de primeira ordem, o que significa que a taxa de eliminação é proporcional à concentração de níquel no corpo (BEGUM et al., 2022).

2.2. Biorremediação

Todos os dias, uma quantidade substancial de águas residuais é lançada no meio ambiente por diversas fontes industriais e domésticas. Mesmo com uma indústria mais cuidadosa, com métodos e protocolos apropriados de tratamento pós-utilização implementados, a produção de resíduos não pode ser totalmente anulada ou evitada. Com o crescimento contínuo da população, a poluição da água é inevitável. Estratégias eficazes de tratamento e reutilização de águas residuais são essenciais e críticas para um ambiente sustentável. Os processos de tratamento biológico têm vantagens inerentes sobre tratamentos e processos químicos agressivos. Com técnicas e design adequados, a biodegradação de poluentes e o tratamento biológico de águas residuais provaram ser bem-sucedidos, eficientes e econômicos (SINHA et al., 2019).

O termo biorremediação é utilizado para descrever o processo de utilização de microrganismos para degradar ou remover poluentes do ambiente (VOLESKY, 2001). A biorremediação também pode ser definida como qualquer processo que utiliza microrganismos, plantas ou suas enzimas para retornar ao ambiente natural degradado por contaminantes à sua condição original (CHANEY et al., 2005; HUANG et al., 2004; SUSARLA; MEDINA; MCCUTCHEON, 2002). A biorremediação de metais pesados envolve a remoção de metais

pesados das águas residuais e do solo através de vias metabólicas ou físico-químicas. Trata-se de uma tecnologia *ecofriendly*, é rentável, esteticamente agradável, potenciadora da diversidade (CHANEY et al., 2005; HUANG et al., 2004; SUSARLA; MEDINA; MCCUTCHEON, 2002) e, mais importante, é capaz de reter o estado de fertilidade do solo mesmo após a remoção de metais pesados (KIRKHAM, 2006). Dos diversos métodos utilizados no tratamento de efluentes industriais, o biotratamento oferece uma alternativa mais barata e ecologicamente correta para a degradação biológica de efluentes industriais. A biorremediação são tecnologias de controle de poluição que utilizam sistemas biológicos para catalisar a biodegradação ou transformação de vários produtos químicos tóxicos em formas menos prejudiciais. Este processo natural de biorremediação inclui a bioengenharia, as capacidades naturais dos microrganismos para limpar o meio ambiente se apresenta como uma alternativa eficaz aos métodos convencionais de remediação (SARANRAJ; STELLA, 2012).

Em comparação com os processos de tratamento físico e químico, a biorremediação utiliza microrganismos (incluindo fungos, bactérias e algas) como células livres, biofilmes ou agregados (ou flocos de lodo ativado) e desempenha um papel importante no fornecimento de uma solução mais verde, econômica e sustentável para o tratamento de água, ar e solo contaminados (DAS; ADHOLEYA, 2015). Portanto, métodos de tratamento biológico têm sido amplamente utilizados para tratar contaminantes orgânicos e inorgânicos de águas residuais. Além da aplicação direta convencional de microrganismos, em que as células microbianas são livremente expostas aos resíduos contaminados no solo, no ar ou na água - uma abordagem alternativa é onde as células microbianas são cultivadas e imobilizadas (ou encapsuladas) em uma matriz de gel polimérico permeável (DAS; ADHOLEYA, 2015), e os micróbios imobilizados dentro da matriz do gel são expostos indiretamente ao meio contaminado.

Historicamente, os microrganismos isolados de fontes diversas foram utilizados pela primeira vez para a produção *in situ* de enzimas. Em 1969, enzimas imobilizadas (aminoacilase) foram usadas pela primeira vez industrialmente para a produção contínua de L-aminoácidos a partir de acil-D L -aminoácidos (TOSA et al., 1979). Gradualmente, as enzimas imobilizadas foram substituídas por bactérias viáveis imobilizadas para a produção de enzimas *in situ* e isso foi vantajoso devido à eliminação de etapas dispendiosas de separação e purificação de enzimas, aumento da meia-vida e atividade de enzimas bacterianas intactas e aumento na taxa de regeneração. de bactérias imobilizadas - levando a um benefício adicional de sua possível reutilização (WINNICKI; SZETELA; WISNIEWSKI, 1982). Dentro de algumas décadas, esse avanço atraiu a atenção e vários grupos de pesquisa adaptaram a tecnologia imobilizando bactérias para o tratamento de contaminantes orgânicos (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM,

1999), como degradação de fenol (BETTMANN; REHM, 1984), pentaclorofenol, 4-cloro- 2-nitrofenol e 4-clorofenol (BEUNINK; REHM, 1990). Também existem outras diversas aplicações de células bacterianas imobilizadas, como no tratamento de águas residuais (AN et al., 2008), o que levou a uma investigação aprimorada sobre aspectos mais fundamentais dos sistemas celulares imobilizados, como os seus efeitos no consórcio bacteriano (BAZOT; LEBEAU, 2009) no caso de sistemas multiespécies.

O uso de células livres para remediação tem algumas desvantagens, incluindo baixa concentração de biomassa em um determinado local/tempo, fácil eliminação de micróbios durante a aplicação e suscetibilidade a estressores externos. O emprego de células bacterianas imobilizadas ou encapsuladas tem algumas vantagens específicas sobre as formas livres (espécie única ou consórcio) para biorremediação, por exemplo, separação eficiente de biomassa da água tratada, controle espaço-temporal eficaz de biomassa dentro do meio contaminado, maior capacidade de sobrevivência, estabilidade e reutilização sem perda de atividade (MARTINS et al., 2013). Além da biorremediação, as células imobilizadas também têm sido amplamente utilizadas em outras inúmeras aplicações, incluindo indústria farmacêutica, engenharia química/de processos, indústria alimentícia e aplicações de biossensores (MARTINS et al., 2013). Os avanços nesta área, especialmente na última década, destacam a promessa desta tecnologia emergente para diversas aplicações. Outra maneira natural pela qual os micróbios são imobilizados na natureza é através da formação de biofilmes microbianos (FLEMMING et al., 2016; FLEMMING; WUERTZ, 2019) que imobilizam micróbios em superfícies dentro de uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS) auto secretada (WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999). O papel dos biofilmes no setor de água/remediação também testemunhou um crescimento exponencial de pesquisas nos últimos tempos e impactos do biofilme na infraestrutura hídrica (FLEMMING et al., 2016), bem como biofiltros baseados em biofilme para água potável e remediação de águas residuais (KIRISITS; EMELKO; PINTO, 2019; LAUDERDALE et al., 2012; MCKIE et al., 2019) estão sendo mais amplamente pesquisados.

Ao longo da evolução, as bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência a estresses, pelos quais podem imobilizar, mobilizar ou transformar metais, reduzindo sua toxicidade para tolerar a captação de íons metálicos. Esses mecanismos incluem sequestro físico, exclusão, complexação e desintoxicação de metais (RAJKUMAR et al., 2010). O acúmulo desses íons, incluindo a bioissorção e a bioacumulação intracelular, é frequentemente um dos mecanismos de resistência a metais encontrado em microrganismos (SRINATH, 2002). A bioissorção é um processo rápido, que envolve adsorção física, troca iônica e complexação na

superfície celular. Já a bioacumulação que envolve o transporte de metais para as células bacterianas por um processo ativo dependente do metabolismo, ocorre mais lentamente (GADD, 1990; SRINATH et al., 2002). É sabido que muitas bactérias possuem transportadores de efluxo que excretam metais tóxicos ou metais que estão presentes em uma concentração muito alta fora da célula por meio de bombas. Esses tipos de transportadores são caracterizados por uma alta afinidade pelo substrato e, portanto, são capazes de reduzir a carga de metal no citosol (HAFFERBURG; KOTHE, 2007).

Outro processo de biorremediação é a fitorremediação, que é o processo de tratamento de áreas contaminadas mediado por espécies vegetais que vão extrair, sequestrar e desintoxicar poluentes (REZANIA et al., 2016). As macrófitas aquáticas, por exemplo, são amplamente investigadas e utilizadas no tratamento de águas superficiais (BHATIA; GOYAL, 2014). As espécies de macrófitas aquáticas adequadas para fitorremediação de metais são altamente tolerantes ao estresse por esses agentes. Além disso, elas têm um crescimento rápido, possuem biomassa elevada e podem acumular altas concentrações de metais em seus tecidos (LIU et al., 2016).

Uma maneira de tornar o processo de fitorremediação realizado por plantas aquáticas ainda mais eficaz para descontaminar ambientes com elevadas concentrações de metais é utilizar microrganismos associados com essas plantas (AAFI et al., 2012; YANG et al., 2012). No geral, as atividades microbianas melhoram a eficácia dos processos de fitorremediação de duas maneiras complementares: (i) promovendo diretamente a fitorremediação, na qual os microrganismos associados a planta melhoram a translocação de metais (facilitando a fitoextração) ou reduzem a mobilidade e disponibilidade de metais na rizosfera (fitoestabilização), e (ii) indiretamente, na qual os microrganismos conferem à planta tolerância ao metal e/ou aumentam a produção de biomassa vegetal, a fim de remover ou deter os contaminantes (RAJKUMAR et al., 2012).

2.3. Microrganismos Resistentes a metais

Microrganismos resistentes a metais associados a plantas foram relatados com potencial para estimular a aquisição de nutrientes pelo vegetal, reduzir a toxicidade do contaminante, mobilizar/imobilizar metais, reciclar nutrientes, melhorar a saúde das plantas e controlar patógenos vegetais (AAFI et al., 2012; WUANA; OKIEIMEN, 2011). Por sua vez, as plantas fornecem nutrientes de origem radicular, incluindo aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos etc., que podem ser metabolizados para fornecer o crescimento microbiano (DAKORA;

PHILLIPS, 2002). Como o sucesso do processo de fitorremediação também depende da capacidade da planta de suportar a toxicidade do metal e produzir biomassa adequada, os microrganismos promotores de crescimento vegetal têm sido estudados (AAFI et al., 2012; KUFFNER et al., 2010).

Estudos recentes investigando o papel dos microrganismos associados a plantas na proteção contra o estresse por metais, demonstraram que a colonização bacteriana geralmente resulta no aumento da captação de nutrientes e no aumento da biomassa vegetal (DIMKPA et al., 2008; MA, 2011).

Outro benefício da associação dos microrganismos com as plantas é a capacidade que algumas bactérias têm de fixar nitrogênio atmosférico. As bactérias diazotróficas possuem genes *nif*, que codificam enzimas atuantes no processo de fixação biológica de nitrogênio (N_2), convertendo em amônia (NH_3) e amônio (NH_4^+) através da ação da nitrogenase, o que vai beneficiar todos os demais seres vivos (GLICK, 2012).

Além de melhorar a absorção de nutrientes e o crescimento da planta, os microrganismos associados a vegetais aliviam a toxicidade dos metais tóxicos, reduzindo a produção de etileno por estresse. Em geral, o estresse por metais induz a produção endógena de etileno nas plantas, o que pode prejudicar o crescimento das raízes e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal. Bactérias benéficas comumente encontradas na rizosfera podem conter a enzima ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) desaminase, que reduz a produção de etileno por estresse nas plantas através da degradação do precursor de etileno, ACC em α cetobutirato e amônia, possibilitando o crescimento das plantas sob estresse, como é desejado em um processo de fitorremediação (GLICK et al., 2007).

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

Imobilização de uma cultura pura (cepa única) ou de um consórcio microbiano formulado em laboratório é mais fácil e mais eficiente para uma aplicação específica em comparação com a imobilização de uma população microbiana em crescimento natural obtida a partir de um ambiente contaminado complexo que pode consistir em numerosas espécies microbianas conhecidas e desconhecidas (patogênicas/não patogênicas/tolerantes/resistentes

entre si). Com alto grau de heterogeneidade, a ação sinérgica/antagônica na comunidade microbiana em crescimento natural, seus padrões de crescimento interdependentes e comportamento metabólico extenso provavelmente tornam um desafio atingir objetivos específicos de remediação (MEHROTRA et al., 2019).

2.4. *Serratia marcescens*

O gênero *Serratia* faz parte da família *Enterobacteriaceae*, essa família abrange um grupo de bactérias gram-negativas relacionadas tanto em seu fenotípico quanto em suas sequências de DNA. Elas habitam diferentes organismos e ambientes que variam desde insetos, mamíferos, pacientes humanos hospitalizados até água, solos e plantas, muitas das vezes são relacionadas como patógenas. A maioria dos isolados de *Serratia* foi encontrada em pacientes hospitalizados e em águas, sendo a espécie *Serratia marcescens* a mais comum em ambos locais (GRIMONT; GRIMONT, 2006). Diversos estudos vem mostrando o potencial dessas bactérias no processo de biorremediação de metais como níquel, cromo, cobre, entre outros metais (ANDREAZZA et al., 2012; BARBOZA et al., 2017; CRISTANI et al., 2012; KANNAN; RAMTEKE, 2002; ZAKERI et al., 2010; ZHANG; LI, 2011). A *Serratia* também produz moléculas importantes como as pirazinas usadas nas indústrias alimentícias para melhorar o sabor de produtos; enzimas como as quitinases que são potencialmente usadas no tratamento de rejeitos contendo quitina produzida pela indústria de embalagens de frutos do mar atuam como agentes de biocontrole contra fungos patogênicos de plantas; e participam da produção de adesivos, curativos e recuperação de metais pesados de águas (GRIMONT; GRIMONT, 2006).

A ampla produção de moléculas por certas espécies de *Serratia* tornam essas bactérias interessantes para serem aplicadas em diferentes processos de biorremediação, (QUEIROZ, 2018). A *Serratia sp.* SVGG16 isolada de solos tropicais foi capaz de produzir compostos surfactantes durante o seu crescimento em meio contendo gasolina misturada com álcool. Os surfactantes por serem moléculas anfipáticas, diminuíram a tensão superficial e interfacial em sistemas aquáticos contaminados com hidrocarbonetos, como a gasolina, melhorando a restauração dessas áreas a partir do aumento da área de superfície para a colonização dos microrganismos, comprovando assim a sua utilização em diversos processos biotecnológicos (CUNHA et al., 2004). E também resistente a metais como Manganês (QUEIROZ, 2018); Outros metais como Arsênio, Níquel e Cromo (BHATTA et al., 2023); Cádmiu, entre muitos outros metais (CHEN et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de resistência de microrganismos isolados da planta aquática *T. domingensis* (Taboa) quanto aos metais Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) e o potencial de extração desses metais em soluções aquosas.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar dentre os organismos isolados aquele com maior resistência aos metais;
- Selecionar dentre os metais aquele que teve melhor crescimento dos microrganismos;
- Analisar o potencial de biorremediação da bactéria ao metal selecionado;

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos utilizados

O grupo de pesquisa em Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual Norte Fluminense - UENF dispõe de uma coleção de microrganismos já isolados da planta aquática *Typha domingensis* conhecida popularmente como Taboa. A coleta desta planta para isolamento microbiano foi realizada na lagoa do Campelo, que fica localizada entre os municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco do Itabapoana (BARROSO, 2018). Após esse isolamento, foram identificados 40 microrganismos os quais o grupo realizou testes de resistência a metais e potencial de promoção do crescimento vegetal já que alguns desses microrganismos já haviam sido estudados com esse potencial (BARROSO, 2018). Então, a partir destes isolados de taboa foram selecionados os microrganismos que têm maior resistência a metais, e realizamos testes utilizando outros metais como Cádmio, Cobre, Níquel e Zinco e utilizando técnicas diferentes para melhor entender o comportamento desses microrganismos.

4.2. Cultivo e manutenção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados nesse trabalho foram cultivados em meio Lurian Bertani (LB) (1% de Peptona de Caseína; 0,5% de Extrato de Levedura; 1% Cloreto de Sódio). Todos os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água destilada e esterilizados a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Para o cultivo, as culturas foram incubadas a 30 °C e 175 rpm por 24h. Para o preparo de culturas estoque, uma colônia isolada foi colocada em um tubo de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada autoclavada, sendo mantida a temperatura ambiente.

4.3. Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM), definida com a menor concentração de uma substância capaz de inibir o crescimento de um organismo (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008), foi utilizada para estimar a resistência das cepas aos metais Cádmio; Cobre; Níquel e Zinco. Para tanto, uma alíquota de 10 µL de cada microrganismo com 0,1 D.O_{600nm} crescido em meio LB líquido foi inoculada em placas de Petri contendo meio de cultura LB com concentrações crescentes de CuCl₂ (60; 180; 300 e 420 ppm); CdCl₂ (150; 300; 600 e 900 ppm); NiCl₂ (150; 300; 600 ppm) e ZnCl₂ (400; 800; 1200) e placas controle sem a adição dos metais. Todas as placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C em estufa bacteriológica e seu diâmetro foi medido diariamente (24h; 48h; 72h; 96h e 120h) com paquímetro Modelo (King Tools 300mm) e calculado a área de crescimento para identificar o tamanho da colônia mm². Os experimentos foram realizados em quintuplicatas e feito o registro fotográfico das placas.

De acordo com a ausência e presença de colônias foi determinada a CIM e ponderado aquele isolado que melhor apresentou resistência aos metais Cd^{+2} ; Cu^{+2} ; Ni^{+2} e Zn^{+2} .

4.4. Curva de Crescimento do Inóculo

Foi preparado um pré-inóculo da bactéria em erlenmayer de 250 mL contendo 50 mL de Meio de cultivo LB, por 24h a 175rpm. Após as 24h, a densidade da cultura foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800) e seu valor ajustado a 0,1 $\text{DO}_{600\text{nm}}$ que corresponde a 10^8 células.mL⁻¹. Para realizar a curva de crescimento das bactérias *S. marcescens*, *E. Asbusiae*; e *R. ornithinolytica*, foram utilizados erlenmayer de 250 mL contendo 50 mL de Meio de cultivo LB sem glicose e outro suplementado com glicose a 1% + inóculo padronizado sob agitação e temperatura de 175rpm e 30 °C, respectivamente, em uma Incubadora Refrigerada com agitação constante (TECNAL TE-242). Foram retiradas alíquotas a cada 2h por um período de 36 horas e a densidade da cultura foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm. O crescimento das cepas determinado através da Absorbância da amostra e os gráficos foram gerados através do Microsoft Excel. O Experimento foi realizado em triplicata.

4.5. Quantificação de biomassa

O valor da biomassa produzida durante o processo de cinética de crescimento do microrganismo foi quantificado através de método direto, em que, o material produzido foi secado para determinação de seu peso (GRISSI, 1984).

Para quantificar a massa seca da bactéria, 20 mL do meio de cultura de cada tratamento foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos e lavado por 3 vezes com água destilada. Em seguida, o material foi colocado para secar em cadinhos limpos e numerados na estufa de circulação de ar durante 24h a 85 °C, os cadinhos foram pesados anteriormente para obter o valor da massa final. Após resfriamento por 20 min em dessecador, os cadinhos foram pesados novamente, os valores descontados do valor inicial e convertidos em concentração celular (mg/L) (GRISI, 1984).

4.6. Bioissorção de Cádmio e Zinco em soluções aquosas

A determinação da bioissorção do Cádmio e Zinco pela bactéria foi realizada através do método de Espectroscopia de Absorção Atômica (EAA) com chama de acetileno em comprimentos de onda específicos para cada metal e calibrado com soluções padrão antes da análise. Foram verificados o efeito do tempo, se ele poderia influenciar de forma positiva na quantidade de metal absorvido, da concentração da biomassa viva, se a quantidade de bactéria também seria um fator relevante para a absorção e da concentração dos metais no meio de cultura, se esses metais poderiam também atrapalhar nas atividades metabólicas da bactéria influenciando de forma negativa o processo (RIBAS; SILVA, 2023).

Esta técnica tem sido amplamente utilizada para determinação e identificação de íons metálicos em diferentes tipos de amostras, tanto sólidas quanto líquidas, por ser considerado um método qualitativo e quantitativo bastante preciso. Outras vantagens deste método são a rapidez, a elevada seletividade e os custos relativamente moderados (MUSTRA, 2009). Os isolados foram cultivados em diferentes concentrações de Cádmio e Zinco (50 e 100 ppm para ambos os metais) durante 36h.

4.7. Análise de Cádmio e Zinco adsorvidos nas células

Para análise de metais adsorvidos foi utilizado a metodologia de Digestão via úmida nitro-perclórica (NP), adaptado de Zasousk e Burau (1977). Após o período de incubação a cada 12h em shaker orbital em temperatura de 30° a 175rpm, o caldo bacteriano foi centrifugado por dez minutos a 10000 rpm, descartado o sobrenadante e realizada duas lavagens do "pellet" em tampão fosfato de sódio (8 mM de Na₂HPO₄.12H₂O; 1,9 mM de NaH₂PO₄.2H₂O; 8 gramas de NaCl; pH 7,3) conforme Moreira et al. (1993) e Pot et al. (1994). A biomassa bacteriana obtida foi pesada e submetida à digestão por via úmida com ácido nítrico e perclórico (2:1), e posteriormente foi determinada a concentração de cada metal no extrato de digestão em espectrofotômetro de absorção atômica. A partir desta determinação, foram calculados a taxa de remoção de metal do meio de cultura (mg. L⁻¹) e o teor do metal na biomassa (mg. L⁻¹). Foi adicionado 3,5 mL de ácido nítrico P.A, a 25 °C, ambiente termotizado à massa celular seca. Após repouso por uma noite, os tubos foram aquecidos em bloco digestor (80 °C a 100 °C) em capela de exaustão por aproximadamente 2h e 30 minutos, visando evaporar o ácido utilizado para digestão. Logo após, foi adicionado a amostra, 0,5 mL de ácido perclórico P.A. e a temperatura foi aumentada de forma gradual até atingir 200 °C e seguindo com a digestão até que todo o ácido fosse dissipado (dissipação de vapores emanados do tubo). Ao final do processo foram adicionados 10 mL de água deionizada às amostras e analisadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica.

4.8. Análise Estatística

Os dados estatísticos obtidos nesse trabalho foram analisados usando o SISVAR[®] e demonstrados como média ± desvio padrão (DP). Todas as médias foram aferidas a partir de experimentos independentes. A média foi analisada por ANOVA ($p \leq 0,05$) seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar diferenças entre os tratamentos e o controle.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Curva de Crescimento dos microrganismos

Antes de realizar os testes de CIM com os metais, foi necessário traçar a curva de crescimento do microrganismo para entender sua dinâmica de crescimento e utilizá-lo no melhor momento do crescimento (Figura 1, 2 e 3), a curva de crescimento de microrganismos apresenta três principais fases. A fase lag corresponde ao período em que o número de células sofre pequenas variações, devido ao fato que as bactérias não se reproduzem imediatamente após a inoculação no meio de cultura. A fase log ou de crescimento exponencial corresponde ao período em que as células iniciam seu processo de divisão atingindo um tempo de geração constante. É o período de maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio preferido para fins industriais. Na fase estacionária, o número de indivíduos que morrem é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável. A fase de morte celular, ou fase de declínio, corresponde ao período em que o número de mortes excede o número de células novas, até existir uma fração ínfima do original e a população desaparece totalmente. Sabendo disso, o tempo escolhido para coletar as células para inoculação foi a fase *midlog*, a fase compreende o meio da fase log ou de crescimento exponencial, corresponde ao período em que as células iniciam seu processo de divisão atingindo um tempo de geração constante (MACEDO NETO; ALENCAR; DIAS, 2009). Essa escolha ocorreu, pois, a fase citada é onde ocorre um intenso crescimento e produção de biomassa microbiana, o microrganismo está adaptado ao meio e com grande atividade metabólica e se multiplicando rapidamente. Foi possível também observar que a glicose aumentou a quantidade de células por mL, isso ocorre porque o microrganismo realiza a fermentação em seu processo metabólico utilizando a glicose como fonte de energia (Figura 1, 2 e 3).

Figura 1 Crescimento da bactéria *S. marcescens* em meio de cultura LB sem glicose e suplementado com glicose 1%

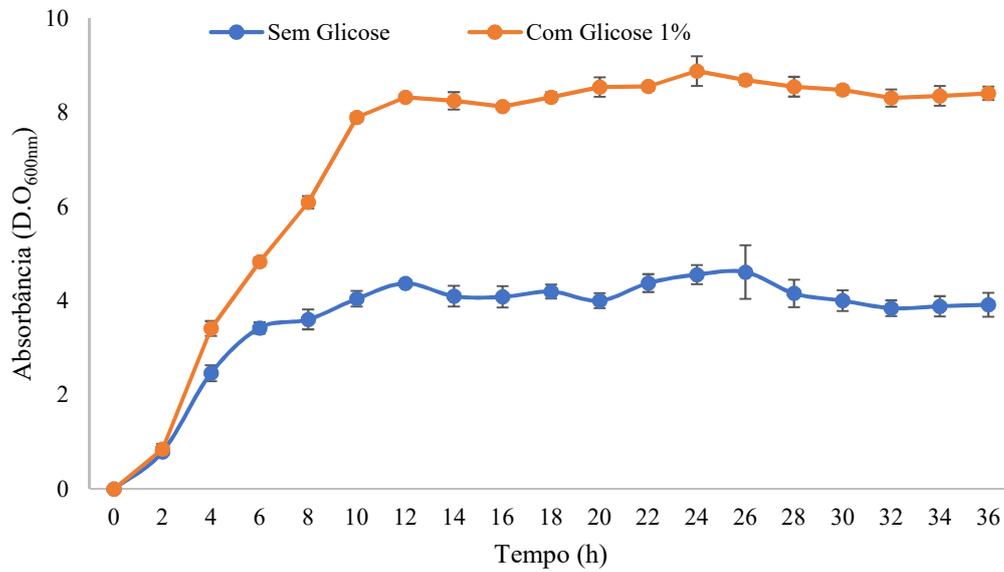


Figura 2 Crescimento da bactéria *R. ornithinolytica* em meio de cultura LB sem glicose e suplementado com glicose 1%

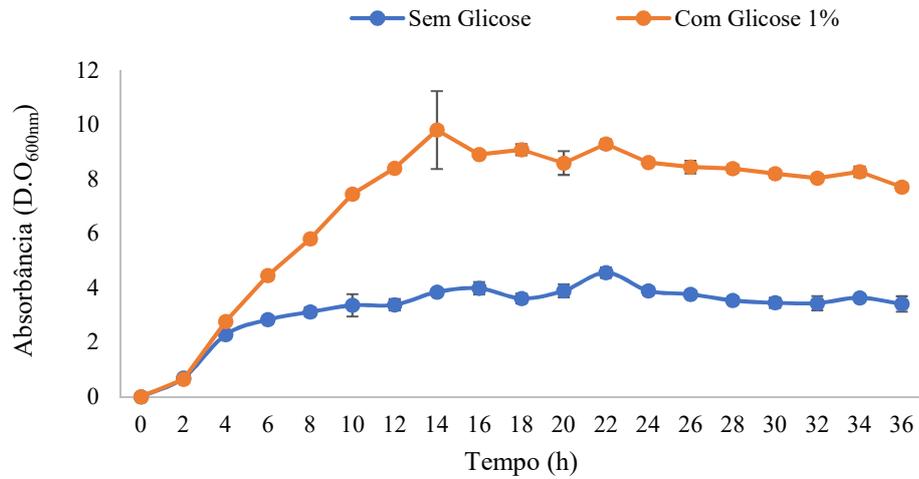
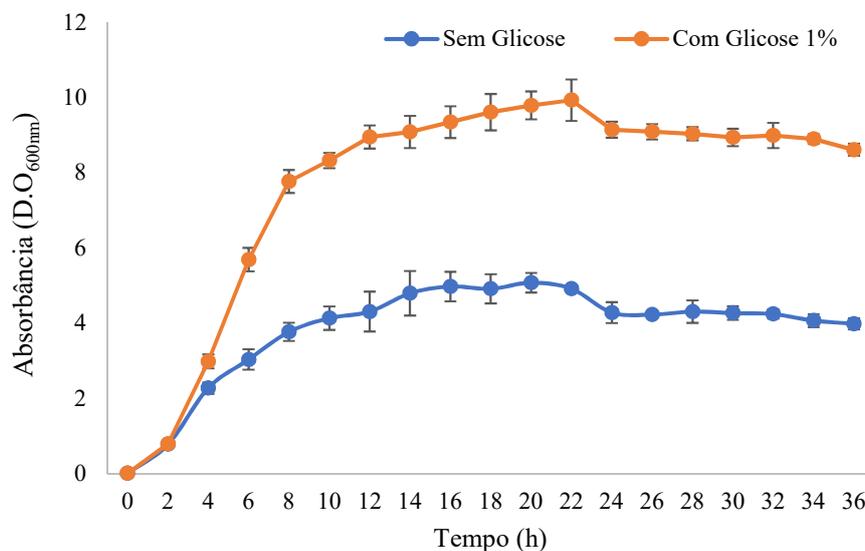


Figura 3 Crescimento da bactéria *E. asburie* em meio de cultura LB sem glicose e suplementado com glicose 1%



5.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Três bactérias foram selecionadas para o ensaio de CIM: *E. asburiae* (4.2.5.0.X.A), *R. ornithinolytica* (4.2.5.2.X.B) e *S. marcescens* (4.2.5.2.X.C). Todas elas resistiram a altas concentrações dos metais Cd, Cu, Ni e Zn (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cádmiu, Cobre, Níquel e Zinco para os isolados bacterianos.

Espécie	Cd(ppm)	Cu(ppm)	Ni(ppm)	Zn(ppm)
<i>E. asburiae</i>	600	180	300	1200
<i>R. ornithinolytica</i>	150	180	150	400
<i>S. marcescens</i>	600	300	300	1200

Os três microrganismos selecionados são provenientes de plantas da lagoa do Campelo situada na região Norte do estado do Rio de Janeiro, na cidade de Campos dos Goytacazes. Neste sentido, vale destacar que o isolamento microbiano realizado por Barroso (2018) obteve um grande número de cepas nesse corpo hídrico. Como *T. domingensis* é uma macrófita aquática enraizada fixa no substrato, a salinidade influenciou significativamente a diversidade dos microrganismos que foram encontrados no isolamento (BARROSO, 2018).

As três bactérias também são todas Gram-negativas. A maioria dos isolados obtidos de *T. domingensis* pertence à classe Proteobacteria, que corresponde a organismos em sua grande maioria Gram-negativos (BARROSO, 2018). Estudos anteriores já mostraram que esse grupo

de bactérias é a mais representativa em ambientes aquáticos (SRIVASTAVA et al., 2017) e em associação com *T. domingensis* (GUO; GONG; GUO, 2015; LI et al., 2011).

Após selecionar as três bactérias, elas foram cultivadas em meio LB na presença dos metais Cd, Cu, Ni e Zn em concentrações crescentes para realização do ensaio de CIM e o crescimento da cepa foi analisado por registro fotográfico conforme figura 8. As imagens presentes na figura 8 mostram o halo de crescimento da bactéria após 5 dias de inoculação de 10 ul de bactéria em diferentes concentrações de metal. Através do halo de crescimento foi possível observar já uma inibição de crescimento da bactéria *R. ornithinolytica* em 800 ppm de zinco, enquanto *S. marcescens* e *E. asburiae* cresceram até 1200 ppm. Com níquel a inibição da bactéria *R. ornithinolytica* já ocorreu em 300 ppm enquanto *S. marcescens* e *E. asburiae* inibiram em 600 ppm. No metal cobre a bactéria *S. marcescens* apresentou melhor resultado e sua CIM não foi indentificada, sendo maior que 300 ppm, enquanto nas bactérias *R. ornithinolytica* e *E. asburiae* inibiram em 300 ppm. No metal cádmio *R. ornithinolytica* foi inibida em 600 ppm, *S. marcescens* ainda houve crescimento e a bactéria *E. asburiae* houve crescimento de pequenas colônias, esses dados foram explorados de forma estatística mais abaixo. Devido esses resultados, a cepa de *S.* foi escolhida para prosseguir com os próximos testes de identificação de mecanismos no processo metabólico celular para biorremediação. O resultado obtido foi sumarizado na Tabela 1 e os gráficos nas figuras 4, 5, 6 e 7 mostram a área de crescimento da colônia (mm²) de cada cepa. Como se pode observar, *R. ornithinolytica* foi a cepa mais sensível aos quatro metais estudados. Todavia, a bactéria foi capaz de resistir a concentrações elevadas desses metais se comparado aos valores permitidos nas diferentes classes de água pela legislação brasileira (BRASIL, 2005). As cepas de *S. marcescens* e *E. asburiae* já nesse primeiro teste se mostraram eficientes em resistir a concentrações crescentes dos metais analisados, os dados apresentados na tabela 1 ainda mostram que o fato delas apresentarem um MIC mais alto no Zn em relação aos outros metais pode se dar ao fato de uma maior toxicidade dos metais Cd, Cu, Ni. Os resultados obtidos mostram uma interação químico-física entre os metais analisados e as cepas de bactérias, evidenciando um comportamento de crescimento bacteriano diferente na presença de cada metal e através da cinética de crescimento na presença de metais mostra que a tanto *S. marcescens* quanto *E. asburiae* apresentam melhor potencial e por isso serão selecionadas para ser exploradas em outros testes.

Além disso, as metalotioneínas (MT), proteínas essenciais e não essenciais, desempenham um papel importante na desintoxicação de elementos tóxicos. A transcrição do gene, é induzida por metais pesados através de elementos de resposta a metais, e a sobre

expressão dos genes MT após exposição a íons metálicos é responsável pela resistência à toxicidade de metais pesados em bactérias (RIFAAT et al. 2009).

Na análise estatística para o metal Níquel podemos rejeitar a Hipótese nula (H_0) ao nível de 5% de significância já que $p < \alpha$. Ou seja, estatisticamente há diferença significativa entre as concentrações de metal e entre as bactérias/doses analisadas, em que, na dose de 150 ppm, não houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente elas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose de 300 ppm, houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, a *R. ornithinolytica* não cresceu nessa concentração, e estatisticamente *E. asburiae* e *S. marcescens* cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose controle as bactérias *S. marcescens* e *E. asburiae* cresceram estatisticamente iguais e a bactéria *R. ornithinolytica* cresceu mais. *R. ornithinolytica* não cresceu na dose de 300ppm e teve maior crescimento na dose de 150ppm em relação ao tratamento sem metal. *S. marcescens* teve diferença estatística de crescimento em todas as doses e cresceu mais na concentração de 150ppm em relação ao tratamento controle sem metal e *E. asburiae* teve diferença de crescimento em todas as doses e apresentou maior crescimento na dose de 150ppm comparado ao tratamento sem adição de metal.

Para o metal Zinco, podemos rejeitar a Hipótese nula (H_0) ao nível de 5% de significância já que $p < \alpha$. Ou seja, estatisticamente há diferença significativa entre as concentrações de metal e entre as bactérias analisadas. Na dose de 1200 ppm, a bactéria *R. ornithinolytica* não cresceu e não houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias *S. marcescens* e *E. asburiae*, ou seja, estatisticamente elas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose de 400 ppm, a bactéria *R. ornithinolytica* teve diferença significativa de crescimento entre as bactérias *S. marcescens* e *E. asburiae*, ou seja, estatisticamente ela cresceu menos, e as outras duas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose de 800 ppm, a bactéria *R. ornithinolytica* não cresceu e não houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias *S. marcescens* e *E. asburiae*, ou seja, estatisticamente elas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *E. asburiae* teve uma média maior. Na dose controle todas as bactérias diferem entre si estatisticamente e a bactéria *R. ornithinolytica* teve um melhor crescimento. *R. ornithinolytica* não cresceu nas concentrações de 800ppm e 1200ppm e diferiu estatisticamente entre 400ppm e controle. *S. marcescens* não teve diferença de crescimento nas

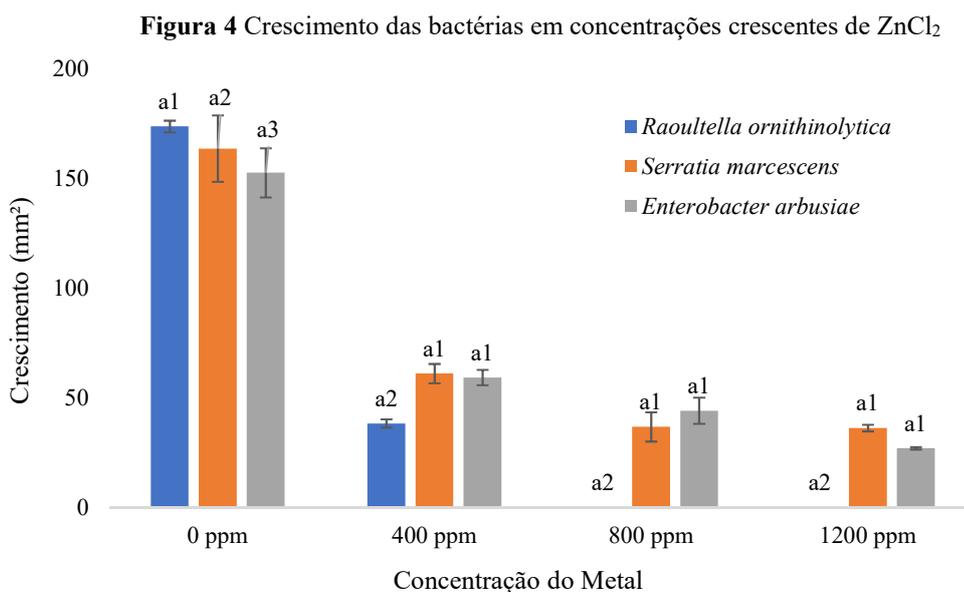
doses 1200 e 800 ppm e diferiu nas doses de 400ppm e controle. *E. asburiae* diferiu estatisticamente entre todos os tratamentos.

Para o metal Cádmio, podemos rejeitar a Hipótese nula (H0) ao nível de 5% de significância já que $p < \alpha$. Ou seja, estatisticamente há diferença significativa entre as concentrações de metal e entre as bactérias analisadas. Na dose de 150 ppm, não houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente elas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose de 300 ppm, não houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente elas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose de 600 ppm, houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, a *R. ornithinolytica* não cresceu nessa concentração, e estatisticamente *E. asburiae* e *S. marcescens* cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose controle sem adição de metal, houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente todas diferiram entre si, e a *R. ornithinolytica* teve um maior crescimento. *R. ornithinolytica* não teve diferença de crescimento nas doses 150 e 300 ppm e não cresceu em 600 ppm. *S. marcescens* não teve diferença de crescimento nas doses 150 e 300 ppm porém teve diferença estatística em 600 ppm. *E. asburiae* não teve diferença de crescimento nas doses 150 e 300 ppm porém teve diferença estatística em 600 ppm.

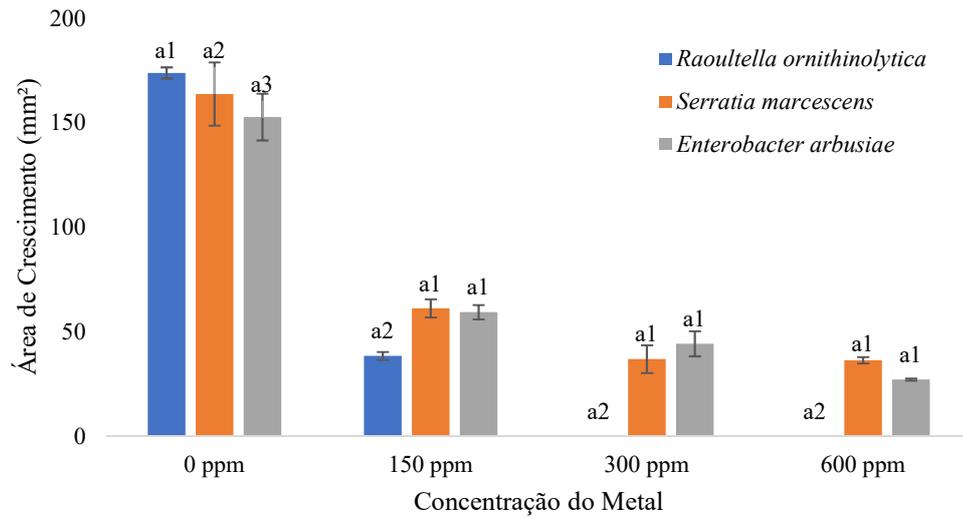
Para o metal Cobre, podemos rejeitar a Hipótese nula (H0) ao nível de 5% de significância já que $p < \alpha$. Ou seja, estatisticamente há diferença significativa entre as concentrações de metal e entre as bactérias analisadas. Na dose de 180 ppm, houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente elas cresceram diferentes, porém pelos valores apresentados a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose de 300 ppm, houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, somente a *S. marcescens* cresceu. Na dose de 60 ppm, houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente, *R. ornithinolytica* e *E. asburiae* cresceram iguais, e a *S. marcescens* teve uma média maior. Na dose controle, não houve diferença significativa de crescimento entre as bactérias, ou seja, estatisticamente elas cresceram iguais, porém pelos valores apresentados a *R. ornithinolytica* teve uma média maior. *R. ornithinolytica* teve diferença de crescimento nas doses controle e 300 ppm, e nas doses de 60ppm e 180ppm, não apresentou diferença significativa de crescimento. A Adição do metal em doses menores (60ppm e 180ppm) ajudaram no crescimento da bactéria. *S. marcescens* teve diferença de

crescimento em todas as doses aplicadas. A Adição do metal em doses menores (60ppm e 180ppm) ajudaram no crescimento da bactéria. *E. asburiae* não teve diferença de crescimento nas doses 180 e controle, porém teve diferença estatística em 300ppm e 60ppm, em que 60ppm ajudou no crescimento da bactéria.

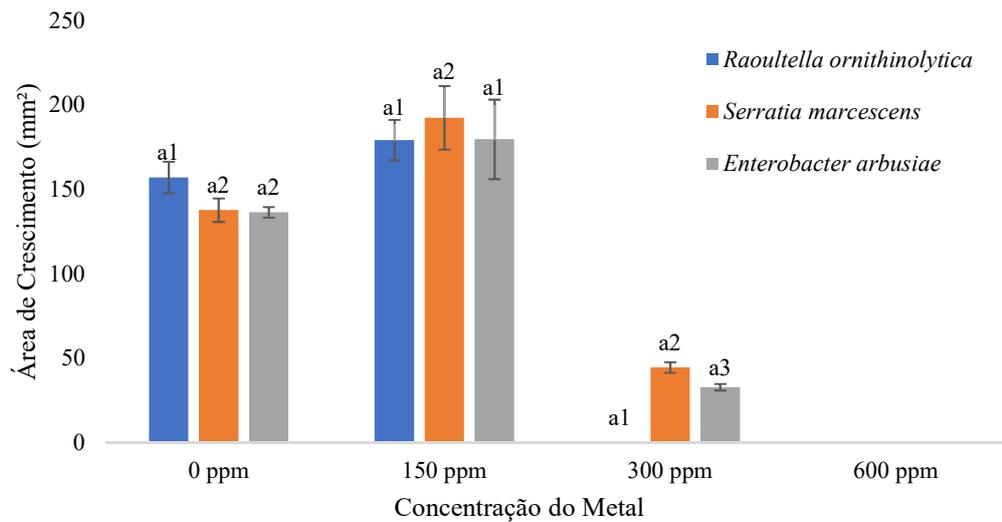
Após as análises estatísticas podemos inferir que o microrganismo *S. marcescens* foi o que apresentou melhor resultado, em que mesmo nos metais que a colônia de bactérias cresceu em concentrações iguais do metal, a área de crescimento foi maior. Com isso, elegida para realização dos testes posteriores. As três cepas estudadas no presente trabalho devem ser melhores investigadas na realização de outros testes para avaliar quais os mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na característica de resistência a metais nessas bactérias. A partir de tais pesquisas será possível explorar o potencial dos isolados em processos de descontaminação.



Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

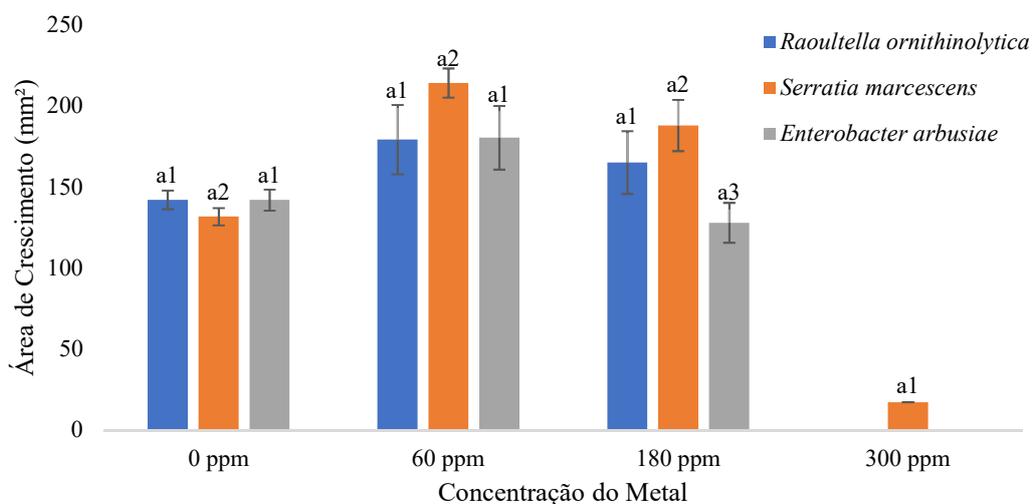
Figura 5 Área de Crescimento das cepas de bactérias em concentrações crescentes de CdCl₂

Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

Figura 6 Área de Crescimento das cepas de bactérias em concentrações crescentes de NiCl₂

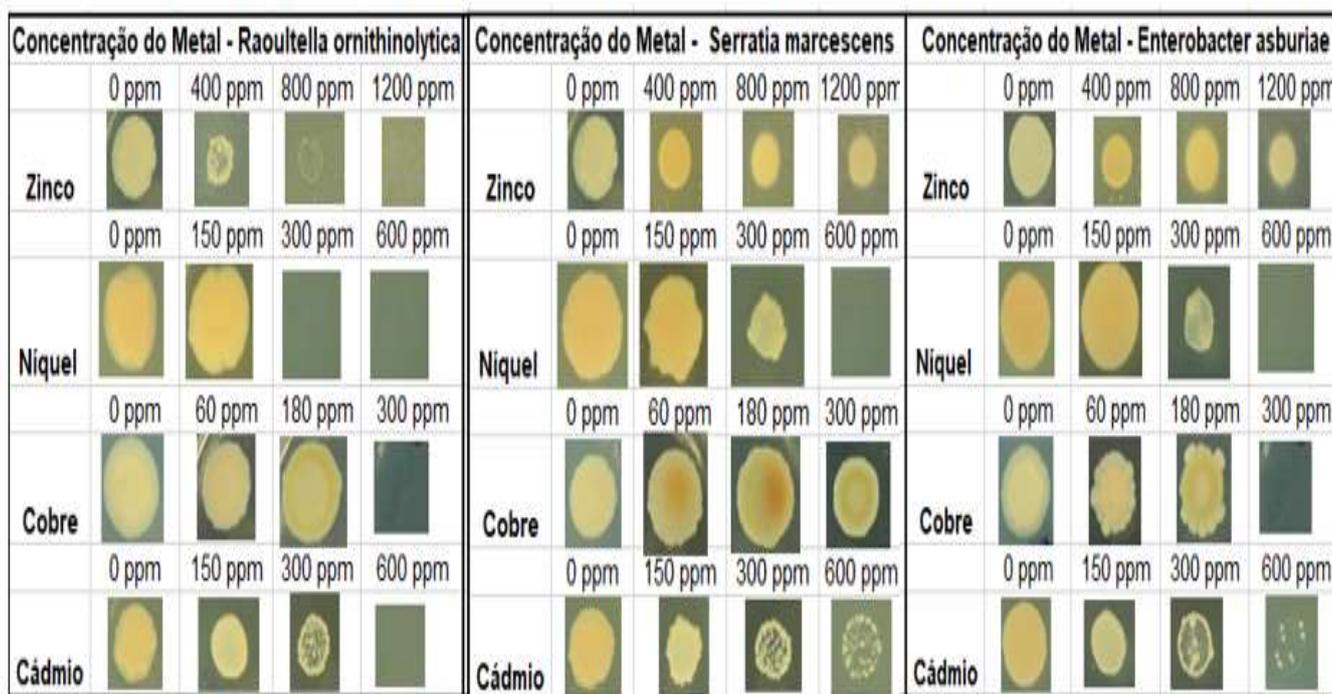
Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

Figura 7 Área de Crescimento das cepas de bactérias em concentrações crescentes de CuCl_2



Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

Figura 8 Análise Morfológica das colônias de bactérias após 5 dias de exposição ao metal.

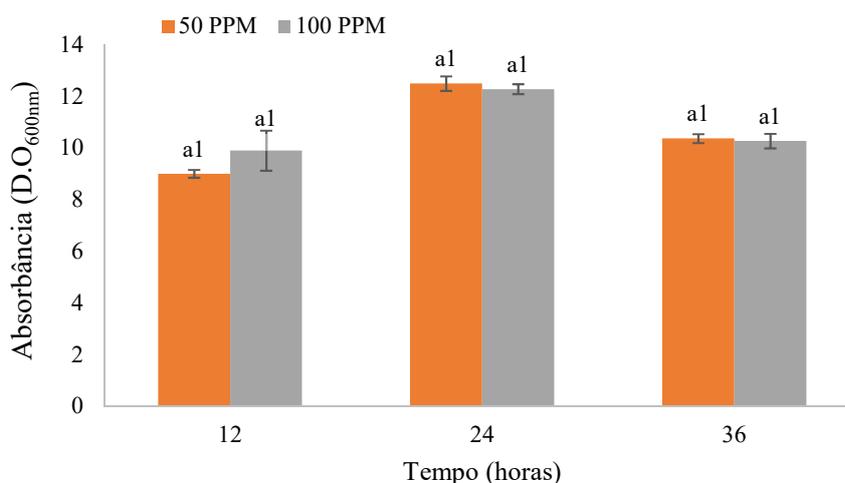


5.3. Crescimento da bactéria em meio aquoso com metal

Logo após testes de CIM, os metais em que a cepa de *Serratia marcescens* apresentou melhores resultados de crescimento foi em Cd e Zn, dessa forma foram escolhidos para realizar os testes de crescimento em meio líquido, já que nesse tipo de teste há uma maior disponibilidade de metal e se aproxima mais do cenário da possível utilização desse microrganismo para tratar efluentes líquidos. As concentrações de metal utilizadas também

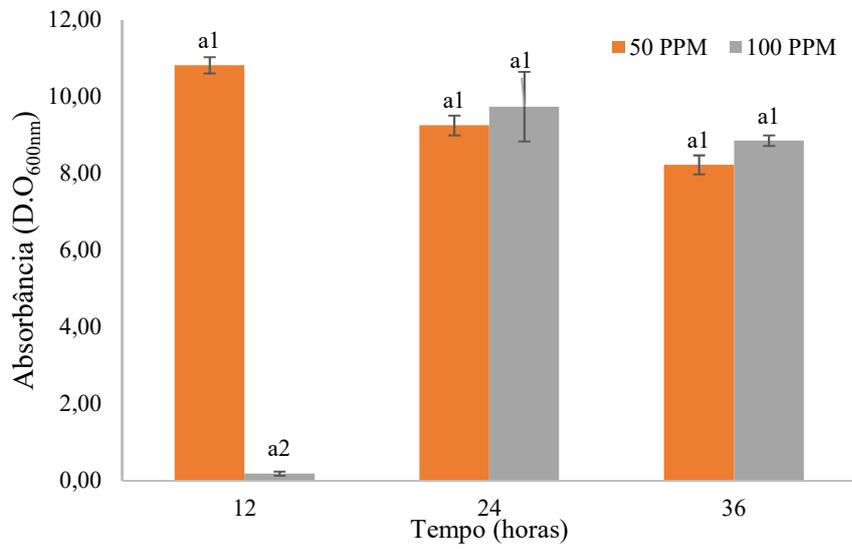
foram menores, porém todas elas são valores acima do permitido pela resolução CONAMA 2011, que estipula valores máximos de 5 ppm de Zinco e 0,2 ppm para Cádmiu nos lançamentos de efluentes. A Figura 9 mostra um crescimento muito próximo entre a menor e a maior concentração de Cd submetida, 50 ppm e 100ppm, isso mostra que mesmo na concentração mais elevada e em diferentes tempos, o microrganismo cresceu e estatisticamente, não houve diferença significativa. Nos testes realizados com Zinco (Figura 10), foi possível notar que na concentração de 100 ppm, o microrganismo demorou um tempo maior para se adaptar as condições adversas, tendo sua fase log mais tardia, entre 12h e 24h, já na concentração de 50 ppm do mesmo metal, não houve diferença significativa entre tempo e nem concentração. As bactérias selecionadas e estudadas foram isoladas da lagoa do Campelo, que é a maior lagoa de restinga do norte do Estado do Rio. Está localizada na latitude 21° 38' S e longitude 41° 08' W, entre a foz dos rios Paraíba do Sul e Itabapoana, essa lagoa apresenta grande histórico de contaminação por metais (GOMES, 2007). Ao longo dos anos, a exposição contínua dessas bactérias aos metais pesados no seu ambiente, acredita-se que levou-as a evoluir com mecanismos de sobrevivência para reduzir esta carga de estresse, transformando os metais em um estado mais nocivo para um estado menos nocivo, através de ligações intra ou extracelular desses metais, através de estratégias de adsorção ou absorção para evitar quaisquer danos prejudiciais a célula (SHYLLA, 2021).

Figura 9 Crescimento da bactéria *Serratia marcescens* em Meio LB com 1% de Glicose suplementado com CdCl₂



Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

Figura 10 Crescimento da bactéria *Serratia marcescens* em Meio LB com 1% de Glicose suplementado com ZnCl₂

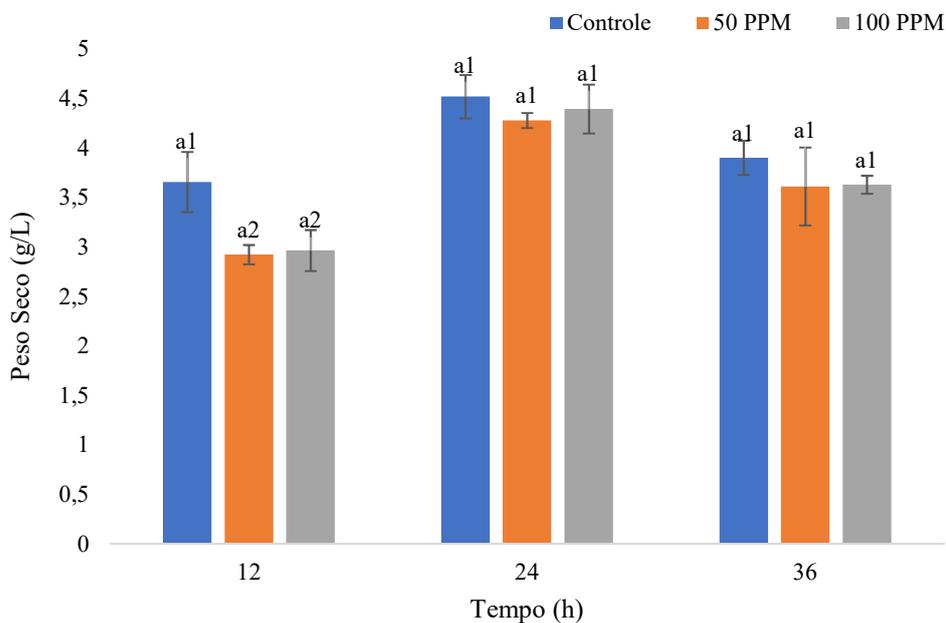


Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

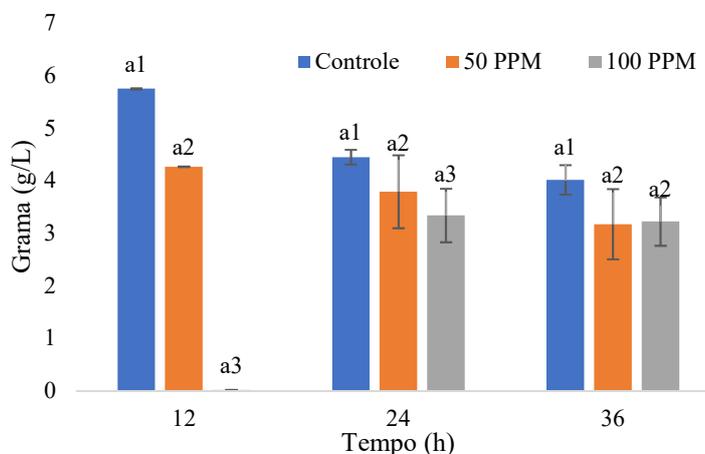
5.4. Biomassa microbiana em estresse ao metal

O peso seco da célula foi analisado no final do cultivo nos diferentes tratamentos para quantificar a biomassa microbiana, essa é mais uma forma de comprovar o crescimento do microrganismo na presença de Cd e Zn. Corroborando os resultados obtidos na curva de crescimento. A figura 11 mostra que já no tempo 12h há biomassa no tratamento controle e na presença do Cobre em 50ppm e 100ppm, ocorre um aumento da biomassa no tempo 24h e uma queda no tempo 36h, isso comprova as fases log, lag, estacionária e de declínio na curva de crescimento. Além disso, não houve diferença estatística significativa entre as concentrações de metal no tempo 24h e o mesmo no tempo 36h, isso pode ter ocorrido pois a concentração embora seja considerada alta para os padrões nacionais, a cepa suporta quantidades muito maiores, fazendo com que as concentrações testadas não afetem seu metabolismo de crescimento. Já na Figura 12 em que é representada a biomassa microbiana em solução de Zinco, foi possível observar que na maior concentração do metal 100 ppm, no tempo 12h ainda não havia biomassa, ou seja, as células ainda estavam se adaptando aquele meio (fase lag), o mesmo ocorreu na curva de crescimento corroborando o resultado obtido mostrando que em 36h a biomassa foi menor do que em 24h, pois já estava em fase de declínio. Foi possível analisar que após 36h os metais alteraram negativamente a biomassa bacteriana influenciando o seu crescimento.

A biomassa morta metabolicamente inativa, devido sua composição química, sequestra íons metálicos e complexos metálicos da solução, ajudando na remoção de metais da solução. Existe um grande potencial de utilização de biomassa microbiana por existir naturalmente, serem abundantes e baratas. Sua eficiência vai depender da capacidade, afinidade e especificidade e natureza físico-químico do poluente (AHLUWALIA, 2007).

Figura 11 Peso das células secas em diferentes tempo e concentrações de CdCl₂

Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

Figura 12 Peso Seco em diferentes tempos e concentrações de ZnCl₂

Letras iguais no mesmo tratamento, não apresentam diferença significativa ($p > 0,5$).

5.5. Quantificação de metal no sobrenadante

Para quantificação de metal no sobrenadante foi analisado por meio de Espectrofotômetro de Absorção Atômica (EAA) em amostras controle contendo 50 e 100 ppm de metal sem bactéria. Partindo dessa análise foi possível observar quanto de metal existia naquela amostra em diferentes tempos (12, 24 e 36h) através da verificação da concentração inicial menos a final. A remoção dos metais foi calculada usando a seguinte fórmula: $\text{Remoção (\%)} = ((A - B) / A) \times 100\%$ onde A representa a concentração inicial e B a concentração final de Cd e Zn, conforme tabela 2, através da tabela foi possível observar que a porcentagem de remoção dos

metais do sobrenadante, ocorreu de forma gradativa. No tempo 12h houve absorção de uma pequena porcentagem de Cd, porém de Zn não houve absorção, isso pode estar relacionado a biomassa bacteriana que ainda não era suficiente para realizar os processos metabólicos de sorção, no tempo de 24h teve um aumento significativo, e no tempo 36h ocorreu a melhor absorção de ambos os metais. Conforme mostra na Figura 13, a cepa de *S. marcescens* apresentou uma eficiência na remoção de metal do meio com o passar do tempo, ou seja, os isolados bacterianos reduziram a concentração de metais no meio durante o crescimento, indicando biosorção. Ao final do experimento as amostras de Cd de 50ppm apresentaram 37ppm e de 100ppm para 60ppm. Já nos testes realizados com Zn as amostras de 50ppm reduziram para 44ppm e de 100ppm para 58ppm com melhor resultado de remoção também em 36h conforme mostra a Tabela 2, podendo aferir que o tempo foi um fator relevante para o processo de remoção dos metais analisados. Estudos com outros metais mostram que o fator tempo pode ser ainda mais determinante, segundo Shylla et al (2021), um isolado de *S. marcescens* em solução contendo 5ppm de Fe, após 15 dias apresentou entre 70-80% de capacidade de remediação desse metal, já no presente estudo utilizamos concentrações 20 vezes maiores, com um metal que tem maior toxicidade, com menor tempo e os resultados ficam próximos do que foi encontrado por Shylla et al (2021).

De acordo com estudos de Akudo et al (2018), a *S. marcescens* apresenta capacidade de remoção de Zinco em 58,73%. Em nossos testes essa porcentagem chegou a 41,2% em 36h, porém, seriam necessários mais testes para avaliar se poderia aumentar essa porcentagem e absorção com mais tempo.

Alguns estudos vêm demonstrando o potencial de espécies de *S. marcescens* no processo de biorremediação de metais como cádmio, cobre, cromo, níquel, rádio, magnésio, zinco (ANDREAZZA et al., 2012; BARBOZA et al., 2017; CRISTANI et al., 2012; KANNAN; RAMTEKE, 2002; ZAKERI et al., 2010; ZHANG; LI, 2011). Cepas de *S. marcescens* também conseguem tolerar e remover altas concentrações de Manganês Mn (II) (BARBOZA et al., 2017; QUEIROZ, 2018). A *S. marcescens* pertence à família *Enterobacteriaceae*, que são caracterizadas por produzirem enzimas e outros compostos que ajudam a captar metais do meio por vias diretas através de enzimas, e indiretas como a biosorção (ANDREAZZA et al., 2012; BARBOZA et al., 2017; KANNAN; RAMTEKE, 2002; ZAKERI et al., 2010; ZHANG; LI, 2011). Existe um importante pigmento vermelho que é produzido pelo microrganismo chamado prodigiosina, 2-metil-3-amil-6-metoxiprodigiosene. Esse pigmento é conhecido por ser parte de um mecanismo que protege a célula sob condições desfavoráveis (HEJAZI e FALKINER, 1997). Além disso, está associado ao processo de absorção de metais em estudos de

biorremediação (CRISTANI et al., 2012; ZAKERI et al., 2010). Porém as cepas que não possuem esse pigmento também removem metais de forma eficiente por via indireta (BARBOZA et al., 2017).

Outros estudos utilizando consorcio microbiano demonstraram eficácia na utilização de *Serratia marcescens*+*Enterobacter asburiae* para a biorremediação de efluentes de usinas de açúcar e mostrou uma redução drástica nos níveis de metais pesados e outras propriedades físicas (SARANRAJ; STELLA, 2012). Dessa forma, estudos futuros podem ser realizados utilizando as cepas de *Serratia marcescens* juntamente com *Enterobacter asburiae* para tratamento de outros tipos de efluentes.

Tabela 2 Porcentagem de remoção de metal em diferentes tempos

Metal	12h	24h	36h
Cádmio 50ppm	11,34%	19,7%	24,12%
Cádmio 100ppm	1,85%	25%	40,07%
Zinco 50ppm	0%	10,1%	15,2%
Zinco 100ppm	0%	20,72%	41,2%

Figura 13 Quantidade de $CdCl_2$ em ppm presente no Meio de Cultura

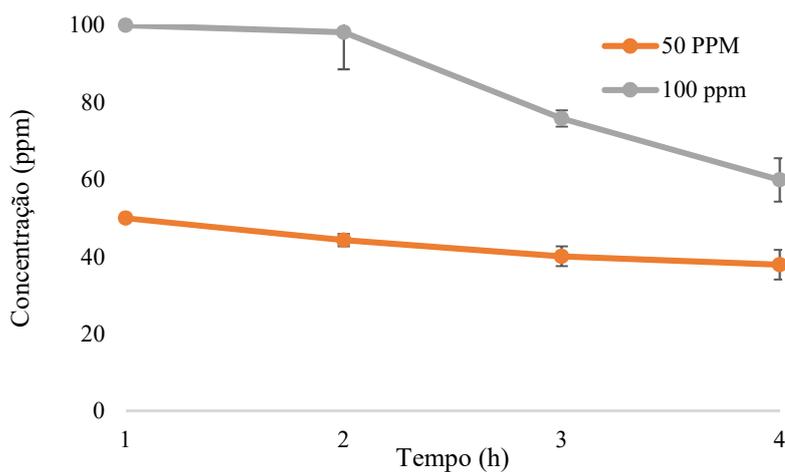
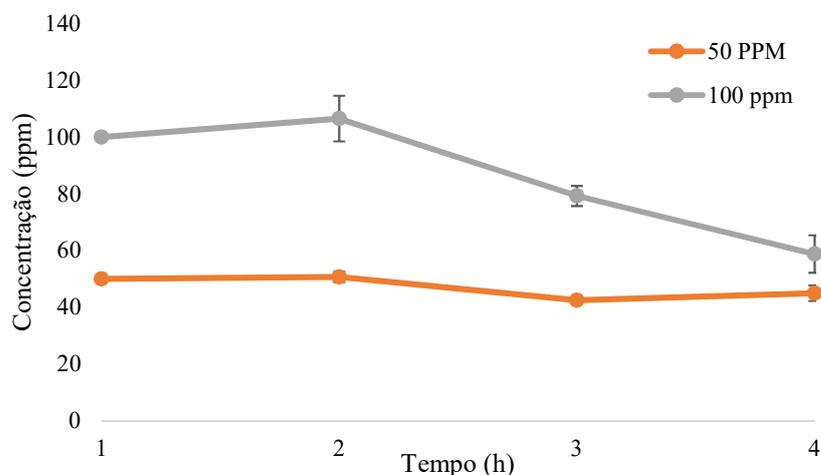


Figura 14 Quantidade de $ZnCl_2$ em ppm presente no Meio de Cultura

5.6. Análise de Cádmi e Zinco adsorvidos nas células

Os dados da literatura sobre as interações metal-microrganismo, a sorção de metais e processos de dessorção de metais por bactérias mostram que os íons metálicos com carga positiva são sequestrados principalmente através da adsorção de metais aos grupos iônicos negativos nas superfícies celulares e também no revestimento polissacarídico presente na parede celular da maioria das bactérias (SRIVASTAVA et al. 2008). Além disso, os locais de ligação dos metais nas superfícies das células microbianas são normalmente resíduos de carboxilo, resíduos de fosfato, grupos SH ou grupos hidroxilo; os metais não essenciais ligam-se com maior afinidade ao grupo SH (SRIVASTAVA et al. 2008).

Várias bactérias desenvolveram um mecanismo de sequestro citosólico para proteção contra metais. Uma vez dentro da célula, os íons metálicos também podem se tornar compartimentados ou convertidos em formas menos danosas. Esse processo pode constituir um mecanismo eficaz de desintoxicação e os respectivos microrganismos podem acumular metais em altas concentrações intracelulares (HAFERBURG, 2007). Exemplos incluem a síntese de proteínas de ligação a metais, como as metalotioneínas, que são proteínas ricas em cisteína de baixa massa molecular e com altas afinidades por Cd, Zn e outros metais (RAJKUMAR et al., 2010).

As Figuras 15 e 16 mostram a quantidade de metal adsorvidos na célula. Os microrganismos apresentam diversas técnicas de captação de íons metálicos e os resultados confirmam a

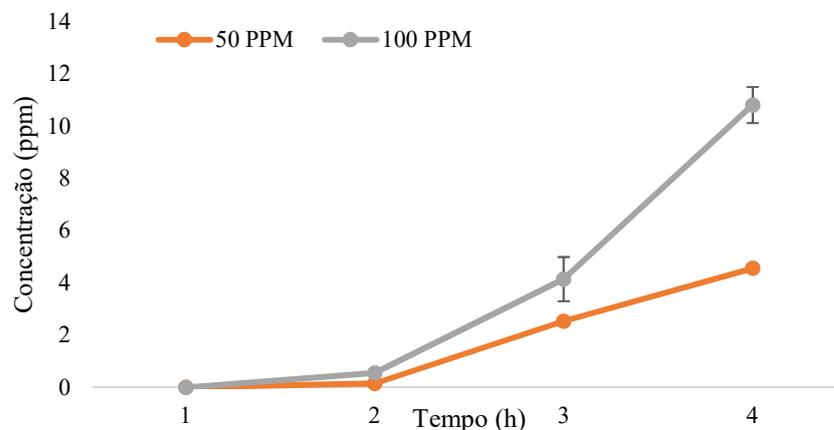
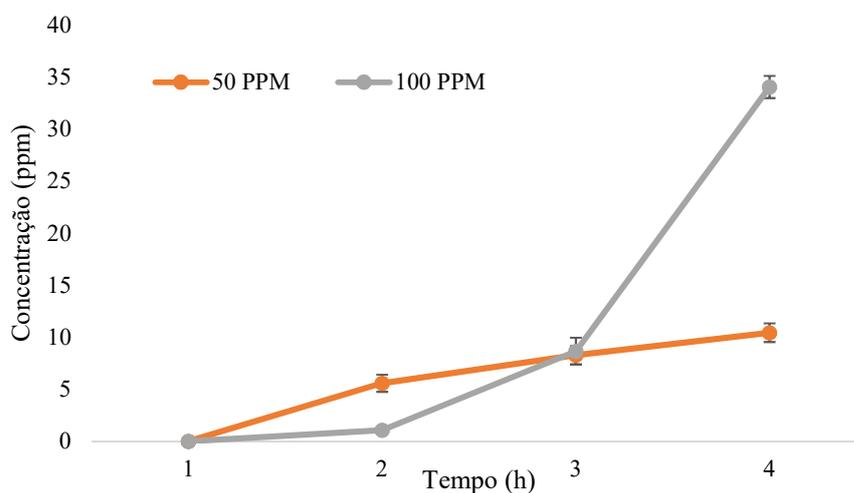
presença desses metais na parede celular ou internamente na célula. A bactéria *S. marcescens* vem sendo bastante utilizada e mostrando eficácia metabólica nos processos de adsorção (GUODONG, 2022). A adsorção na célula de 34% de Zn conforme mostra na tabela 3, é um valor bom comparado com outras cepas de *S. marcescens* descritas na literatura, Liang (2022) obteve em torno de 10% de remoção desse metal. Innocenzi (2018) mostrou em suas pesquisas que a taxa de remoção foi entre 25-30%, isso mostra que a cepa utilizada nesse presente trabalho se mostra eficaz no processo de adsorção para o metal Zn.

Contudo, serão necessários realizar mais pesquisas para entender os mecanismos metabólicos realizados pelas células, já que a capacidade de adsorção pode ser melhorada ainda mais por meio do aprimoramento de grupos funcionais como troca iônica, atração eletrostática e complexação (LIANG, 2022).

Quanto ao metal Cd, este apresentou um potencial de adsorção de 10% após 4h conforme mostra a tabela 3. Yakui (2019) mostrou em seus trabalhos que em águas residuais contendo baixa concentração de Cd em torno de 5ppm, verificou-se que após 2h essa carga cai para 0,1ppm, ou seja, mais 90 % de remoção, mostrando que para o metal Cd não há eficácia no processo de adsorção, esse resultado precisa ser melhor explorado futuramente para entender os processos metabólicos envolvidos nesse processo.

Tabela 3 Porcentagem de adsorção de metal na célula em diferentes tempos

Metal	2h	3h	4h
Cádmio 50ppm	<1%	5,08%	9,12%
Cádmio 100ppm	<1%	4,15%	10,81%
Zinco 50ppm	11,14%	16,54%	20,88%
Zinco 100ppm	1,08%	8,66%	34,06%

Figura 15 Quantidade de Cádmiu adsorvido na célula**Figura 16** Quantidade de Zinco adsorvido na célula

A adsorção/fixação para aplicação de biorremediação é o método de imobilização mais simples, barato e mais utilizado. Baseia-se na interação física reversível entre a superfície bacteriana e a superfície do transportador através de forças de ligação fracas (KILONZO; BERGOUGNOU, 2012). Os fatores que afetam a adsorção incluem, primeiramente, as características bacterianas, como condições fisiológicas e idade das células, apêndices superficiais bacterianos, cargas da membrana celular e hidrofobicidade. Em segundo, as características do meio como sua composição e pH; e terceiro, as propriedades de superfície da matriz de suporte, compreendendo o tamanho e a estrutura do adsorvente utilizado e poros, se houver, no adsorvente (MARTINS et al., 2013). Além disso, a natureza do adsorvente também desempenha um papel importante na avaliação da força da interação no processo de adsorção. Como interações mais fracas estão envolvidas nos processos de adsorção, existe uma grande

possibilidade de vazamento das células aderidas do suporte para o ambiente, portanto, esta técnica de imobilização tem aplicações limitadas (DZIOONEK, 2016).

Essas bactérias podem também expulsar metal por transporte ativo através do citoplasma da célula (HAMLETT et al. 1992; WHITE e GADD 1998). Uma vasta literatura sugere que *Serratia spp.* são potenciais candidatos para biorremediação de metais pesados (CRISTANI et al. 2012; DEBORAH e RAJ, 2016). A capacidade de cepas de bactérias que realizam biorremediação de metais pode ser uma robusta tecnologia na redução da carga de contaminação por metais no ambiente (SHYLLA *et al.*, 2021).

Considerando os resultados obtidos neste estudo e o comportamento químico dos metais analisados, é possível colocar a hipótese de que o mecanismo de bioissorção por *S. marcescens* pode ser devido à absorção por metalotioneínas ou sideróforos produzidos pelas células bacterianas e ser efetuado através de processos de quelação intracelular.

Dessa forma, as três cepas estudadas no presente trabalho devem ser melhores investigadas para avaliar quais os mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na característica de resistência a metais nessas bactérias. A partir de tais pesquisas será possível explorar o potencial dos isolados em processos de descontaminação de corpos hídricos e tratamentos de efluentes.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as cepas de *S. marcescens*, *R. ornithinolytica* e *E. asburiae* analisadas, resistiram em quantidades elevadas de Cádmio, Cobre, Níquel e Zinco. Das três bactérias selecionadas, a *S. marcescens* foi a que apresentou melhor resistência aos metais. Dentre os metais, os que tiveram melhor resultado de remoção pela bactéria foram o Cd e Zn. Além da sua resistência, o microrganismo apresenta um potencial de retirar esses metais do ambiente através do seu metabolismo por biossorção. Considerando que as concentrações testadas nos ensaios foram muito acima dos valores estipulados como permitidos pelo CONAMA, podemos sugerir que a bactéria utilizada tem um grande potencial de implantação em processos de biorremediação de corpos hídricos e efluentes, sendo assim uma ferramenta viável e de baixo custo para tratar problemas ambientais. Portanto, a capacidade de tal cepa em realizar a biorremediação de metais pode provar ser uma tecnologia eficaz na redução da carga de contaminação metálica no meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS

AAFI, N. E. et al. Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC541. **International Journal of Phytoremediation**, v. 14, n. 3, p. 261–274, 2012.

ABINOX. **Tipos de aço e especificação. Abinox - Associação Brasileira de Aço Inoxidável**, 2019. Disponível em: <https://abinox.org.br/wp-content/uploads/2023/03/Comparacao-304_304L_316_316L.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2024

AHLSTRÖM, M. G. et al. Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment. **Contact Dermatitis**, v. 81, n. 4, p. 227–241, 2019.

AHLUWALIA, S. S., & GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, 98(12), 2243–2257, 2007. doi:10.1016/j.biortech.2005.12.00

AKUDO, S. et al. A study of heavy metal tolerant bacteria and their potential for bioremediation. **Int J Biochem Biotechnol** 7(2):791–799, 2018

AN, T. et al. Recent Patents on Immobilized Microorganism Technology and Its Engineering Application in Wastewater Treatment. **Recent Patents on Engineering**, v. 2, n. 1, p. 28–35, 2008.

ANDREAZZA, R. et al. Effects of stimulation of copper bioleaching on microbial community in vineyard soil and copper mining waste. **Biological Trace Element Research**, v. 146, n. 1, p. 124–133, 2012.

BARBOZA, N. R. et al. High Manganese Tolerance and Biooxidation Ability of *Serratia marcescens* Isolated from Manganese Mine Water in Minas Gerais, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

BARCELOUX, D. G. Zinc. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 279–292, 1999a.

BARCELOUX, D. G. Nickel. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 239–258, 1999b.

BARROSO, L. M. **Interação de planta aquática e microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre**. Dissertação—Campos - RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2018.

BASKETTER, D. Nickel: Intrinsic Skin Sensitization Potency and Relation to Prevalence of Contact Allergy. **Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug**, v. 32, n. 2, p. 71–77, 2021.

BAZOT, S.; LEBEAU, T. Effect of immobilization of a bacterial consortium on diuron dissipation and community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4257–4261, 2009.

BEGUM, W. et al. A comprehensive review on the sources, essentiality and toxicological profile of nickel. **RSC Advances**, v. 12, n. 15, p. 9139–9153, 2022.

BETTMANN, H.; REHM, H. J. Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 285–290, 1984.

BEUNINK, J.; REHM, H.-J. Coupled reductive and oxidative degradation of 4-chloro-2-nitrophenol by a co-immobilized mixed culture system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 108–115, 1990.

BHATIA, M.; GOYAL, D. Analyzing remediation potential of wastewater through wetland plants: A review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 33, n. 1, p. 9–27, 2014.

BHATTA, D. et al. Hormones and the antioxidant transduction pathway and gene expression, mediated by *Serratia marcescens* DB1, lessen the lethality of heavy metals (As, Ni, and Cr) in *Oryza sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 263, p. 115377, 2023.

BIGALKE, M. et al. Accumulation of cadmium and uranium in arable soils in Switzerland. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 221, p. 85–93, 2017.

BRASIL. 9.605. Lei nº 9.605 de 12 fev 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. 1998.

BRASIL. 357. Resolução CONAMA nº357 de 17 abr. 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005.

BRASIL. 11.445. Lei nº 11.445 de 5 jan 2007. Estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico; cria o Comitê Interministerial de Saneamento Básico; altera as Leis nos 6.766, de 19 de dezembro de 1979, 8.666, de 21 de junho de 1993, e 8.987, de 13 de fevereiro de 1995; e revoga a Lei nº 6.528, de 11 de maio de 1978. . 2007.

BRASIL. 420. Resolução CONAMA nº 420 de 28 dez 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. . 2009.

BRASIL. 12.305. Lei nº 12.305 de 2 ago 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. . 2010.

BRAVO, G. B. G. **Resistência aos metais cobre, chumbo, cromo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas de ambiente aquático**. Dissertação—Londrina - PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

BUEKERS, J. Fixation of cadmium, copper, nickel and zinc in soil : kinetics, mechanisms and its effect on metal bioavailability. 2007.

CAMARATA, M. A.; ALA, A.; SCHILSKY, M. L. Zinc Maintenance Therapy for Wilson Disease: A Comparison Between Zinc Acetate and Alternative Zinc Preparations. **Hepatology Communications**, v. 3, n. 8, p. 1151–1158, 2019.

CHANEY, R. L. et al. Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 60, n. 3–4, p. 190–198, 2005.

CHELLAIAH, E. R. Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. **Applied water science**, v. 8, n. 6, p. 154, 2018.

CHEN, Y. et al. How *Serratia marcescens* HB-4 absorbs cadmium and its implication on phytoremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 185, p. 109723, 2019.

CLOQUET, C. et al. Tracing source pollution in soils using cadmium and lead isotopes. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 8, p. 2525–2530, 2006.

COLLINS, J. F.; KLEVAY, L. M. Copper. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 2, n. 6, p. 520–522, 2011.

CORONADO, V. A. et al. COMMD1 (MURR1) as a candidate in patients with copper storage disease of undefined etiology. **Clinical Genetics**, v. 68, n. 6, p. 548–551, 2005.

CRISTANI, M. et al. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 19, n. 1, p. 161–168, 2012.

CUNHA, C. et al. *Serratia* sp. SVGG16: A promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2277–2282, 2004.

DAKORA, F.; PHILLIPS, D. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil**, v. 245, p. 35–47, 2002.

DAS, M.; ADHOLEYA, A. Potential Uses of Immobilized Bacteria, Fungi, Algae, and Their Aggregates for Treatment of Organic and Inorganic Pollutants in Wastewater. Em: **Water Challenges and Solutions on a Global Scale**. ACS Symposium Series. [s.l.] American Chemical Society, 2015. v. 1206, p. 319–337.

DEBORAH, S.; RAJ, J. S. Bioremediation of heavy metals from distilleries effluent using microbes. **J Appl Adv Res** 1(2):23–28, 2016

DIMKPA, Christian O. et al. Envolvimento dos sideróforos na redução da inibição da síntese de auxinas induzida por metais em *Streptomyces* spp. **Quimosfera**, v. 74, n. 1, pág. 19-25, 2008.

DUBE, T. et al. Sewage Effluent Causes Metal Pollution of a Sub-tropical River System in Zimbabwe. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 104, n. 3, p. 339–344, 2020.

FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper: an Essential Metal in Biology. **Current biology : CB**, v. 21, n. 21, p. R877–R883, 2011.

FISHEL, F. M. Pest Management and Pesticides: A Historical Perspective. **EDIS**, v. 2010, n. 1, p. 5, 2010.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H.-C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247–260, 2019.

FUENTEALBA, I. C.; ABURTO, E. M. Animal models of copper-associated liver disease. **Comparative Hepatology**, v. 2, n. 1, p. 5, 2003.

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, n. 8, p. 834–840, 1990.

GALL, J. E.; BOYD, R. S.; RAJAKARUNA, N. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 4, p. 201, 2015.

GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium- and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v. 198, n. 1, p. 5, 1996.

GALVÃO, A. C. DE A. **Índices de poluição do solo por metais pesados e riscos ecológicos e a saúde humana em lixão no semiárido**. Trabalho de Conclusão de Curso—Natal - RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2022.

GAMAKARANAGE, C. S. et al. Complications and management of acute copper sulphate poisoning; a case discussion. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)**, v. 6, p. 34, 2011.

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19–25, 1996.

GLICK, B. R. et al. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, n. 5–6, p. 227–242, 2007.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GOLEBIEWSKI, M. et al. Análise de pirosequenciamento de 16S rDNA da comunidade bacteriana em solos poluídos com metais pesados. **Ecologia microbiana**, v. 67, p. 635–647, 2014.

GREENBERG, M. I.; VEARRIER, D. Metal fume fever and polymer fume fever. **Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 53, n. 4, p. 195–203, 2015.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The Genus *Serratia*. Em: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass**. New York, NY: Springer, 2006. p. 219–244.

GRISSI, B. M. Metodologia de Determinação de Biomassa Microbiana de Solo. v. 8, p. 167–172, 1984.

GOMES, R. S. Biocumulação De Mercúrio E Caracterização Histológica E Ultraestrutural Do Tecido Nervoso De *Hoplias malabaricus* (Traíra – Bloch, 1794) Sob O Efeito Da Exposição In Vivo Por Mercúrio. **Dissertação**, 2007

GUMULEC, J. et al. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 33, p. 5041–5051, 2011.

GUODONG, Z. et al. Cd²⁺ tolerance and removal mechanisms of *Serratia marcescens* KMR-3, **Journal of Biotechnology**, Volume 359, 2022, Pages 65-74, ISSN 0168-1656, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.019>.

GUO, Y.; GONG, H.; GUO, X. Rhizosphere bacterial community of *Typha angustifolia* L. and water quality in a river wetland supplied with reclaimed water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2883–2893 2015.

HAFERBURG, G.; KOTHE, E. Microbes and metals: interactions in the environment. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 453–467, 2007.

HAIDER, F. U. et al. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p. 111887, 2021.

HAMLETT, N. V. et al. AO Roles of the n. 21 merT, merP and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. **J Bacteriol** 174:6377–6385, 1992.

HASSAN, M. U. et al. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 13, p. 12673–12688, 2019.

HASAN, S.A. et al. Cadmium induced changes in the growth and carbonic anhydrase activity of chickpea. **Turk. J. Biol.** 31, 137–140, 2007.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. R. The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. **Journal of Medical Microbiology**, Vol. 46, 913-919, 1997.

HUANG, X.-D. et al. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 130, n. 3, p. 465–476, 2004.

ICZ. **Nickel and Society**. Disponível em: <<https://www.icz.org.br/site-en/nickel-society.php>>. Acesso em: 23 mar. 2024.

IDRIS, R. et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2667–2677, 2004.

INNOCENZI, V. Treatment of WEEE industrial wastewaters: Removal of yttrium and zinc by means of micellar enhanced ultra filtration, **Waste Management**, Volume 74, 2018, Pages 393-403, ISSN 0956053X, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.018>.

KANNAN, A.; RAMTEKE, P. W. Uptake of nickel (II) by *Serratia marcescens*. **Journal of Environmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 57–59, 2002.

- KARIMPOUR, M. et al. Adsorption of cadmium and lead onto live and dead cell mass of *Pseudomonas aeruginosa*: A dataset. **Data in Brief**, v. 18, p. 1185–1192, 2018.
- KHAN, A. R. et al. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171534, 2017.
- KHAN, M. S. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2009.
- KILONZO, P.; BERGOUGNOU, M. Surface modifications for controlled and optimized cell immobilization by adsorption: Applications in fibrous bed bioreactors containing recombinant cells. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 4, p. 22–30, 2012.
- KIRKHAM, M.B.†. Cádmio em plantas em solos poluídos: efeitos de fatores de solo, hiperacumulação e alterações. **Geoderma**, v. 1-2, pág. 19-32, 2006.
- KIRISITS, M. J.; EMELKO, M. B.; PINTO, A. J. Applying biotechnology for drinking water biofiltration: advancing science and practice. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 57, p. 197–204, 2019.
- KLAASSEN, C. D. et al. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2ª edição ed. [s.l.] AMGH, 2012.
- KNAPPE, F. et al. **Vergleichende Auswertung von Stoffeinträgen in Böden über verschiedene Eintragspfade**. 1. ed. Dessau-Roßlau: Umweltbundesamt, 2008.
- KUBIER, A.; PICHLER, T. Cadmium in groundwater - A synopsis based on a large hydrogeochemical data set. **The Science of the Total Environment**, v. 689, p. 831–842, 2019.
- KUFFNER, M. et al. Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 1471–1484, 2010.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2001.
- LAUDERDALE, C. et al. Engineered biofiltration: Enhanced biofilter performance through nutrient and peroxide addition. **Journal AWWA**, v. 104, n. 5, p. E298–E309, 2012.
- LIANG, C.L.; SHEN, J.L. Removal of yttrium from rare-earth wastewater by *Serratia marcescens*: biosorption optimization and mechanisms studies. **Sci Rep** 12, 4861, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08542-0>
- LI, Y. H. et al. Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 124–131, 2011.
- LIU, J. et al. Cadmium tolerance and accumulation in fifteen wetland plant species from cadmium-polluted water in constructed wetlands. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 10, n. 2, p. 262–269, 2016.

MA, Y. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 248–258, 2011.

MA, Y. et al. Inoculação de bactérias endofíticas em plantas hospedeiras e não hospedeiras – efeitos no crescimento das plantas e na absorção de Ni. **Revista de materiais perigosos**, v. 195, p. 230-237, 2011.

MACEDO NETO, S. L. DE; ALENCAR, M. S. DE; DIAS, F. S. **A importância da montagem de um laboratório e de curvas de crescimento na elaboração do procedimento para o estudo da radiação não-ionizante sobre a bactéria Escherichia coli**. VI Congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Campina Grande, [s.l: s.n.], p. 1-7, 2009.

MARTINS, S. C. S. et al. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 28, 2013.

MASON, K. E. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. **The Journal of Nutrition**, v. 109, n. 11, p. 1979–2066, 1979.

MCKIE, M. J. et al. Biofilter scaling procedures for organics removal: A potential alternative to piloting. **Water Research**, v. 151, p. 87–97, 2019.

MEHROTRA, T. et al. A Novel Immobilized Bacterial Consortium Bioaugmented in a Bioreactor For Sustainable Wastewater Treatment. v. 13, n. 1, p. 371–383, 2019.

MISHRA, S. et al. Contaminação por metais pesados: uma ameaça alarmante ao meio ambiente e à saúde humana. **Biotecnologia ambiental: Para um futuro sustentável**, p. 103-125, 2019.

MUHAMMAD, F. et al. Quantitative structure activity relationship and risk analysis of some heavy metal residues in the milk of cattle and goat. **Toxicol Ind Health**. 25(3):177–181, 2009.

MURRAY, B. P. et al. Pneumonitis and Respiratory Failure Secondary to Civilian Exposure to a Smoke Bomb in a Partially Enclosed Space. **Journal of special operations medicine: a peer reviewed journal for SOF medical professionals**, v. 18, n. 4, p. 24–26, 2018.

NAZAR, R. et al. Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 10, p. 1476–1489, 2012.

OE, S. et al. Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 1, p. 192–200, 2016.

PALMOROTH, M. R. et al. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. **Biodegradation**, 18(6), 769–782, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9105-y>

PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. The essential toxin: impact of zinc on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 4, p. 1342–1365, 2010.

POT, B. et al. Taxonomia de bactérias lácticas. In: Bacteriocinas de bactérias lácticas: microbiologia, genética e aplicações . Boston, MA: Springer EUA, 1994. p. 13-90.

PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; STEWART, C. R. Localization and Characterization of Peroxidases in the Mitochondria of Chilling-Acclimated Maize Seedlings. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1597–1605, 1995.

QUEIROZ, P. S. **Serratia marcescens resistente ao manganês e estratégias para biorremediação de ambientes contaminados**. Tese—Ouro Preto - MG: Universidade Federal de Ouro Preto, 2018.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142–149, 2010.

RAJKUMAR, M. et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1562–1574, 2012.

RAMAKRISHNA, S. V.; PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 87–100, 1999.

RASUL, G. et al. Beyond hydropower: towards an integrated solution for water, energy and food security in South Asia. **International journal of water resources development**, v. 37, n. 3, p. 466-490, 2021.

RENU, K. et al. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity - A review. **Chemosphere**, v. 271, p. 129735, 2021.

REZANIA, S. et al. Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 587–599, 2016.

REZUKE, W. N.; KNIGHT, J. A.; SUNDERMAN, F. W. Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 11, n. 4, p. 419–426, 1987.

RIBAS, F. B. T.; SILVA, W. L. DA. Biossorção: uma revisão sobre métodos alternativos promissores no tratamento de águas residuais. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 27, p. e13212, 13 2023.

RIFAAT H. M et al. Effect of heavy metals upon metallothioneins in some Streptomyces species isolated from Egyptian soil. **J App Sc Environ San** 4(3):197–206, 2009.

ROYCHOWDHURY, A.; DATTA, R.; SARKAR, D. Heavy Metal Pollution and Remediation. **Green Chemistry: An Inclusive Approach**, p. 359–373, 2018.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Bioremediation of sugar mill effluent by immobilized bacterial consortium. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 43–48, 2012.

SHEIK, C. S. et al. A exposição das comunidades microbianas do solo ao crómio e ao arsénio altera a sua diversidade e estrutura. **PloS one**, v. 6, pág. e40059, 2012.

SHYLLA, L. et al. Characterization and bioremediation potential of native heavy-metal tolerant bacteria isolated from rat-hole coal mine environment. **Arch Microbiol** 203, 2379–2392, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02218-5>

SINHA, S. et al. A Review on the Dairy Industry Waste Water Characteristics, Its Impact on Environment and Treatment Possibilities. Em: JINDAL, T. (Ed.). **Emerging Issues in Ecology and Environmental Science: Case Studies from India**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 73–84.

SRINATH, T. et al. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere**, v. 48, n. 4, p. 427–435, 2002.

Srivastava J. et al. Removal of chromium(VI) through biosorption by the *Pseudomonas* spp. isolated from tannery effluent. **J Basic Micro** 48:135–139, 2008

SRIVASTAVA, J. K. et al. Plant–microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: a review. **Applied Water Science**, v. 7, n. 3, p. 1079–1090, 2017.

STURNIOLO, G. C. et al. Zinc therapy increases duodenal concentrations of metallothionein and iron in Wilson’s disease patients. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 2, p. 334–338, 1999.

SUNDERMAN, F. W. A pilgrimage into the archives of nickel toxicology. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 1989.

SUSARLA, S.; MEDINA, V. F.; MCCUTCHEON, S. C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, v. 18, n. 5, p. 647–658, 2002.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 57, n. 9, p. 386–398, 2003.

TERRIN, G. et al. Zinc in Early Life: A Key Element in the Fetus and Preterm Neonate. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 10427–10446, 2015.

THOMPSON, F. et al. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **The Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135914, 2020.

TORJUSSEN, W.; SOLBERG, L. A.; HØGETVEIT, A. C. Histopathological changes of the nasal mucosa in active and retired nickel workers. **British Journal of Cancer**, v. 40, n. 4, p. 568–580, 1979.

TOSA, T. et al. Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, n. 10, p. 1697–1709, 1979.

TRAN, T.; POPOVA, L. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 1–13, 2013.

VIGLIOTTA, G. et al. Efeitos de metais pesados e quelantes na capacidade de fitorremediação e nas comunidades rizobacterianas do milho. **Revista de Gestão Ambiental**, v. 179, p. 93-102, 2016.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, Biohydrometallurgy and the environment-toward the mining of the. v. 59, n. 2, p. 203–216, 2001.

WHITE, C.; GADD, G. M. Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms. **Microbiology** 144:1407–1415, 1998.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? Em: WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. (Eds.). **Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1999. p. 1–19.

WINNICKI, T.; SZETELA, R.; WISNIEWSKI, J. Immobilized Microorganisms in Wastewater Treatment. Em: PAWLOWSKI, L. (Ed.). **Studies in Environmental Science**. Physicochemical Methods for Water and Wastewater Treatment. [s.l.] Elsevier, 1982. v. 19p. 341–352.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **International Scholarly Research Notices**, v. 2011, p. e402647, 2011.

YANG, Q. et al. Effectiveness of applying arsenate reducing bacteria to enhance arsenic removal from polluted soils by *Pteris vittata* L. **International Journal of Phytoremediation**, v. 14, n. 1, p. 89–99, 2012.

YAKUI C., et al. How *Serratia marcescens* HB-4 absorbs cadmium and its implication on phytoremediation, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 185, 2019, 109723, ISSN 01476513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109723>.

ZAKERI, F. et al. *Serratia* sp. ZF03: an efficient radium biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9163–9170, 2010.

ZASOUSK, R. J.; BURAU, R. G. Um método de digestão rápida com ácido nítrico-perclórico para análise de multielementos em tecidos vegetais. **Communications in soil Science em Plant Analysis**, v.8, n. 5, p. 425-436, 1977.

ZAREI, M. et al. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 156, n. 3, p. 1277–1283, 2008.

ZAREI, M. et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 158, n. 8, p. 2757–2765, 2010.

ZHANG, K.; LI, F. Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1163–1169, 2011.

ZULFIQAR, U. et al. Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. **Journal of Environmental Management**, v. 250, p. 109557, 2019.