

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Potencial *in vitro* de isolados bacterianos para
biorremediação de solo e efluentes contaminados com
metais potencialmente tóxicos**

Michelle de Souza Santos

Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Potencial *in vitro* de isolados bacterianos para
biorremediação de solo e efluentes contaminados com
metais potencialmente tóxicos**

Discente: Michelle de Souza Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Maria Saran

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Carareto Alves

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agropecuária.

S237p

Santos, Michelle de Souza

Potencial in vitro de isolados bacterianos para biorremediação de solo e efluentes contaminados com metais potencialmente tóxicos / Michelle de Souza Santos. -- Jaboticabal, 2024

96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Luciana Maria Saran

Coorientadora: Lucia Maria Carareto Alves

1. Microbiologia Ambiental. 2. Helianthus annuus. 3. Metais pesados. 4. Fitorremediação. 5. Bioacumulação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto esperado: o crescimento da urbanização, industrialização e de atividades agropecuárias tem resultado na contaminação do solo e da água com metais potencialmente tóxicos. Nesse cenário, a utilização de bactérias e plantas com capacidade de biorremediação é uma alternativa sustentável para mitigar os efeitos adversos oriundos da contaminação ambiental por espécies químicas tóxicas. Assim, a pesquisa científica que resultou nesta dissertação de mestrado abordou aspectos ambientais, econômico e social ao estudar opções sustentáveis para a descontaminação de solos e efluentes industriais contaminados com metais potencialmente tóxicos.

Expected impact: the growth of urbanization, industrialization and agricultural activities has resulted in the contamination of soil and water with potentially toxic metals. In this scenario, the use of bacteria and plants with bioremediation capacity is a sustainable alternative to mitigate the adverse effects arising from environmental contamination by toxic chemical species. Thus, the scientific research that resulted in this master's thesis addressed environmental, economic and social aspects when studying sustainable options for the decontamination of soils and industrial wastewater contaminated with potentially toxic metals.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL *in vitro* DE ISOLADOS BACTERIANOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO E EFLUENTES CONTAMINADOS COM METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

AUTORA: MICHELLE DE SOUZA SANTOS

ORIENTADORA: LUCIANA MARIA SARAN

COORDINADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANA MARIA SARAN**
Data: 17/01/2024 11:13:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ROSE MARIA DUDA (Participação Virtual)
Produção de Biogás, Tratamento de Águas Residuárias / FATEC - Jaboticabal/SP

Documento assinado digitalmente
 **ROSE MARIA DUDA**
Data: 17/01/2024 13:47:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Campus Diadema/SP

Documento assinado digitalmente
 **SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS**
Data: 18/01/2024 10:51:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 28 de novembro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Michelle de Souza Santos, nasceu em 13 de novembro de 1995, no município de Jaboticabal, São Paulo, filha de Gisela Cardoso de Souza Santos e Gilberto Rodrigues Santos. Graduou-se como Bacharel em Engenharia Agrônômica (2016-2021) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Câmpus de Jaboticabal, onde sob orientação do Prof. Dr. Renato de Mello Prado, desenvolveu o trabalho de graduação (TG), intitulado “Sintomatologia de deficiência de macronutrientes em plantas de jiló”. Em março de 2021, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, na FCAV/UNESP, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Saran, com coorientação da Prof.^a Dr.^a Lucia Carareto Alves, desenvolvendo o projeto intitulado “Potencial *in vitro* de isolados bacterianos para biorremediação de solo e efluentes contaminados com metais potencialmente tóxicos”, que culminou no presente documento.

Agradecimentos

Aos meus pais, Gisela e Gilberto que sempre acreditaram no meu potencial e me deram todo apoio e suporte durante este período.

Ao meu namorado Lucas, que sempre esteve ao meu lado e deixou meus dias mais leves.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FCAV/Unesp), pelo apoio acadêmico e acesso à infraestrutura durante meu período de mestrado.

A professora Dr.^a Luciana Maria Saran pela orientação, ensinamentos e pela oportunidade em fazer parte de seu grupo de pesquisa.

A professora Dr.^a Lucia Maria Carareto Alves, minha coorientadora, por toda orientação e ajuda durante esses anos.

Agradeço aos Laboratórios de Química Ambiental e Analítica (LQAA) e ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), por toda a infraestrutura fornecida para a realização deste trabalho.

As minhas companheiras de trabalho do LQAA, Alince Laura, Bianca Gabriel, Sara Silva, Thais Perrucci e Daiane Bonaldi, pelo convívio, momentos de descontração e por todo apoio e ajuda durante o mestrado.

Aos professores e colaboradores do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, que sempre estiveram disponíveis quando as necessidades relacionadas ao trabalho surgiram.

Aos membros do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária e aos servidores da Seção Técnica de Pós-Graduação, pela sua prontidão e dedicação em solucionar quaisquer desafios que tenham surgido ao longo dos anos do meu mestrado.

A todas as pessoas que contribuíram, de maneira direta ou indireta, para o progresso deste trabalho, expresso minha gratidão e meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Portanto, agradeço a bolsa de mestrado concedida pela CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão de literatura	2
1.2.1 Metais potencialmente tóxicos.....	2
1.2.1.1 Cádmio	3
1.2.1.2 Crômio.....	5
1.2.1.3 Cobre.....	6
1.2.1.4 Mercúrio.....	8
1.2.1.5 Níquel.....	9
1.2.2 Remediação de solos e tratamento de efluentes contaminados com metais potencialmente tóxicos	10
1.2.2.1 Processos convencionais	10
1.2.2.2 Biorremediação: aspectos gerais.....	12
1.2.3 Utilização de bactérias para biorremediação de metais potencialmente tóxicos	16
1.2.4 Associação de bactérias com plantas fitorremediadoras	18
1.3 Referências bibliográficas	21
Capítulo 2. Potencial <i>in vitro</i> do isolado <i>Klebsiella</i> sp. LM09 para biorremediação de solo contaminado com metais potencialmente tóxicos	33
Resumo	33
Chapter 2. <i>In vitro</i> potential of the isolate <i>Klebsiella</i> sp. LM09 for the bioremediation of soil contaminated with potentially toxic metals	34
Abstract	34
2.1 Introdução	35
2.2 Material e Métodos.....	38
2.2.1 Isolado bacteriano	38
2.2.2 Identificação do isolado	38
2.2.2.1 Extração de DNA, amplificação e purificação	38
2.2.2.2 Sequenciamento dos fragmentos 16S rRNA e análise das sequências	38

2.2.2.3 Solubilização de nutrientes inorgânicos.....	39
2.2.2.4 Solubilização de fosfato de cálcio em meio líquido.....	39
2.2.2.5 Produção de ácido indol acético.....	40
2.2.2.6 Produção de sideróforos.....	40
2.2.2.7 Soluções estoques de íons metálicos potencialmente tóxicos.....	41
2.2.2.8 Ensaios de germinação.....	41
2.2.2.9 Ensaios de crescimento de plântulas.....	43
2.2.2.10 Análise estatística dos resultados.....	44
2.3 Resultados e Discussão.....	44
2.3.1 Identificação da cepa bacteriana.....	44
2.3.2 Produção de ácido indolacético.....	45
2.3.3 Produção de sideróforos.....	45
2.3.4 Solubilização de nutrientes inorgânicos.....	46
2.3.4.1 Solubilização de fosfatos de cálcio, ferro e alumínio.....	46
2.3.4.2 Solubilização de potássio inorgânico.....	47
2.3.4.3 Solubilização de fosfato de cálcio em meio líquido.....	48
2.3.5 Germinação de sementes.....	49
2.3.6 Crescimento de plântulas.....	50
2.4 Conclusão.....	54
2.5 Referências bibliográficas.....	55
Capítulo 3. Potencial <i>in vitro</i> do isolado <i>Cupriavidus</i> sp. 395/10 para remoção de cádmio, crômio e níquel.....	62
RESUMO.....	62
3.1 Introdução.....	65
3.2 Material e Métodos.....	67
3.2.1 Isolado bacteriano.....	67
3.2.2 Meio de cultivo.....	67
3.2.3 Soluções estoques de Cd ²⁺ , Cr ³⁺ e Ni ²⁺	67
3.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória.....	68
3.2.5 Curva de crescimento celular.....	68
3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) ...	69
3.2.8 Determinação do pH do meio de cultivo em função do tempo de incubação do isolado.....	69

3.2.9 Espectroscopia molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	70
3.2.10 Remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+}	70
3.2.11 Análise estatística dos resultados	71
3.3 Resultados e Discussão	71
3.3.1 Concentração mínima inibitória	71
3.3.2 Curva de crescimento celular	72
3.3.3 Efeito do tempo de incubação do isolado <i>Cupriavidus</i> sp. 395/10 no pH do meio de cultivo	74
3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura	76
3.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão	77
3.3.6 Espectroscopia molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	78
3.3.7 Remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+}	80
3.4 Conclusão	82
3.5 Referências bibliográficas.....	82
4 Considerações finais.....	92
ANEXO I. Imagens dos ensaios de germinação de sementes de girassol.	93
ANEXO II. Imagens dos ensaios de crescimento de plântulas de girassol.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: ácido indol acético.

CAS: chromeazurol agar assay.

Cd: cádmio.

CMI: concentração mínima inibitória.

CN: caldo nutriente.

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

Cr: crômio.

Cu: cobre.

FTIR: espectroscopia molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, Fourier-transform infrared spectroscopy).

HDTMA: brometo de hexadeciltrimetilamônio.

Hg: mercúrio.

IS: índice de solubilização.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MET: microscopia eletrônica de transmissão.

MEV: microscopia eletrônica de varredura.

MPT: metal potencialmente tóxico.

NA: nutriente agar.

NBRIP: National Botanical Research Institute's phosphate growth medium.

NBRISSM: National Botanical Research Institute's silicon-solubilizing medium.

Ni: níquel.

PIPES: piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanossulfônico).

RRG: crescimento relativo da raiz (do inglês, relative root growth).

RSG: germinação relativa das sementes (do inglês, relative seed germination).

TR: taxa de remoção.

VP: valor de prevenção.

UFC: unidade formadora de colônia.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2. Potencial *in vitro* do isolado *Klebsiella* sp. LM09 para biorremediação de solo contaminado com metais potencialmente tóxicos.

Tabela 2.1. Descrição dos tratamentos (T) e controles (C) adotados nos ensaios de germinação e de crescimento de plântulas de *Helianthus annuus* L.42

Capítulo 3. Potencial *in vitro* do isolado *Cupriavidus* sp. 935/10 para remoção de cádmio, crômio e níquel.

Tabela. 3.1. pH do meio de cultivo CN sem os íons metálicos (controle) e contendo $0,5 \text{ mmol Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, $2 \text{ mmol Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$, $1 \text{ mmol Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, e simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, previamente a inoculação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10. Médias de 3 repetições e respectivas estimativas do desvio padrão.74

Tabela 3.2. Taxas de remoção (TR) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , pelo isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, após seu cultivo, por 24 h, em meio contendo, separadamente, Cd^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cr^{3+} ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e Ni^{2+} ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), assim como, em meio contendo os três íons metálicos conjuntamente, sendo $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de cada íon. 80

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2. Potencial *in vitro* do isolado *Klebsiella* sp. LM09 para biorremediação de solo contaminado com metais potencialmente tóxicos.

- Figura 2.1.** Presença de halo de *Klebsiella* sp. LM09 sinalizando produção de sideróforos.....46
- Figura 2.2.** Imagem do ensaio para a determinação do índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio por *Klebsiella* sp. LM09.47
- Figura 2.3.** Imagem do ensaio para a determinação do índice de solubilização (IS) de potássio inorgânico pela cepa *Klebsiella* sp. LM09.48
- Figura 2.4.** Taxa de germinação de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) na presença e na ausência de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , com e sem inoculação de *Klebsiella* sp. LM09. 50
- Figura 2.5.** Efeito da presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , na germinação de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), inoculadas ou não com *Klebsiella* sp. LM09, em vermiculita. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). 51
- Figura 2.6.** Efeito da presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , no comprimento da parte aérea (A) e da raiz (B), e massa fresca (C) de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), inoculadas ou não com *Klebsiella* sp. LM09. 52
- Figura 2.7.** Efeito da presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , na germinação relativa das sementes, RSG (A), no crescimento relativo da parte aérea, RShG (B) e da raiz, RRG (C), em plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), inoculadas ou não com *Klebsiella* sp. LM09. 54

Capítulo 3. Potencial *in vitro* do isolado *Cupriavidus* sp. 935/10 para remoção de cádmio, crômio e níquel.

Figura 3.1. Curvas de crescimento do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, em meio CN sem íons de metais potencialmente tóxicos e em meio CN com 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, 2 mmol $\text{Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$ e 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, e em meio contendo simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L^{-1} . 73

Figura 3.2. Variação do pH do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, em meio CN sem íons de metais potencialmente tóxicos e em meio CN com 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, 2 mmol $\text{Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$ e 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, e em meio contendo simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L^{-1} . 75

Figura 3.3. Imagens de células de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN, por 24 h e a 30 °C: A. controle (meio de cultivo sem MPT); B. 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$; C. 2 mmol $\text{Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$; D. 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$; E. meio CN contendo 0,25 mmol L^{-1} de cada íon metálico. 76

Figura 3.4. Eletromicrografias de células de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN, por 24 h e a 30 °C: A. controle (meio de cultivo sem MPT); B. 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$; C. 2 mmol $\text{Cr}^{2+} \text{ L}^{-1}$; D. 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$; E. meio CN contendo 0,25 mmol L^{-1} de cada íon metálico 77

Figura 3.5. Espectros de transmitância na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado por 24 h em meio CN sem Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} (controle) e em meio contendo estas espécies químicas. 78

RESUMO

A urbanização e industrialização rápidas têm causado aumento significativo da geração de efluentes e contaminação do solo com íons de metais potencialmente tóxicos (MPT), como cádmio (Cd^{2+}), crômio tri (Cr^{3+}) e hexavalente (Cr^{6+}), além de cobre (Cu^{2+}) e mercúrio (Hg^{2+}), dentre outros. A capacidade, *in vitro*, da cepa *Klebsiella* sp. LM09, para promoção de crescimento vegetal, a germinação de sementes de *Helianthus annuus* L. (planta com potencial para fitorremediação de solos contaminados com MPT), associadas ou não a este microrganismo, e o crescimento de plântulas de girassol, na presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , foram estudados. O potencial *in vitro* da cepa *Cupriavidus* sp. 395/10, previamente isolada de solo tropical, contaminado com Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , para bioissorção/bioacumulação destas espécies químicas, também foi avaliado. A cepa *Klebsiella* sp. LM09, isolada de um fertilizante biológico, foi identificada pelo sequenciamento de fragmentos da região 16S rRNA, tendo apresentado capacidade elevada para produção de ácido indol acético, AIA ($62,88 \pm 0,02$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e moderada para solubilização de fosfato de cálcio (índice de solubilização = $3,68 \pm 0,03$). Solubilizou potássio inorgânico e produziu siderofóros. A sua inoculação em vermiculita protegeu plantas de girassol de possíveis efeitos adversos ocasionados pelos MPT estudados e promoveu o crescimento das plântulas. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} para o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio caldo nutriente (CN), foram 3, 4 e 225 mmol L^{-1} , respectivamente. Em meio CN contendo simultaneamente, os três íons metálicos, a CMI foi 1 mmol L^{-1} . O intervalo ótimo para a multiplicação celular ocorreu entre 12 e 24 h de cultivo, tanto na ausência como na presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} e/ou Ni^{2+} . Houve aumento do pH do meio em função do tempo de incubação, culminando em pH entre 8,25 e 8,75; após 96 h de cultivo. Nas micrografias da microscopia eletrônica de transmissão foram observados no interior e na parede de algumas células do isolado aglomerados discretos de natureza eletrocondutora, sinalizando possível bioissorção/bioacumulação de Cd^{2+} , Cr^{3+} e/ou Ni^{2+} . Os resultados da análise das células de *Cupriavidus* sp. 395/10 por espectroscopia molecular na região do infravermelho (FTIR) evidenciaram a presença de grupos hidroxila e carbonila, na parede celular, que podem atuar como sítios de adsorção de íons metálicos. Os resultados deste estudo sinalizam que as cepas *Klebsiella* sp. LM

09 e *Cupriavidus* sp. 395/10 têm potencial para serem empregadas em processos de biorremediação de ambientes contaminados com MPT.

Palavras-chave: *Klebsiella* sp.; *Cupriavidus* sp.; metais pesados; bioissorção; bioacumulação, fitorremediação.

ABSTRACT

Rapid urbanization and industrialization have led to a significant increase in effluent generation and soil contamination with potentially toxic metal ions (PTM), such as cadmium (Cd^{2+}), trivalent chromium (Cr^{3+}), and hexavalent chromium (Cr^{6+}), as well as copper (Cu^{2+}) and mercury (Hg^{2+}), among others. The in vitro capability of the *Klebsiella* sp. LM09 strain to promote plant growth, germinate seeds of *Helianthus annuus* L. (a plant with potential for phytoremediation of soils contaminated with PTM), either associated or not with this microorganism, and the growth of sunflower seedlings in the presence of Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , and Hg^{2+} were studied. The in vitro potential of the *Cupriavidus* sp. 395/10 strain, previously isolated from tropical soil contaminated with Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} , for biosorption/bioaccumulation of these chemical species was also evaluated. The *Klebsiella* sp. LM09 strain, isolated from a biological fertilizer, was identified through sequencing of fragments of the 16S rRNA region and exhibited a high capacity for indole-3-acetic acid (IAA) production (62.88 ± 0.02) $\mu\text{g mL}^{-1}$ and moderate solubilization of calcium phosphate (solubilization index = 3.68 ± 0.03). It solubilized inorganic potassium and produced siderophores. Its inoculation in vermiculite protected sunflower plants from potential adverse effects caused by the studied PTM and promoted seedling growth. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} for the *Cupriavidus* sp. 395/10 isolate, cultivated in nutrient broth (NB) were 3, 4, and 225 mmol L^{-1} , respectively. In NB containing all three metal ions simultaneously, the MIC was 1 mmol L^{-1} . The optimal interval for cell multiplication occurred between 12 and 24 h of cultivation, both in the absence and presence of Cd^{2+} , Cr^{3+} and/or Ni^{2+} . It was observed increase in medium pH over time, resulting in a pH range of 8.25 to 8.75 after 96 h of cultivation. Transmission electron microscopy micrographs revealed discrete clusters of electroconductive nature inside and on the cell wall of some cells of the isolate, suggesting possible biosorption/bioaccumulation of Cd^{2+} , Cr^{3+} , and/or Ni^{2+} . The results of molecular spectroscopy analysis in the infrared region (FTIR) on *Cupriavidus* sp. 395/10 cells demonstrated the presence of hydroxyl and carbonyl groups in the cell wall, which can serve as adsorption sites for metal ions. The results of this study indicate that the *Klebsiella* sp. LM09 and *Cupriavidus* sp. 395/10 strains have the potential to

be employed in the bioremediation of environments contaminated with PTM.

Keywords: *Klebsiella* sp.; *Cupriavidus* sp.; heavy metals; biosorption; bioaccumulation; phytoremediation.

Capítulo 1. Considerações Gerais

1.1 Introdução

O crescimento acelerado da urbanização e da industrialização tem resultado na ampliação do número de casos de solo contaminado por metais potencialmente tóxicos (MPT), o que representa uma séria ameaça à segurança alimentar, ao ambiente e ao desenvolvimento sustentável (Awa; Hadibarata, 2020).

São fontes naturais de MPT, o intemperismo, a erosão de rochas e depósitos de minérios. Entre as principais fontes antrópicas, se destacam, a mineração, águas residuárias oriundas de indústrias, atividades agrícolas, veículos automotivos, resíduos industriais, domésticos, eletrônicos e produtos elétricos (Anyanwu, 2020; De León-Gómez et al., 2020).

Com o avanço do setor agrícola, cresceram a aplicação de pesticidas, a irrigação de cultivos com efluentes de estação de tratamento de esgotos, o uso de fertilizantes, tanto sintéticos, como na forma de biossólidos (lodo de estações de tratamento de esgotos) e, conseqüentemente, aumentaram os teores de MPT, como, cádmio (Cd), crômio (Cr), cobre (Cu), mercúrio (Hg) e níquel (Ni), entre outros, no solo e em outros compartimentos ambientais (Li et al., 2019).

Uma abordagem mais sustentável para tratar solos e efluentes contaminados com MPT consiste no emprego da biorremediação. A biorremediação de solos contaminados com MPT, pode ser realizada por microrganismos presentes no próprio solo, que apresentem tolerância a estes elementos e consigam removê-los deste compartimento ambiental, diminuindo seus teores para valores menos tóxicos (Verma; Kuila, 2019; Pratush et al., 2018). Para tanto, os microrganismos desenvolvem e adotam diferentes mecanismos de desintoxicação, como bioacumulação, biossorção e biotransformação, fazendo com que se expanda o interesse sobre a interação entre microrganismos e MPT (Fernández et al., 2018).

A utilização combinada de plantas e microrganismos é amplamente reconhecida por sua capacidade de melhorar a tolerância das plantas e aumentar sua resistência a poluentes. Isso é alcançado por meio da produção de hormônios vegetais ou da degradação de poluentes que afetam o crescimento

da planta, oferecendo assim, proteção contra os efeitos negativos da poluição ambiental (Zhang et al., 2020).

Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivos estudar:

i) A capacidade, *in vitro*, da cepa *Klebsiella* sp. LM09 para promoção de crescimento vegetal, a germinação de sementes de *Helianthus annuus* L., associadas ou não a este microrganismo, assim como, o crescimento de plântulas de girassol, na presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , visando sua futura utilização à fitorremediação de solos contaminados com estas espécies químicas.

ii) A capacidade da cepa *Cupriavidus* sp. 395/10, previamente isolada de solo tropical contendo acúmulo de MPT, para remoção *in vitro* de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , visando ampliar o conhecimento do potencial desta bactéria para biorremediação, tendo em vista o seu emprego futuro para tratamento de águas residuárias.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Metais potencialmente tóxicos

Embora, vários metais e outros elementos químicos possam desempenhar funções importantes no metabolismo dos seres vivos, alguns são necessários em quantidades mínimas, enquanto outros, não apresentam função biológica relevante, podendo causar, inclusive, danos ao organismo (Abdu et al., 2017). Dentro deste contexto, há metais, como Cu, Cr, Ni e Zn, que na forma de seus respectivos cátions, ou seja, como Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , são essenciais a vários organismos, para os quais o aumento da concentração destes elementos melhora o seu desenvolvimento, porém, acima de determinada concentração, estes metais se tornam tóxicos, podendo inclusive, ser letais (Mondal et al., 2019).

Paralelamente, existem metais, como Cd, Hg e Pb, que não são essenciais para os seres vivos e, para esses metais, há uma faixa de concentração em que o organismo tolera sua presença. Entretanto, acima de determinados limites de concentração estes elementos se tornam tóxicos e letais (Han et al., 2021; Romero-Baena et al., 2021; Sandeep et al., 2019).

Embora os elementos previamente citados sejam comumente denominados “metais pesados”, considerando o exposto nos parágrafos anteriores desta seção, e as controvérsias relacionadas ao uso desse termo, nos âmbitos acadêmico e científico (Pourret; Hursthouse, 2019; Ali; Khan, 2018), será adotado no presente trabalho o termo metal potencialmente tóxico (MPT) ao invés de “metal pesado”.

Os MPT podem ser encontrados naturalmente no solo, cuja composição é influenciada pela rocha de origem e por processos geológicos, como sedimentação e erupções vulcânicas (Palansooriya et al., 2020). Atividades antropogênicas, que incluem mineração e fundição, produção de petróleo e gás, irrigação de áreas agrícolas com água contaminada, bem como atividades industriais, também são fontes de MPT (Anyanwu, 2020; Palansooriya et al., 2020).

A presença de concentrações elevadas de MPT no solo pode acarretar danos significativos ao ambiente, bem como contaminação de ecossistemas aquáticos e sistemas fluviais. Esses danos são atribuídos à natureza não biodegradável dos MPT, sua propensão à acumulação nos solos e na água, além de sua toxicidade para uma ampla variedade de organismos vivos (Liet al., 2019; Haghazadeh et al., 2021). Tais espécies químicas também têm potencial para causar danos à saúde humana (Kong et al., 2021). A exposição aos MPT pode resultar em danos significativos aos órgãos, incluindo fígado, pulmões e cérebro, como relatado por Alizadeh et al. (2021). Além disso, a exposição prolongada a esses elementos pode ocasionar esclerose múltipla, distrofia muscular e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e Alzheimer (Alizadeh et al., 2021).

Em ambientes aquáticos, os MPT têm impacto na cadeia alimentar, resultando no seu acúmulo no sangue, tecidos adiposos, unhas e dentes. Como consequência, a exposição a esses elementos pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer em indivíduos que vivem em áreas adjacentes aos cursos de água (Haghazadeh et al., 2021).

1.2.1.1 Cádmi

O cádmio (Cd) é um elemento químico que possui número atômico 48 e massa atômica 112,411 u. É um metal de transição, que apresenta apenas dois

elétrons de valência, que ocupam o subnível 5s (Genchi et al., 2020). Assim, o seu estado de oxidação mais comum é o +2, representado como Cd^{2+} ou Cd(II) (Genchi et al., 2020). O Cd tem oito isótopos estáveis: ^{106}Cd , ^{108}Cd , ^{110}Cd , ^{111}Cd , ^{112}Cd , ^{113}Cd , ^{114}Cd e ^{116}Cd , sendo os de número de massa 112 e 114, os mais comumente encontrados (Rahimzadeh et al., 2017).

No ambiente, o Cd pode ser encontrado no ar, no solo, na água e nos sedimentos, sendo que, esses compartimentos podem interagir por meio de processos como quelação, adsorção/dessorção e precipitação/dissolução (Zhang; Reynolds, 2019). Na litosfera, o Cd é geralmente encontrado em quantidades relativamente baixas, frequentemente associado a depósitos de minérios de zinco, chumbo e cobre. No entanto, mesmo em baixas concentrações, a toxicidade do Cd é significativa, assim como, a sua persistência ambiental, as quais o classificam como um dos metais mais tóxicos (Flora; Agrawal, 2017).

O Cd tem diversas aplicações industriais, sendo amplamente utilizado em galvanoplastia, produção de pigmentos, plásticos, estabilizadores de PVC, ligas industriais, chapeamento e baterias recarregáveis (Flora; Agrawal, 2017; Sharma et al., 2015). Entre as principais atividades antrópicas a partir das quais esse elemento é introduzido no ambiente se destacam a queima de combustíveis fósseis, emissões atmosféricas durante processos de mineração de metais, produção industrial e uso de lodo de esgoto como fertilizante. Como resultado, pode ser absorvido por plantas, contaminar corpos d'água e, conseqüentemente, afetar negativamente a cadeia alimentar (Anyanwu, 2020; Rahimzadeh et al., 2017; Zhang; Reynolds, 2019).

O Cd não possui função biológica conhecida em plantas e é amplamente reconhecido na literatura como um dos metais mais fitotóxicos, capaz de causar danos, mesmo em baixas concentrações (Dobrikova et al., 2021). Pode afetar a capacidade da planta em absorver e transportar os elementos necessários para o seu crescimento e desenvolvimento. Esse estresse resulta em menor crescimento das plantas e impacta diretamente sua capacidade de absorver nutrientes do ambiente (Rizwan et al., 2016).

Para o ser humano, a exposição ao Cd pode resultar em problemas no sistema esquelético, incluindo desmineralização e, conseqüentemente, osteoporose. Essa condição é caracterizada pela diminuição da densidade

óssea, o que aumenta a suscetibilidade a fraturas e pode levar a dores e deficiências físicas (Rahimzadeh et al., 2017). Rins, fígado, órgãos reprodutivos, sistema cardiovascular, visão e audição, também podem ser afetados, pois o Cd se acumula no corpo humano devido à sua meia-vida biológica relativamente longa, estimada entre 15 e 30 anos. A baixa taxa de excreção do Cd do organismo contribui para sua persistência e potencial de causar danos em diversos órgãos e sistemas do corpo humano (Flora; Agrawal, 2017; Genchi et al., 2020).

1.2.1.2 Crômio

O crômio (Cr) é considerado um dos elementos mais abundantes na Terra, ocupando a sétima posição entre os 10 elementos mais comuns (Ertani et al., 2017). Possui número atômico 24, massa atômica relativa igual a 51,996 u (Shekhawat et al., 2015) e quatro isótopos estáveis: ^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{54}Cr (Rosebrough; Wang, 2021). O seu estado de oxidação pode variar de -2 a +6, sendo os estados trivalente (Cr^{3+}) e hexavalente (Cr^{6+}) os mais prevalentes no ambiente (World Health Organization, 2020). O estado de oxidação mais estável do crômio é o trivalente, o qual é encontrado na forma de cromita (FeOCr_2O_3). Crômio hexavalente geralmente está associado ao oxigênio, formando cromato (CrO_4^{2-}) e dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Ertani et al., 2017).

No ambiente, as diferentes formas de Cr coexistem e podem interconverter-se dependendo das reações e condições ambientais (Liu; Yu, 2022; Ertani et al., 2017). O Cr^{3+} possui mobilidade relativamente baixa e é menos tóxico comparado ao Cr^{6+} . No entanto, conforme já mencionado, o Cr^{3+} pode oxidado a Cr^{6+} , que por sua vez, pode ser reduzido a Cr^{3+} (Ertani et al., 2017).

O intemperismo de rochas e processos erosivos são fontes naturais de Cr (World Health Organization, 2020). A ocorrência de Cr^{6+} em águas subterrâneas, especialmente em áreas distantes de fontes antropogênicas, está associada à presença de ofiolitos e outras rochas ultramáficas nas proximidades dessas áreas (Hausladen et al., 2018). Fontes antropogênicas, como, fundições de metais, refinarias, indústrias de curtimento de couro, águas residuais de fábricas de papel e celulose, emissões de gases de veículos movidos a combustíveis fósseis e efluentes de indústrias de tingimento, que podem conter principalmente

Cr^{3+} , são as que mais contribuem para a presença de Cr no ambiente (Liu; Yu, 2022; Poznanović Spahić et al., 2019; World Health Organization, 2020).

A contaminação de corpos d'água com Cr, resultante do descarte inadequado de efluentes, é a forma que mais afeta o ser humano. Isso ocorre porque a exposição por via oral, em comparação com a exposição por via aérea, é geralmente mais constante e persistente. Embora a exposição ao ar possa ser limitada no tempo em que se está exposto ao contaminante, a via oral proporciona uma exposição contínua, tornando-a potencialmente mais significativa em termos de impacto à saúde humana (Pavesi; Moreira, 2020).

Ressalta-se, que Cr^{3+} em concentrações adequadas, desempenha um papel importante na manutenção e regulação dos níveis de açúcar no sangue, contribui para a redução do colesterol e pode auxiliar no ganho muscular, sendo adicionado a suplementos oferecidos a atletas (Prasad et al., 2021). Devido à baixa mobilidade do Cr^{3+} entre as membranas celulares, sua atividade biológica e toxicidade são consideradas baixas. Ainda não existem estudos que comprovem de forma definitiva a essencialidade do Cr^{3+} para o ser humano (Pavesi; Moreira, 2020). O Cr^{6+} , em altas concentrações, pode causar úlceras na boca, indigestão, vômitos, dor abdominal e insuficiência renal (Shekhawat et al., 2015). Também foram observados efeitos nocivos no sistema respiratório, como falta de ar e asfixia, em casos de exposição prolongada ao Cr^{6+} , o qual pode levar à diminuição da função pulmonar, ocorrência de pneumonia e dermatite (Prasad et al., 2021).

O Cr, seja na forma tri ou hexavalente, não é essencial para o desenvolvimento das plantas, podendo acarretar atraso na germinação das sementes, redução da capacidade da planta em realizar fotossíntese e problemas nas folhas, como clorose, quando a planta é exposta ao elemento. Esses danos podem progredir para necrose e, eventualmente, levar à morte da planta. Além disso, as raízes das plantas podem ser afetadas, dificultando a capacidade de absorção de recursos necessários para o seu adequado desenvolvimento (Lukina et al., 2016; Sharma et al., 2020).

1.2.1.3 Cobre

O cobre (Cu), em particular, é um elemento que apresenta dois isótopos estáveis, ^{65}Cu e ^{63}Cu , cuja proporção pode variar dependendo da natureza do

ligante doador presente no ambiente. Essa variação isotópica pode fornecer informações valiosas sobre a origem e os processos envolvidos na sua dispersão e ciclagem em sistemas ambientais, permitindo melhor compreensão dos efeitos da mineração e de atividades relacionadas na distribuição e no comportamento do Cu no ecossistema (Balter et al., 2015). Pode ocorrer nos estados de oxidação +1, como Cu^+ e +2, como Cu^{2+} , sendo o estado bivalente o mais estável (Denoyer et al., 2015; Tsang; Davis; Brady, 2021). É um micronutriente essencial para os organismos vivos, desempenhando funções biológicas cruciais, como atividade enzimática e transporte de nitrogênio (Denoyer et al., 2015).

O Cu possui propriedades catalíticas significativas e é considerado um cofator estático em várias enzimas. No entanto, pode gerar espécies reativas de oxigênio, prejudiciais, contribuindo para o estresse oxidativo e danos celulares (Tsang; Davis; Brady, 2021). Essa dualidade nas propriedades do Cu destaca sua importância fisiológica, bem como os potenciais riscos associados ao seu acúmulo ou desequilíbrio nos sistemas biológicos. Neste sentido, íons Cu^{2+} , provenientes de atividades de mineração, podem ser liberados na natureza e causar danos significativos aos ecossistemas aquáticos e terrestres (Krstić; Urošević; Pešovski, 2018).

A toxicidade do Cu está relacionada ao aumento ou diminuição da concentração de Cu^{2+} considerada adequada para os organismos vivos (Krstić; Urošević; Pešovski, 2018). Altas concentrações de Cu^{2+} podem ter impactos significativos no desenvolvimento das plantas, uma vez que o cobre desempenha papel crucial no transporte de elétrons na fotossíntese, um processo metabólico essencial (Sullivan et al. 2021; Sivaraman et al., 2018). O desequilíbrio na concentração de cobre pode interferir nas reações fotossintéticas e prejudicar a eficiência da captação de energia luminosa e na produção de compostos orgânicos (Sullivan et al. 2021; Vieira Filho e Monteiro 2020). Isso pode levar a distúrbios no crescimento, na morfologia e na fisiologia das plantas, afetando negativamente seu desenvolvimento e, em última análise, sua capacidade de sobrevivência e reprodução (Sullivan et al. 2021).

Em seres humanos, altas concentrações de cobre podem ter efeitos adversos em várias áreas do organismo, incluindo o trato gastrointestinal, sistema circulatório, sistema cardiovascular, fígado, rins e sistema nervoso (Avram et al., 2021). O contato com sais de cobre, especialmente no caso de

indivíduos que realizam atividades agrícolas que envolvem a pulverização de plantas com compostos contendo cobre, pode resultar em exposição das vias respiratórias, irritação nos olhos e na pele (Avram et al., 2021). Assim, é importante considerar medidas adequadas de proteção e controle da exposição ao cobre para minimizar os riscos potenciais para a saúde humana.

1.2.1.4 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento químico que ocorre em três estados de oxidação, ou seja, como mercúrio elementar (Hg^0), nas formas monovalente (Hg_2^{2+}) e bivalente (Hg^{2+}) (Crespo-López et al., 2021; Raj e Maiti, 2019). Embora o Hg^0 seja muito volátil e estável, com o tempo, pode sofrer alterações químicas (Crespo-Lopez et al., 2021). Os isótopos estáveis do Hg, incluindo ^{196}Hg , ^{198}Hg , ^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg , ^{202}Hg e ^{204}Hg , são suscetíveis a mistura e fracionamento e podem apresentar modificações isotópicas em amostras ambientais, devido a processos naturais, como reações químicas, transporte e deposição de Hg no ambiente (Kwon et al., 2020).

As principais fontes de Hg são classificadas em fontes naturais, fontes antropogênicas e fontes reemitidas (Squadrone et al., 2015). As fontes antropogênicas, que incluem descargas urbanas, materiais agrícolas, queima de combustíveis fósseis e resíduos industriais, são as que mais contribuem à poluição por Hg. A atividade humana desempenha um papel central na liberação de Hg no ambiente, resultando em concentrações elevadas e preocupantes em diversos ecossistemas (Squadrone et al., 2015).

O Hg é reconhecido como um dos elementos mais tóxicos presentes no meio ambiente (Faial et al., 2015; Squadrone et al., 2015). A forma metilada, conhecida como metilmercúrio (MeHg), embora ocorra em baixas concentrações no ambiente, é considerada uma das formas mais citotóxicas e neurotóxicas para humanos e animais. A capacidade do MeHg de causar danos às células e ao sistema nervoso tem sido extensivamente estudada e é motivo de preocupação devido aos seus efeitos prejudiciais à saúde (Faial et al., 2015).

Em seres humanos, a exposição a concentrações elevadas de Hg pode causar diversos quadros clínicos, associados a uma ampla gama de sintomas. Estes sintomas podem afetar vários sistemas do organismo, incluindo o neurológico, renal, respiratório, gastrointestinal, cardiovascular, hepático,

reprodutivo e imunológico. Estima-se que existam cerca de 250 sintomas diferentes relacionados à intoxicação por mercúrio em seres humanos (Andreoli; Sprovieri, 2017).

Às plantas, a exposição a concentrações elevadas Hg pode resultar em uma variedade de efeitos adversos, como diminuição do teor de clorofila e da taxa líquida de fotossíntese, além de danos às membranas lipídicas das células. Os efeitos tóxicos do Hg nas plantas podem se manifestar através de sintomas cloróticos e necróticos, resultando em impactos diretos no crescimento vegetal (Shahid et al., 2020).

1.2.1.5 Níquel

O níquel (Ni) possui número atômico 28 e massa atômica igual a 58,693 u (Genchi et al., 2020). É um metal de transição, que exhibe resistência à corrosão pelo ar e pela água, embora possa ser facilmente dissolvido em ácidos oxidantes diluídos (Bhalerao et al., 2015). Esse elemento apresenta cinco isótopos estáveis, ^{58}Ni , ^{60}Ni , ^{61}Ni , ^{62}Ni e ^{64}Ni (Ratié et al., 2015). Possui ampla gama de estados de oxidação, variando de -1 a +4, sendo os estados mono (Ni^+), bi (Ni^{2+}) e trivalente (Ni^{3+}) os mais comumente encontrados (Genchi et al., 2020). Para os organismos vivos, a espécie Ni^{2+} desempenha papel crucial na atividade da enzima urease, que está presente tanto em plantas como em outros seres vivos (Nielsen, 2021).

O Ni tem diversas aplicações, tais como, em equipamentos elétricos, moedas, ligas metálicas, processamento de alimentos, pigmentos, catalisadores e em componentes de fechos de roupas em geral, como fivelas de cinto, botões de metal, zíperes, bem como, em utensílios domésticos que contenham aço inoxidável (Genchi et al., 2020).

É um micronutriente essencial para plantas, animais e seres humanos. No entanto, em concentrações elevadas, pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento das plantas. Essa interferência está associada à interrupção da absorção de ferro (Fe) e à redução da divisão celular nos meristemas das raízes. Como resultado, o desenvolvimento adequado das plantas é comprometido, o que pode levar à clorose foliar e, posteriormente, à necrose (Bhalerao et al., 2015).

A presença de Ni no ambiente é atribuída ao descarte de resíduos industriais, pois é muito usado em diversos segmentos da indústria, como na metalurgia, devido sua resistência a altas temperaturas, corrosão e oxidação, além de seu baixo custo. Além disso, a contaminação por Ni pode ocorrer pelo uso de água contendo metais pesados para irrigação de áreas agrícolas, bem como, pelo uso excessivo de fertilizantes orgânicos e minerais contaminados (Bhalerao et al., 2015; Genchi et al., 2020).

Indivíduos expostos a concentrações elevadas de Ni no ar, aerossóis ou poeiras enfrentam uma variedade de distúrbios respiratórios, tcomo bronquite e asma, entre outros (Das et al., 2019). Na literatura, também foi relatada uma maior incidência de câncer pulmonar e nasal em pessoas que trabalham em refinarias de níquel (Enterline; Marsh, 1982; Das et al., 2019). Além disso, efeitos neurológicos, como tontura, cansaço e dor de cabeça, foram observados em indivíduos que consumiram água contaminada de forma prolongada (Das et al., 2019).

1.2.2 Remediação de solos e tratamento de efluentes contaminados com metais potencialmente tóxicos

1.2.2.1 *Processos convencionais*

A remediação de solos contaminados com MPT é predominantemente realizada por processos convencionais, baseados em abordagens físico-químicas. Assim, métodos como solidificação e estabilização, vitrificação e lavagem do solo, embora apresentem algumas limitações, como alta demanda energética e modificação da estrutura do solo, continuam sendo utilizados na atualidade (Ashraf et al., 2019).

Solidificação e estabilização, têm por objetivo evitar ou retardar que MPT sejam disponibilizados no solo, utilizando para tanto, como agente de ligação dos metais, para evitar que sejam lixiviados, uma mistura de materiais (Ashraf et al., 2019).

A vitrificação consiste no aquecimento do solo, em alta temperatura, entre 1.400 e 2.000 °C, visando diminuir a mobilidade dos MPT. O aquecimento resulta da passagem de corrente elétrica entre eletrodos que são inseridos no solo (Ashraf et al., 2019; Rajendran et al., 2022).

Outro processo empregado na remediação de solos contaminados com MPT é a lavagem do solo com solventes, como quelantes, ácidos orgânicos e surfactantes. Esse processo consiste na separação do solo fino do mais grosso, o que leva à diminuição do volume de solo contaminado, preparando-o para tratamentos adicionais de descontaminação (Ashraf et al., 2019). A lavagem do solo é realizada, inicialmente, *in situ*, seguida de extração *ex situ* dos MPT do lodo remanescente do solo (Ashraf et al., 2019).

Conforme mencionado, essas técnicas demandam quantidade significativa de energia para serem efetivas, sendo mais adequadas para áreas de pequeno porte com alta concentração de MPT. Além disso, podem ter efeitos prejudiciais ao solo, impactando negativamente sua qualidade, diminuindo a produtividade da área afetada (Ashraf et al., 2019).

Efluentes industriais estão entre as principais fontes antrópicas de MPT, cuja remoção pode ser realizada por processos de precipitação, coagulação-floculação e troca iônica, entre outros. A precipitação química, um dos métodos comumente empregados para remoção destas espécies químicas de águas residuárias em geral, se baseia no tratamento destas águas com agentes precipitantes, como a cal, capazes de formar compostos pouco solúveis com as espécies que se deseja remover. A precipitação de MPT facilita sua remoção da água, seja por decantação ou filtração (Renu et al., 2017; Zamora-Ledezma et al., 2021). Entre as vantagens do processo de precipitação se destacam, o baixo investimento inicial, relativa simplicidade e possibilidade de ser facilmente automatizado (Zamora-Ledezma et al., 2021). Entretanto, há produção de lodo residual contendo compostos com elevada toxicidade e que requer tratamento adicional para remoção e/ou recuperação destes compostos; necessidade do uso de quantidades elevadas de produtos químicos para diminuição dos teores de metais para valores legalmente aceitáveis, além da considerável demanda de tempo (Chaemiso; Nefo, 2019; Zamora-Ledezma et al., 2021).

Outro processo físico-químico que pode ser empregado para a remoção de MPT de águas residuárias é a coagulação-floculação, que consiste em duas etapas distintas. Na primeira etapa, é utilizado um coagulante com o propósito de promover a coalescência de partículas em suspensão, fazendo com que se aglutinem e formem flocos (Teh et al., 2016). Na segunda etapa, promove-se a agitação suave da suspensão para facilitar a aglomeração dos flocos,

possibilitando sua sedimentação e subsequente descarte juntamente com o lodo resultante do processo (Zamora-Ledezma et al., 2021). O processo de coagulação-floculação é relativamente simples e pode ser utilizado tanto como pré-tratamento, pós-tratamento ou como tratamento principal de efluentes contaminados com MPT, removendo de forma eficiente estas espécies (Abdullah et al., 2019; Zamora-Ledezma et al., 2021; Xu et al., 2019). No entanto, como no processo de remoção de MPT por precipitação química, produz lodo tóxicos e consome elevada quantidade de produtos químicos (Abdullah et al., 2019; Zamora-Ledezma et al., 2021).

A remoção de MPT, de águas residuárias, por troca iônica, se baseia na transferência de íons entre uma fase líquida e uma fase sólida, na qual uma substância insolúvel retira íons presentes em uma solução eletrolítica e libera outros íons que possuem carga semelhante e quantidade correspondente (Zamora-Ledezma et al., 2021). Resinas orgânicas sintéticas são comumente utilizadas nesse método para realizar a troca iônica. Quando resina adequada é utilizada, o tratamento por troca iônica pode ser eficaz e econômico para o controle da contaminação por MPT (Chaemiso; Nefo, 2019; Zamora-Ledezma et al., 2021). A troca iônica apresenta várias vantagens, como alta eficiência na remoção de metais, capacidade de tratar efluentes inorgânicos, redução da quantidade de lodo gerado, utilização de materiais de baixo custo e possibilidade de regeneração da resina utilizada durante o processo (Abdullah et al., 2019; Bashir et al., 2019; Zamora-Ledezma et al., 2021). No entanto, essa abordagem também tem desvantagens, incluindo sensibilidade a variações de pH, é adequada apenas para o tratamento de águas contendo pequenas quantidades de metais, incrustação dos metais nos materiais, e custos operacionais elevados (Abdullah et al., 2019; Bashir et al., 2019; Zamora-Ledezma et al., 2021).

1.2.2.2 Biorremediação: aspectos gerais

Atualmente, há uma crescente necessidade de adotar técnicas sustentáveis para a remoção de MPT. Na biorremediação os poluentes são removidos do solo ou convertidos em espécies químicas menos tóxicas por microrganismos e/ou plantas (Pratish et al., 2018; Rajendran et al., 2022). Esse processo pode ocorrer de maneira natural ou por meio da adição de nutrientes para estimular o crescimento de microrganismos ou outros fatores que

favoreçam a degradação ou transformação dos poluentes (Pratish et al., 2018; Rajendran et al., 2022). Esta abordagem é considerada mais sustentável comparada a técnicas convencionais de tratamento, pois se baseia em processos biológicos naturais, que não requerem o uso de produtos químicos agressivos e gera menos resíduos tóxicos (Pratish et al., 2018; Rajendran et al., 2022).

A biorremediação de solos pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*. A realização *in situ* minimiza a necessidade de remoção e transporte de grandes volumes de solo contaminado. Isso reduz custos e simplifica a logística envolvida no processo de tratamento, além de minimizar potenciais impactos adicionais ao ambiente (Rajendran et al., 2022; Verma; Kuila, 2019). Além disso, o emprego do processo *in situ* reduz o risco de rompimento do solo durante o transporte e diminui a exposição do solo a poluentes durante o percurso (Rajendran et al., 2022). No entanto, o processo *in situ* depende das condições ambientais, da concentração e natureza dos metais presentes, bem como, das características dos microrganismos ou plantas utilizados (Medfu Tarekegn et al., 2020).

A biorremediação *ex situ* envolve o transporte do solo contaminado para uma instalação externa, onde ocorrerá o seu tratamento (Rajendran et al., 2022; Verma; Kuila, 2019), que é realizado em biorreatores e biopilhas, aos quais adiciona-se mistura de água e aditivos. As condições do reator devem ser cuidadosamente controladas para que o ambiente seja propício ao crescimento microbiano e à adaptabilidade da biomassa (Kapahi; Sachdeva, 2019). O transporte do solo contaminado para a instalação de tratamento pode acarretar contaminação adicional do solo durante o processo, e deformação da sua estrutura, devido às operações de escavação, transporte e reposição do solo tratado. Essa deformação pode alterar as características físicas e químicas do solo, afetando sua capacidade de sustentar o crescimento vegetal e outras funções ambientais (Rajendran et al., 2022). Outra desvantagem do processo *ex situ* é o custo, que geralmente é mais elevado em comparação ao *in situ*, devido à necessidade de realizar a extração do solo contaminado, seu transporte para a instalação de tratamento e, posteriormente, a reposição do solo tratado no local original (Rajendran et al., 2022).

A biorremediação de solos engloba diversas técnicas, como, bioventilação e bioestimulação. Cada técnica requer análise cuidadosa, levando em

consideração a presença ou ausência de microrganismos capazes de degradar os poluentes, a quantidade desses microrganismos no solo, o tipo de solo, o pH, bem como, a disponibilidade de oxigênio e nutrientes (Medfu Tarekegn et al., 2020). A bioventilação envolve o fornecimento de ar ou oxigênio ao solo contaminado para estimular a atividade microbiana e a degradação de poluentes biodegradáveis. A bioestimulação, por sua vez, envolve o fornecimento de nutrientes e outros compostos para estimular o crescimento e a atividade dos microrganismos presentes no solo, os quais degradam poluentes biodegradáveis ali presentes (Medfu Tarekegn et al., 2020).

A textura do solo desempenha papel importante na eficácia das técnicas bioventilação e bioestimulação (Kapahi; Sachdeva, 2019). Quando o solo possui textura mais grossa e estrutura menos porosa, o bombeamento de oxigênio e a dispersão dos nutrientes são mais difíceis. Em solos com textura mais fina e estrutura mais porosa, a injeção de oxigênio e a dispersão de nutrientes são mais eficientes (Kapahi; Sachdeva, 2019). Solos de textura grossa podem exigir estratégias adicionais para melhorar a distribuição do oxigênio e dos nutrientes, como a utilização de agentes dispersantes ou a alteração da composição do meio de injeção (Cambi et al., 2015). Ao considerar a textura do solo, é possível otimizar as técnicas de bioventilação e bioestimulação, adaptando-as às características específicas do solo contaminado (Sales da Silva et al., 2020).

Conforme já descrito, a biorremediação de solos contaminados com MPT, pode ser realizada por microrganismos presentes no próprio solo, que apresentem tolerância a estes elementos e consigam removê-los deste compartimento ambiental, diminuindo os seus teores para valores menos tóxicos (Verma; Kuila, 2019; Pratush et al., 2018). Para tanto, os microrganismos desenvolvem e adotam diferentes mecanismos de desintoxicação, como bioacumulação, bioissorção e biotransformação (Fernández et al., 2018).

A bioissorção ou ligação extracelular é um mecanismo rápido de captação de íons metálicos pela superfície celular, por meio do qual, tais íons aderem a moléculas presentes na superfície das células. A ligação entre esses íons e moléculas da parede celular é devida a um dos processos a seguir: adsorção física, forças de van der Waals, troca iônica, complexação e microprecipitação inorgânica, ou à sua combinação (Elgarahy et al., 2021; Pokethitiyook; Poolpak, 2016; Pratush et al., 2018).

O mecanismo de bioacumulação envolve células vivas e ocorre em duas etapas, sendo a primeira etapa idêntica à biossorção, cuja captação de íons metálicos pela superfície celular é rápida, conforme já mencionado, e independente do metabolismo celular. A segunda etapa, a qual é relativamente lenta, depende do metabolismo celular, sendo responsável pela penetração/transporte de íons metálicos, liberados dos sítios de ligação da superfície, para dentro da célula, com a ligação desses íons a estruturas intracelulares (Timková et al., 2018).

A bioacumulação ocorre quando a taxa de absorção do contaminante é maior do que a taxa de “perda”, fazendo com que o contaminante fique retido e se acumule dentro do microrganismo (Medfu Tarekegn et al., 2020). Este processo é considerado toxicocinético, afetando a sensibilidade do microrganismo vivo quando está na presença de espécies químicas que apresentam potencial de toxicidade (Medfu Tarekegn et al., 2020). Usualmente os microrganismos possuem certa resistência a determinadas concentrações de contaminantes. Assim, quando ocorre aumento na concentração estabelecida como mínima, o contaminante se torna tóxico para o microrganismo, acarretando alterações no seu desenvolvimento. Portanto, a sensibilidade pode variar bruscamente dependendo do tipo de microrganismo e do poluente (Medfu Tarekegn et al., 2020; Mishra; Malik, 2013).

O emprego de microrganismos para biorremediação de águas residuárias contendo MPT, baseado em mecanismo de bioacumulação, tem que considerar alguns critérios relevantes. É importante que o microrganismo tenha sido previamente isolado de ambientes contaminados, pois sua capacidade de acumulação de poluentes é potencializada quando ele está adaptado à presença destes. Além disso, é necessário que o microrganismo seja resistente a concentrações elevadas de poluentes (Diep et al., 2018) e tenha capacidade de biotransformação, para converter o contaminante a uma forma química menos tóxica (Medfu Tarekegn et al., 2020; Mishra; Malik, 2013). A biotransformação envolve reações de oxidação-redução, metilação e desmetilação, que podem ocorrer nos vacúolos, na superfície celular ou no meio extracelular. Há relatos na literatura de bactérias gram-positivas que reduzem Cr^{6+} , muito tóxico para a maioria dos microrganismos, em Cr^{3+} , que é menos tóxico (Medfu Tarekegn et al., 2020; Kisielowska et al., 2010).

A biorremediação de efluentes contendo MPT pode ser realizada por bactérias, fungos e algas, seja por processo ativo e/ou por bioissorção (processo passivo) (Medfu Tarekegn et al., 2020). A eficiência da bioissorção está relacionada a capacidade do bioissorvente em adsorver de forma efetiva os poluentes. Esse processo pode envolver troca iônica, baseada na substituição de prótons (íons H^+) de sítios de adsorção, como grupos hidroxila, carbonila e carboxila, entre outros, presentes na superfície do bioissorvente, por íons metálicos potencialmente tóxicos da fase líquida (Elgarahy et al., 2021). Uma das vantagens da bioissorção, comparada a outros processos de remoção de MPT de águas residuárias, é a possibilidade de recuperação desses metais devido a reversibilidade do processo (Medfu Tarekegn et al., 2020). A dessorção, que é realizada empregando-se soluções ácidas, como $HCl(aq)$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ou agentes complexantes, como solução do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), possibilita a recuperação dos metais adsorvidos, sendo lucrativa, em especial, quando se trata de metais como ouro, cobre e zinco (Medfu Tarekegn et al., 2020; Sklodowska, 2000).

1.2.3 Utilização de bactérias para biorremediação de metais potencialmente tóxicos

Diversas bactérias passaram por processo evolutivo por meio do qual adquiriram capacidade de metabolizar uma variedade de contaminantes e subprodutos orgânicos, para produzir dióxido de carbono (CO_2) ou metano (CH_4) como fonte de energia (Sharma et al., 2021), assim como, de imobilizar íons de MPT.

O pH do meio que contém o(s) MPT é uma das variáveis mais importantes para a efetividade das bactérias em processos de descontaminação ambiental, pois afeta a solubilidade destes contaminantes (Ojuederie; Babalola, 2017). Além disso, uma vez que a maioria dos processos de bioconversão de metais, depende de enzimas, se o pH do meio é desfavorável às enzimas, há redução na eficiência do microrganismo para remediar os poluentes presentes no ambiente (Jacob et al., 2018). Assim, de acordo com a literatura, *Escherichia coli* (Samuel et al., 2012; Jacob et al., 2018), *Cellulosimicrobium funkei* (Karthik et al., 2017a; Jacob et al., 2018) e *Micrococcus luteus* (Puyen et al., 2012; Jacob et al., 2018), foram capazes de diminuir a biodisponibilidade de metais, em meio

neutros, devido à atividade enzimática, que, nesta condição de pH, aumenta a capacidade dos microrganismos em biorremediar os contaminantes de forma efetiva (Jacob et al., 2018). Em ensaios *in vitro*, *Klebsiella* sp. CPSB4 apresentou capacidade para a máxima redução de Cr^{6+} , em $\text{pH} = 7,0$. Apesar do estresse devido a presença de Cr^{6+} no meio, a cepa produziu substâncias promotoras de crescimento vegetal, sinalizando sua capacidade de melhorar a tolerância das plantas a essa espécie química (Gupta et al., 2018).

Durante o cultivo de *Cupriavidus* sp. Cd02., por 144 h, observou-se aumento significativo do pH do meio, de 7,4 para 8,6 (Li et al., 2019). Esta variação de pH também ocorreu no cultivo da bactéria em meio contendo Cd^{2+} . No entanto, na presença de 4,0 e 6,0 mg Cd^{2+} L, o aumento do pH foi menor, possivelmente, devido à toxicidade do Cd^{2+} às células bacterianas (Li et al., 2019). De acordo com Limcharoensuk et al. (2015) e Li et al. (2019), o aumento do pH do meio de cultivo, promovido pelas cepas de *Cupriavidus* sp. Cd02 e *Cupriavidus taiwanensis* E324, favoreceu a biossorção e bioacumulação do Cd^{2+} , em razão do aumento do grau de ionização dos sítios de adsorção presentes na superfície das células bacterianas. Consequentemente, haverá mais cargas negativas na superfície celular, favorecendo a biossorção de cátions metálicos, como Cd^{2+} .

Há bactérias capazes de produzir espécies químicas que precipitam íons metálicos potencialmente tóxicos, diminuindo sua mobilidade e disponibilidade no ambiente. A bactéria *Desulfovibrio desulfuricans*, por exemplo, pode reduzir sulfato (SO_4^{2-}) à hidrogenossulfeto (HS^-), o qual forma sulfetos metálicos insolúveis (Ojuederie; Babalola, 2017; Chibuike; Obiora, 2014).

O emprego de consórcios bacterianos em processos de biorremediação pode ser uma alternativa mais interessante e promissora comparada ao uso de uma única bactéria. Dentro deste contexto, o consórcio de *Viridibacillus arenosi* B-21, *Sporosarcina soli* B-33, *Enterobacter cloacae* KJ-46 e *E. cloacae* KJ-47 teve efeito sinérgico significativo na biorremediação de Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} (Kang et al., 2016). O consórcio apresentou resultados positivos em termos de resistência e eficiência dos MPT em comparação com a utilização de apenas uma bactéria. As eficiências de remoção de Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} , alcançadas com o consórcio, foram 98,3; 85,4 e 5,6%, respectivamente (Ojuederie; Babalola, 2017).

Certas bactérias possuem capacidade de produzir quelantes de ferro, denominados sideróforos, os quais desempenham papel crucial na amplificação da mobilidade e na diminuição da biodisponibilidade dos metais, resultando na remoção deles do solo (Ahmed; Holmström, 2014). Algumas bactérias possuem mecanismos genéticos específicos que desempenham papel crucial em sua capacidade de descontaminação ambiental. Cepas bacterianas como *Bacillus* e *Pseudomonas* sp. são amplamente estudadas devido à sua capacidade de remover eficientemente metais pesados de efluentes e solos contaminados. Essa capacidade é atribuída à alta afinidade dessas bactérias por íons metálicos, através de mecanismos de biossorção e bioacumulação (Jacob et al., 2018). São bactérias que podem sintetizar sideróforos e exopolissacarídeos, os quais têm grupos funcionais capazes de se ligar seletivamente a íons metálicos, formando complexos estáveis. Esses complexos são então internalizados pelas células bacterianas e armazenados em compartimentos intracelulares, permitindo a remoção eficiente dos metais do ambiente contaminado (Jacob et al., 2018).

1.2.4 Associação de bactérias com plantas fitorremediadoras

A biorremediação de solos contaminados com MPT pode ser realizada por plantas que apresentam capacidade de tolerá-los e removê-los do solo (Ashraf et al., 2019; Zhang et al., 2020). As plantas consideradas hiperacumuladoras são tolerantes a concentrações relativamente altas de MPT, absorvendo-os através das raízes e transportando-os até as partes aéreas, como folhas e caules (Gavrilescu, 2022). Nesses tecidos vegetais, ocorre acúmulo dos metais, alcançando níveis superiores aos normalmente encontrados em outras espécies. Esse fenômeno se deve a mecanismos fisiológicos e bioquímicos peculiares que conferem às hiperacumuladoras a habilidade de tolerar e se beneficiar de MPT (Gavrilescu, 2022; Ferrero; Walsh; Rajakaruna, 2020). Tais plantas são consideradas hipertolerantes a MPT, possuindo as qualidades necessárias para absorvê-los do solo, aptidão para translocá-los da raiz para o caule e folhas, além de capacidade para sobreviver em ambientes contaminados com MPT, sendo sua taxa de acúmulo superior, quando comparada à de outras plantas (Mahardika et al., 2018).

Várias plantas que dispõem de mecanismos distintos ao serem expostas a MPT (Sumiahadi; Acar, 2018) e dentre estas, está relatado na literatura, o

potencial de plantas ornamentais, como *Petunia hybrida* e *Carpobrotus rossii* (nativa da Austrália) para acumular Cd^{2+} (Khan et al., 2021); de *Helianthus annuus* L. para absorver, estabilizar e fitoextrair este íons metálico (Chauhan; Mathur, 2020), bem como, para diminuir o teor de Cr^{3+} do solo, em especial na presença de rizobactérias tolerantes ao Cr^{3+} (Bahadur et al., 2017); de *Brassica juncea* para promover a recuperação de solo contendo Cr^{3+} e Ni^{2+} (Gayatri et al., 2019); do plantio de *Hibiscus cannabinus* L. e de *Linum usitatissimum* L. para a remediação de solo contaminado com Cd^{2+} e Cr^{3+} (Shehata et al., 2019). Dentre as famílias de plantas que se destacam como hiperacumuladoras estão *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae* e *Lamiaceae* (Ullah et al., 2015; Kong; Glick, 2017).

Dentre as plantas citadas, o girassol (*Helianthus annuus*), que é uma planta dicotiledônea anual, pertencente à família Asteraceae, adaptável a diferentes condições edafoclimáticas (Alaboudi et al., 2018; da Silva Araújo et al., 2018), tem características típicas de plantas hiperacumuladoras de MPT, ou seja, apresenta rápido crescimento, elevada capacidade de produção de biomassa e capacidade para acumular elementos como Cd, Ni, Cu e Hg, entre outros, principalmente no sistema radicular (Chauhan; Mathur, 2018). Além disso, a semente de girassol pode ser utilizada a fim de fazer óleo, devido ao fato dos metais serem mais encontrados nas folhas e raízes, quando comparado a quantidade nas sementes.

A abordagem de fito e/ou biorremediação tem sido amplamente considerada como uma estratégia promissora para diminuir a concentração de MPT e outros contaminantes em ambientes poluídos. A fitoextração, que envolve a utilização de plantas para remover contaminantes do solo e da água, pode ser otimizada com o emprego de microrganismos (Mello et al., 2020). A presença de microrganismos no sistema radicular das plantas pode facilitar a solubilização e a disponibilidade dos contaminantes, tornando-os mais acessíveis para a fitoextração (Zhang; Zhou; Chen, 2019). Além disso, microrganismos simbióticos ou associados às plantas podem potencializar a capacidade de remediação ao participarem de processos como bioacumulação e biotransformação dos poluentes (Dixit et al., 2015). A combinação da fitorremediação e biorremediação oferece uma abordagem integrada e sustentável para o tratamento de ambientes contaminados, contribuindo para a

restauração ecológica e a melhoria da qualidade ambiental (Zhang; Zhou; Chen, 2019; Mello et al., 2020).

Os microrganismos endofíticos desempenham papel de relevância significativa, pois estabelecem uma colonização assintomática nos tecidos internos das plantas. Essa simbiose proporciona benefícios diversos, como a promoção do crescimento vegetal e a atenuação dos efeitos adversos decorrentes da presença de MPT no ambiente (Zhang; Zhou; Chen, 2019; Mello et al., 2020). Bactérias dos gêneros *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium* e *Gluconacetobacter*, apresentam capacidade de promover o crescimento vegetal por meio de associações simbióticas (Ullah et al., 2015).

Embora a utilização de plantas em processos de biorremediação de ambientes contaminados com MPT seja uma alternativa sustentável, o fato de os metais removidos do ambiente não serem degradados, levanta preocupações quanto à destinação final da biomassa contaminada (Vocciante et al., 2019). O descarte direto da biomassa contaminada, requer a sua deposição em local apropriado, demandando maior investimento financeiro (Ferronato; Torretta, 2019). Diversas alternativas para a destinação da biomassa, tais como, compostagem, compactação, incineração, lixiviação e pirólise, foram propostas por Vocciante e colaboradores (2019).

A compostagem propicia diminuição da quantidade de água contida na biomassa e, conseqüentemente, do seu volume, mas requer equipamento especial e vários meses (Rezania et al., 2015). A compactação, também promove diminuição do volume de biomassa, porém o produto pode apresentar algum grau de toxicidade, sendo considerado resíduo perigoso (Rezania et al., 2015). A incineração da biomassa, análoga ao processo de pirólise, envolve a degradação térmica do material, com potencial para a produção de energia, todavia, deve-se estar atento às quantidades de metais volatilizados durante o processo (Wienchol; Szlęk; Ditaranto, 2020). O processo de lixiviação, implica em fácil eliminação de resíduos e na possibilidade de recuperação dos metais, a qual requer alto investimento. A pirólise, também propicia redução do volume e teor de água da biomassa, sendo realizada em condições de temperatura que não permitem a volatilização dos metais, assegurando maior controle sobre o seu destino. Entretanto, na pirólise não ocorre alta produção de energia,

considerando o baixo calor calorífico do processo (Vocciante et al., 2019; Sas-Nowosielska et al., 2004).

Portanto, ressalta-se a necessidade de planejar a destinação da biomassa residual, para que MPT presentes na sua composição, não retornem para o ambiente e o processo de biorremediação seja ineficaz.

1.3 Referências bibliográficas

ABDU, N., ABDULLAHI, A. A., ABDULKADIR, A. Heavy metals and soil microbes. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 65–84, mar. 2017.

ABDULLAH, N., YUSOF, N., LAU, W. J., JAAFAR, J., & ISMAIL, A. F. Recent trends of heavy metal removal from water/wastewater by membrane technologies. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 76, p. 17–38, 2019.

AHMED, E., HOLMSTRÖM, S. J. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

ALI, M., SONG, X., DING, D., WANG, Q., ZHANG, Z., & TANG, Z. Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: Challenges and enhancement strategies. **Environmental Pollution**, p. 118686, 2021.

ALI, H., KHAN, E. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 6–19, 2018.

ALIZADEH, A. M. et al. Mitigation of potentially toxic elements (PTEs) in food products by probiotic bacteria: a comprehensive review. **Food Research International**, p. 110324, 2021.

ANDREOLI, V., SPROVIERI, F. Genetic aspects of susceptibility to mercury toxicity: an overview. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 1, p. 93, 2017.

ANYANWU, E. D. An index approach to heavy metal pollution assessment of Eme River, Umuahia, Nigeria. **Sustainability, Agri, Food and Environmental Research**, 1 jul. 2020.

ASHRAF, S., ALI, Q., ZAHIR, Z. A., ASHRAF, S., & ASGHAR, H. N. Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 174, p. 714–727, 2019.

ASSESSMENT, E. Guidelines for exposure assessment. **Federal Register**, v. 57, n. 104, p. 22888–938, 1992.

AVRAM, O. R., CARAGEA, G., VARZARU, C. A. Copper and its role in the human body—the importance of establishing copper concentrations in the body. **Romanian Journal of**, v. 124, n. 2, p. 254, 2021.

AWA, S. H., HADIBARATA, T. Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 2, p. 47, 2020.

BALTER, V. et al. Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 4, p. 982–985, 2015.

BASHIR, A., MALIK, L. A., AHAD, S., MANZOOR, T., BHAT, M. A., DAR, G. N., & PANDITH, A. H. Removal of heavy metal ions from aqueous system by ion-exchange and biosorption methods. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 2, p. 729–754, 2019.

BHALERAO, S. A., SHARMA, A. S., POOJARI, A. C. Toxicity of nickel in plants. **International Journal of Pure and Applied Bioscience**, v. 3, n. 2, p. 345–355, 2015.

BROWN, P. H. Nickel. In: **Handbook of Plant Nutrition**. [s.l.] CRC Press, 2016. p. 411–426.

CAMBI, M., CERTINI, G., NERI, F., & MARCHI, E. The impact of heavy traffic on forest soils: A review. **Forest Ecology and Management**, v. 338, p. 124–138, 2015.

CHAEMISO, T. D.; NEFO, T. Removal methods of heavy metals from laboratory wastewater. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 9, n. 2, p. 36–42, 2019.

CHIBUIKE, G. U., OBIORA, S. C. Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2014, 2014.

CRESPO-LOPEZ, M. E., AUGUSTO-OLIVEIRA, M., LOPES-ARAÚJO, A., SANTOS-SACRAMENTO, L., TAKEDA, P. Y., DE MATOS MACCHI, B., NASCIMENTOM J. L. M., MAIA, C. S. F., LIMA, R. R., ARRIFANO, G. P. Mercury: What can we learn from the Amazon? **Environment International**, v. 146, p. 106223, 2021.

DAS, K. K., REDDY, R. C., BAGOJI, I. B., DAS, S., BAGALI, S., MULLUR, L., KHODNAPUR, J., P. & BIRADAR, M. S. Primary concept of nickel toxicity—an overview. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 141–152, 2019.

DE LEÓN-GÓMEZ, H., MARTIN DEL CAMPO-DELGADO, M. A., ESTELLER-ALBERICH, M. V., VELASCO-TAPIA, F., ALVA-NIÑO, E., & CRUZ-LÓPEZ, A. Assessment of nitrate and heavy metal contamination of groundwater using the heavy metal pollution index: case study of Linares, Mexico. **Environmental Earth Sciences**, v. 79, n. 18, p. 1–19, 2020.

DENOYER, D., PEARSON, H. B., CLATWORTHY, S. A., SMITH, Z. M., FRANCIS, P. S., LLANOS, R. M., ... & CATER, M. A. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’. **Metallomics**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, 2015.

DIEP, P., MAHADEVAN, R., YAKUNIN, A. F. Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 157, 2018.

DIXIT, R., WASIULLAH, X., MALAVIYA, D., PANDIYAN, K., SINGH, U. B., SAHU, A., SHUKLA R., SINGH. B. P., RAI, J. P., SHARMA, P. K., LADE, H., PAUL, D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability**, v. 7, n. 2, p. 2189–2212, 2015.

DOBRIKOVA, A. G., APOSTOLOVA, E. L., HANĆ, A., YOTSOVA, E., BORISOVA, P., SPERDOULI, I., ADAMAKIS, I-D., S. & MOUSTAKAS, M. Cadmium toxicity in *Salvia sclarea* L.: An integrative response of element uptake,

oxidative stress markers, leaf structure and photosynthesis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111851, 2021.

ELGARAHY, A. M., ELWAKEEL, K. Z., MOHAMMAD, S. H., & ELSHOUBAKY, G. A. A critical review of biosorption of dyes, heavy metals and metalloids from wastewater as an efficient and green process. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 4, p. 100209, 2021.

ERTANI, A., MIETTO, A., BORIN, M., & NARDI, S. Chromium in agricultural soils and crops: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 5, p. 190, 2017.

FAIAL, K., DEUS, R., DEUS, S., NEVES, R., JESUS, I., SANTOS, E., ALVES, C., N., BRASIL, D. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: Fish consumption as a possible route of exposure. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 66–76, 2015.

FERRERO, A. L.; WALSH, P. R.; RAJAKARUNA, N. The ecophysiology, genetics, adaptive significance, and biotechnology of nickel hyperaccumulation in plants. In: **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 327–347.

FERNÁNDEZ, P. M., VIÑARTA, S. C., BERNAL, A. R., CRUZ, E. L., & FIGUEROA, L. I. Bioremediation strategies for chromium removal: current research, scale-up approach and future perspectives. **Chemosphere**, v. 208, p. 139–148, 2018.

FLORA, S. J., AGRAWAL, S. Arsenic, cadmium, and lead. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 537–566.

ENTERLINE, P. E., MARSH, G. M. Mortality among workers in a nickel refinery and alloy manufacturing plant in West Virginia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 68, n. 6, p. 925–933, 1982.

GAVRILESCU, M. Enhancing phytoremediation of soils polluted with heavy metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 21–31, 2022.

GENCHI, G., SINICROPI, M. S., LAURIA, G., CAROCCI, A., & CATALANO, A. The effects of cadmium toxicity. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 11, p. 3782, 2020.

GUPTA, P., KUMAR, V., USMANI, Z., RANI, R., & CHANDRA, A. Phosphate solubilization and chromium(VI) remediation potential of *Klebsiella* sp. strain CPSB4 isolated from the chromium contaminated agricultural soil. **Chemosphere**, v. 192, p. 318–327, 2018.

HAN, B., WEATHERLEY, A. J., MUMFORD, K., BOLAN, N., HE, J. Z., STEVENS, G. W., & CHEN, D. Modification of naturally abundant resources for remediation of potentially toxic elements: A review. **Journal of Hazardous Materials**, p. 126755, 2021.

HAGHNAZAR, H., HUDSON-EDWARDS, K. A., KUMAR, V., POURAKBAR, M., MAHDAVIANPOUR, M., & AGHAYANI, E. Potentially toxic elements contamination in surface sediment and indigenous aquatic macrophytes of the Bahmanshir River, Iran: Appraisal of phytoremediation capability. **Chemosphere**, v. 285, p. 131446, 2021.

HAUSLADEN, D. M., ALEXANDER-OZINSKAS, A., MCCLAIN, C., & FENDORF, S. Hexavalent chromium sources and distribution in California groundwater. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 15, p. 8242–8251, 2018.

JACOB, J. M., KARTHIK, C., SARATALE, R. G., KUMAR, S. S., PRABAKAR, D., KADIRVELU, K., & PUGAZHENDHI, A. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: a survey of literature. **Journal of environmental management**, v. 217, p. 56–70, 2018.

JIN, Z.; LV, J. Evaluating source-oriented human health risk of potentially toxic elements: A new exploration of multiple age groups division. **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147502, 2021.

JOSEPH, L., JUN, B. M., FLORA, J. R., PARK, C. M., & YOON, Y. Removal of heavy metals from water sources in the developing world using low-cost materials: A review. **Chemosphere**, v. 229, p. 142–159, 2019.

KANG, C.-H., KWON, Y.-J., SO, J.-S. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. **Ecological Engineering**, v. 89, p. 64–69, 2016.

KAPAHI, M., SACHDEVA, S. Bioremediation options for heavy metal pollution. **Journal of Health and Pollution**, v. 9, n. 24, 2019.

KARTHIK, C., BARATHI, S., PUGAZHENDHI, A., RAMKUMAR, V. S., THI, N. B. D., & ARULSELVI, P. I. Evaluation of Cr(VI) reduction mechanism and removal by *Cellulosimicrobium funkei* strain AR8, a novel haloalkaliphilic bacterium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 333, p. 42–53, 2017.

KHAN, A., KHAN, S., KHAN, M. A., QAMAR, Z., & WAQAS, M. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. **Environ Sci Pollut Res**, p. 28, 2015.

KISIELOWSKA, E., HOŁDA, A., NIEDOBA, T. Removal of heavy metals from coal medium with application of biotechnological methods. **Górnictwo i Geoinżynieria**, v. 34, p. 93–104, 2010.

KRSTIĆ, V., UROŠEVIĆ, T., PEŠOVSKI, B. A review on adsorbents for treatment of water and wastewaters containing copper ions. **Chemical Engineering Science**, v. 192, p. 273–287, 2018.

KUMAR, B., SMITA, K., FLORES, L. C. Plant mediated detoxification of mercury and lead. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2335–S2342, 2017.

KONG, F., CHEN, Y., HUANG, L., YANG, Z., & ZHU, K. Human health risk visualization of potentially toxic elements in farmland soil: A combined method of source and probability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p. 111922, 2021.

KONG, Z., GLICK, B. R. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. **Advances in Microbial Physiology**, v. 71, p. 97–132, 2017.

LI, F., ZHENG, Y., TIAN, J., GE, F., LIU, X., TANG, Y., & FENG, C. *Cupriavidus* sp. strain Cd02-mediated pH increase favoring bioprecipitation of Cd²⁺ in medium and reduction of cadmium bioavailability in paddy soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109655, 2019.

LI, X., WEI, Z., LI, B., LI, J., LV, H., WU, L., ZHANG, H., YANG, B., ZHU, M. & JIANG, J. In vivo migration of Fe₃O₄ @polydopamine nanoparticle-labeled

mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a rat model. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 7, p. 2861–2872, 2019.

LIU, S. H., ZENG, G. M., NIU, Q. Y., LIU, Y., ZHOU, L., JIANG, L. H., TAN, X., XU, P., ZHANG, C., & CHENG, M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 25–33, 2017.

LUKINA, A. O., BOUTIN, C., ROWLAND, O., & CARPENTER, D. J. Evaluating trivalent chromium toxicity on wild terrestrial and wetland plants. **Chemosphere**, v. 162, p. 355–364, 2016.

MEDFU TAREKEGN, M., ZEWDU SALILIH, F., ISHETU, A. I. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1783174, 2020.

MELLO, I. S., TARGANSKI, S., PIETRO-SOUZA, W., STACHACK, F. F. F., TEREZO, A. J., & SOARES, M. A. Endophytic bacteria stimulate mercury phytoremediation by modulating its bioaccumulation and volatilization. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, p. 110818, 2020.

MISHRA, A.; MALIK, A. Recent advances in microbial metal bioaccumulation. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 43, n. 11, p. 1162–1222, 2013.

MONDAL, M., BISWAS, J. K., TSANG, Y. F., SARKAR, B., SARKAR, D., RAI, M., SARKAR, S. K., HOODA, P. S. A wastewater bacterium *Bacillus* sp. KUJM2 acts as an agent for remediation of potentially toxic elements and promoter of plant (*Lens culinaris*) growth. **Chemosphere**, v. 232, p. 439–452, 2019.

NIELSEN, F. Nickel. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 281, 2021.

OJUEDERIE, O. B.; BABALOLA, O. O. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1504, 2017.

PALANSOORIYA, K. N., SHAHEEN, S. M., CHEN, S. S., TSANG, D. C., HASHIMOTO, Y., HOU, D., HOU, D., BOLAN, N. S., RINKLEBE, J. & OK, Y. S.

Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils: A critical review. **Environment International**, v. 134, p. 105046, 2020.

PRATUSH, A.; KUMAR, A.; HU, Z. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. **International Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 97–106, 2018.

PAVESI, T., MOREIRA, J. C. Mechanisms and individuality in chromium toxicity in humans. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1183–1197, 2020.

POKETHITIYOOK, P.; POOLPAK, T. Biosorption of heavy metal from aqueous solutions. **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 3**, p. 113–141, 2016.

POZNANOVIĆ SPAHIĆ, M. M., SAKAN, S. M., GLAVAŠ-TRBIĆ, B. M., TANČIĆ, P. I., ŠKRIVANJ, S. B., KOVAČEVIĆ, J. R., & MANOJLOVIĆ, D. D. Natural and anthropogenic sources of chromium, nickel and cobalt in soils impacted by agricultural and industrial activity (Vojvodina, Serbia). **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 54, n. 3, p. 219–230, 2019.

POURRET, O., HURSTHOUSE, A. It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, p. 4446, 2019.

PRASAD, S., YADAV, K. K., KUMAR, S., GUPTA, N., CABRAL-PINTO, M. M., REZANIA, S., RADWAN, N. & ALAM, J. Chromium contamination and effect on environmental health and its remediation: A sustainable approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 285, p. 112174, 2021.

PUYEN, Z. M., VILLAGRASA, E., MALDONADO, J., DIESTRA, E., ESTEVE, I., & SOLÉ, A. Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 233–237, 2012.

RAHIMZADEH, M. R., RAHIMZADEH, M. R., KAZEMI, S., & MOGHADAMNIA, A. A. Cadmium toxicity and treatment: An update. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 135, 2017.

RAJ, D.; MAITI, S. K. Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 9, p. 1–22, 2019.

RAJENDRAN, S., PRIYA, T. A. K., KHOO, K. S., HOANG, T. K., NG, H. S., MUNAWAROH, H. S. H., KARAMAN, C., OROOJI, Y. & SHOW, P. L. A critical review on various remediation approaches for heavy metal contaminants removal from contaminated soils. **Chemosphere**, v. 287, p. 132369, 2022.

RATIÉ, G., JOUVIN, D., GARNIER, J., ROUXEL, O., MISKA, S., GUIMARÃES, E., CRUZ VIEIRA, L., SIVRY, Y., ZELANO, I., MONTARGES-PELLETIER, E., THILL, F. & QUANTIN, C. Nickel isotope fractionation during tropical weathering of ultramafic rocks. **Chemical Geology**, v. 402, p. 68–76, 2015.

RENU; AGARWAL, M.; SINGH, K. Methodologies for removal of heavy metal ions from wastewater: an overview. **Interdisciplinary Environmental Review**, v. 18, n. 2, p. 124–142, 2017.

RIZWAN, M., ALI, S., ABBAS, T., ZIA-UR-REHMAN, M., HANNAN, F., KELLER, C., AL- WABEL, M. I. & OK, Y. S. Cadmium minimization in wheat: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 43–53, 2016.

ROMERO-BAENA, A. J., BARBA-BRIOSO, C., ROSS, A., GONZÁLEZ, I., & APARICIO, P. Mobility of potentially toxic elements in family garden soils of the Riotinto mining area. **Applied Clay Science**, v. 203, p. 105999, 2021.

ROSEBURROUGH, R., WANG, X. Chromium stable isotope geochemistry in the Mobile Bay Estuary. **Chemical Geology**, v. 584, p. 120530, 2021.

SANDEEP, G., VIJAYALATHA, K., ANITHA, T. Heavy metals and its impact in vegetable crops. **International Journal of Chemical Studies**, p. 11, [s.d.].

SAMUEL, J., PAUL, M. L., PULIMI, M., NIRMALA, M. J., CHANDRASEKARAN, N., & MUKHERJEE, A. Hexavalent chromium bioremoval through adaptation and consortia development from Sukinda chromite mine isolates. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 9, p. 3740–3749, 2012.

SALES DA SILVA, I. G., GOMES DE ALMEIDA, F. C., PADILHA DA ROCHA E SILVA, N. M., CASAZZA, A. A., CONVERTI, A., & ASFORA SARUBBO, L. Soil

bioremediation: Overview of technologies and trends. **Energies**, v. 13, n. 18, p. 4664, 2020.

SINGH, P.; ITANKAR, N.; PATIL, Y. Biomanagement of hexavalent chromium: current trends and promising perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 111547, 2021.

SHARMA, H., RAWAL, N., MATHEW, B. B. The characteristics, toxicity and effects of cadmium. **International Journal of Nanotechnology and Nanoscience**, v. 3, p. 1–9, 2015.

SHARMA, P., PANDEY, A. K., KIM, S. H., SINGH, S. P., CHATURVEDI, P., & VARJANI, S. Critical review on microbial community during in-situ bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 101826, 2021.

SHARMA, P. Efficiency of bacteria and bacterial assisted phytoremediation of heavy metals: An update. **Bioresource Technology**, v. 328, p. 124835, maio 2021.

SHAHID, M., KHALID, S., BIBI, I., BUNDSCHUH, J., NIAZI, N. K., & DUMAT, C. A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134749, 2020.

SHEKHAWAT, K., CHATTERJEE, S., & JOSHI, B. Chromium toxicity and its health hazards. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 7, p. 167–172, 2015.

SKŁODOWSKA, A. Biologiczne metody ługowania metali ciężkich-biohydrometalurgia. **Postępy mikrobiologii**, v. 39, n. 1, p. 73–89, 2000.

SIVARAMAN, G., INIYA, M., ANAND, T., KOTLA, N. G., SUNNAPU, O., SINGARAVADIVEL, S., SINGARAVADIVEL, S., CHELLAPPA, D. Chemically diverse small molecule fluorescent chemosensors for copper ion. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 357, p. 50–104, 2018.

SQUADRONE, S., BENEDETTO, A., BRIZIO, P., PREARO, M., & ABETE, M. C. Mercury and selenium in European catfish (*Silurus glanis*) from Northern Italian

Rivers: can molar ratio be a predictive factor for mercury toxicity in a top predator?

Chemosphere, v. 119, p. 24–30, 2015.

SULLIVAN, M. J., GOH, K. G., & ULETT, G. C. Copper intoxication in group B *Streptococcus* triggers transcriptional activation of the *cop* operon that contributes to enhanced virulence during acute infection. **Journal of Bacteriology**, v. 203, n. 19, p. e00315-21, 2021.

SULYMAN, M., NAMIESNIK, J., GIERAK, A. Low-cost Adsorbents Derived from Agricultural By-products/Wastes for Enhancing Contaminant Uptakes from Wastewater: A Review. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 3, 2017.

SUMIAHADI, A., ACAR, R. A review of phytoremediation technology: heavy metals uptake by plants. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 142, p. 012023, mar. 2018.

TEH, C. Y., BUDIMAN, P. M., SHAK, K. P. Y., & WU, T. Y. Recent advancement of coagulation–flocculation and its application in wastewater treatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 16, p. 4363–4389, 2016.

TIMKOVÁ, I.; SEDLÁKOVÁ-KADUKOVÁ, J.; PRISTAŠ, P. Biosorption and bioaccumulation abilities of actinomycetes/streptomyces isolated from metal contaminated sites. **Separations**, v. 5, n. 4, p. 54, 2018.

TSANG, T., DAVIS, C. I., BRADY, D. C. Copper biology. **Current Biology**, v. 31, n. 9, p. R421–R427, 2021.

ULLAH, A., HENG, S., MUNIS, M. F. H., FAHAD, S., & YANG, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28–40, 2015.

VERMA, S., KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology & Innovation**, v. 14, p. 100369, 2019.

VIEIRA FILHO, L. O., MONTEIRO, F. A. Silicon modulates copper absorption and increases yield of *Tanzania guinea* grass under copper toxicity.

Environmental Science and Pollution Research, v. 27, n. 25, p. 31221–31232, 2020.

XU, D.; ZHOU, B.; YUAN, R. **Optimization of coagulation-flocculation treatment of wastewater containing Zn(II) and Cr(VI)**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**IOP Publishing, 2019.

ZAMORA-LEDEZMA, C., NEGRETE-BOLAGAY, D., FIGUEROA, F., ZAMORA-LEDEZMA, E., NI, M., ALEXIS, F., & GUERRERO, V. H. Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. **Environmental Technology & Innovation**, p. 101504, 2021.

ZHANG, H.; REYNOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 761–767, 2019.

ZHANG, H., YUAN, X., XIONG, T., WANG, H., & JIANG, L. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: influence factors, mechanisms and evaluation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 398, p. 125657, 2020.

WANG, Y., WANG, C., CHENG, W., BIAN, Y., & GUO, P. Removal of cadmium from contaminated *Lentinula edodes* by optimized complexation and coagulation. **Food science & nutrition**, v. 5, n. 2, p. 215–222, 2017.

World Health Organization, Chromium in Drinking-water Health Criteria and Other Supporting Information, Chromium in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization; 2020 (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.3).

Capítulo 2. Potencial *in vitro* do isolado *Klebsiella* sp. LM 09 para biorremediação de solo contaminado com metais potencialmente tóxicos.

Resumo

A rápida urbanização e industrialização tem provocado aumento significativo na contaminação do solo por metais potencialmente tóxicos (MPT), constituindo séria ameaça à segurança alimentar, ao ambiente e ao desenvolvimento sustentável. Neste contexto, há necessidade premente de desenvolver abordagens sustentáveis de remediação. O presente estudo investigou a capacidade da cepa *Klebsiella* sp. LM09 para promoção do crescimento vegetal e avaliou a germinação de sementes de *Helianthus annuus* L. (planta com potencial para fitorremediação de solos contaminados com MPT), associadas ou não a cepa bacteriana, bem como, o crescimento de plântulas de girassol na presença de cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}), crômio tri e hexavalente (Cr^{3+} e Cr^{6+} , respectivamente). A cepa estudada foi isolada de um fertilizante biológico e identificada pelo sequenciamento de fragmentos da região 16S rRNA. Esta cepa apresentou capacidade elevada para produção de ácido indol acético, AIA ($62,88 \pm 0,02$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio $3,68 \pm 0,03$; segundo o qual, a cepa tem capacidade moderada para solubilização deste composto. Além disso, solubilizou potássio inorgânico e produziu siderofóros. A sua inoculação em vermiculita protegeu plantas de girassol de possíveis efeitos adversos ocasionados pelos MPT estudados e promoveu o crescimento das plântulas. Os resultados deste estudo sinalizam o potencial da cepa *Klebsiella* sp. LM09 associada a plantas como o girassol, hiperacumuladoras de MPT, para biorremediação de solos contaminados com estas espécies químicas.

Palavras-chave: fitorremediação; metais pesados; *Helianthus annuus* L.; bactéria promotora de crescimento vegetal; ácido indol acético; solubilização de nutrientes inorgânicos.

Chapter 2. *In vitro* potential of the isolate *Klebsiella* sp. LM09 for the bioremediation of soil contaminated with potentially toxic metals.

Abstract

Rapid urbanization and industrialization have caused a significant increase in soil contamination by potentially toxic metals (PTM), posing a serious threat to food security, the environment, and sustainable development. In this context, there is a pressing need to develop sustainable remediation approaches. The present study investigated the ability of *Klebsiella* sp. LM09 to promote plant growth. It evaluated the germination of *Helianthus annuus* L. seeds (a plant with potential for phytoremediation of soils contaminated with PTM), associated or not with the bacterial strain, as well as the growth of sunflower seedlings in the presence of cadmium (Cd^{2+}), copper (Cu^{2+}), mercury (Hg^{2+}), tri- and hexavalent chromium (Cr^{3+} and Cr^{6+} , respectively). The strain studied was isolated from a biological fertilizer and identified by sequencing fragments of the 16S rRNA region. This strain presented a high capacity for the production of indole acetic acid, IAA (62.88 ± 0.016) $\mu\text{g mL}^{-1}$, and calcium phosphate solubilization index (SI) 3.68 ± 0.026 , according to which, the strain has a moderate capacity for solubilization of this compound. Furthermore, it solubilized inorganic potassium and produced siderophores. Its inoculation in vermiculite protected sunflower plants from possible adverse effects caused by the PTM studied and promoted seedling growth. The results of this study indicate the potential of *Klebsiella* sp. LM09 associated with plants such as sunflowers, which hyperaccumulate PTM, for bioremediation of soils contaminated with these chemical species.

Keywords: phytoremediation; heavy metals; *Helianthus annuus* L.; plant growth-promoting bacteria; indole acetic acid; solubilization of inorganic nutrients.

2.1 Introdução

O crescimento acelerado da urbanização e da industrialização tem resultado em ampliação do número de casos de solos contaminados por metais potencialmente tóxicos (MPT), o que representa séria ameaça à segurança alimentar, ao ambiente e ao desenvolvimento sustentável do setor agrícola (Awa e Hadibarata, 2020). Íons metálicos como Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , em baixas concentrações, são essenciais para o metabolismo de organismos vivos. No entanto, há íons que não possuem função biológica relevante e podem ser extremamente tóxicos para os seres vivos, mesmo em baixas concentrações (Abdu et al., 2017; Mondal et al., 2019). Assim, íons de MPT, não essenciais, como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} e Pb^{2+} , apresentam uma faixa de concentração que é tolerável pelos organismos, mas, a partir de determinado limite de concentração, têm efeitos tóxicos, podendo, ser letais (Sandeep et al., 2019).

Na maioria dos compostos em que o cádmio (Cd) está presente, seu estado de oxidação é + 2, isto é, este elemento está na forma de cátion bivalente (Cd^{2+}). Para os seres vivos, o Cd^{2+} não é essencial e a exposição a baixas concentrações de Cd^{2+} pode causar ao ser humano danos aos rins, ao fígado e ao sistema cardiovascular, além de efeitos mutagênicos e deterioração da visão e audição (Genchi et al., 2020). Às plantas, o Cd^{2+} não possui qualquer função fisiológica e, mesmo em baixas concentrações, pode afetar sua atividade enzimática, mitose, fotossíntese, germinação e diminuir o crescimento da raiz, do caule e da absorção de nutrientes (Genchi et al., 2020; Mondal et al., 2019). A concentração de Cd^{2+} capaz de desencadear efeito hormético em plantas e suas descendências situa-se na faixa de 1 a 100 mg kg⁻¹ (Carvalho; Castro; Azevedo, 2020).

O crômio (Cr) pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, que variam de -2 a +6, sendo +3 (trivalente) e +6 (hexavalente) os mais estáveis (Vaipoulou; Gikas, 2020; World Health Organization, 2020). No solo, pode predominar Cr^{3+} ou Cr^{6+} , o qual é mais tóxico do que o Cr^{3+} (Sharma et al., 2020; Vaipoulou; Gikas, 2020; World Health Organization, 2020). A quantidade diária de ingestão de crômio pelo ser humano oscila entre 50 e 200 µg dia⁻¹ (Sharma et al., 2020).

O Cr^{3+} interfere em processos metabólicos das plantas, podendo causar clorose nas folhas e danos às raízes (Sharma et al., 2020). O Cr^{6+} afeta diretamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, devido a formação de complexos com ácidos nucleicos, proteínas e outros compostos orgânicos, afetando a germinação e a capacidade fotossintética, além de causar desequilíbrios oxidativos que podem ocasionar mutagênese (Singh et al., 2021).

O mercúrio (Hg) é um MPT que pode ocorrer nas formas elementar (Hg^0), monovalente (Hg_2^{2+}), na qual o estado de oxidação é +1, e bivalente (Hg^{2+}) (Crespo-López et al., 2021; Raj; Maiti, 2019). O mercúrio é tóxico para o ser humano, afetando o sistema nervoso central, rins, cérebro e coração (Genchi et al., 2017). Em plantas, o mercúrio pode afetar a fotossíntese, inibir o crescimento e diminuir a capacidade da planta de absorver nutrientes. Mesmo em pequenas concentrações, o Hg pode causar estresse oxidativo (Kumar et al., 2017).

O cobre (Cu) pode ocorrer como Cu^+ e Cu^{2+} , sendo o estado de oxidação +2, o mais comum (Denoyer et al., 2015). É um micronutriente essencial para organismos vivos, desempenhando papel fundamental, especialmente em plantas, nas quais está associado à cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (Sullivan et al., 2021; Vieira Filho; Monteiro, 2020). A concentração de Cu^{2+} considerada benéfica às plantas situa-se na faixa de 0,1 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$, promovendo um funcionamento metabólico ótimo (Arif et al., 2016). Em relação ao ser humano, tais valores podem variar conforme as regulamentações específicas do país, abrangendo uma faixa de 0,4 a 2 mg dia^{-1} (Bost et al., 2016). O acúmulo de Cu^{2+} em plantas pode comprometer a funcionalidade de organelas vitais, tais como, mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, afetando processos metabólicos essenciais, como a síntese de energia química, fotossíntese e fotorrespiração (Vieira Filho; Monteiro, 2020). Assim, o excesso de Cu^{2+} pode impactar negativamente o crescimento da planta (Vieira Filho; Monteiro, 2020). Para o ser humano, os efeitos adversos associados ao excesso de Cu^{2+} incluem irritação gastrointestinal, distúrbios hepáticos e renais, hemólise intravascular e choque (Avram et al., 2021).

Uma alternativa sustentável para o tratamento de solos contaminados com MPT é a biorremediação, que se baseia na utilização de organismos vivos, como

bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e/ou plantas superiores, capazes de remover poluentes do solo, imobilizá-los ou convertê-los em espécies químicas menos tóxicas (Pratish et al., 2018). A eficácia da biorremediação de solos contaminados com MPT, a partir do uso de microrganismos, requer que tais organismos apresentem tolerância a estes elementos. Isso pode ser alcançado por meio de diferentes mecanismos, como bioacumulação, biossorção e biotransformação (Fernández et al., 2018), que permitem aos microrganismos removerem MPT do solo, imobilizá-los e/ou alterar o seu estado de oxidação, diminuindo sua concentração para valores menos tóxicos para os seres vivos. A tolerância dos microrganismos a MPT é, portanto, um fator crucial para o sucesso da biorremediação (Pratish et al., 2018; Verma; Kuila, 2019).

A biorremediação pode ser ainda mais eficiente se microrganismos tolerantes a MPT apresentam mecanismos de promoção de crescimento vegetal e são associados diretamente a plantas hiperacumuladoras de MPT. Nesta técnica, as plantas podem remover do solo elementos potencialmente tóxicos, por meio do sistema radicular, translocando-os através das raízes. Além disso, podem acumular, alterar o estado de oxidação ou mineralizar esses poluentes por meio de processos metabólicos, tornando o processo de biorremediação ainda mais eficiente, enquanto os microrganismos, paralelamente, promovem por mecanismos diretos ou indiretos, o crescimento vegetal (Zhang et al., 2020).

O girassol (*Helianthus annuus* L.) apresenta características típicas de plantas hiperacumuladoras de MPT, em virtude de sua rápida taxa de crescimento, capacidade de produção de biomassa e habilidade para acumular MPT, como Cr^{3+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , principalmente em seu sistema radicular (Chauhan; Mathur, 2018), quando comparado o teor presente nas sementes (Angelova et al., 2016). A utilização simbiótica de plantas e microrganismos é amplamente reconhecida por melhorar a tolerância das plantas e aumentar sua resistência a poluentes ambientais, devido à produção de hormônios vegetais, pelos microrganismos, ou à degradação de poluentes que afetam o crescimento da planta. Esta abordagem oferece proteção à planta dos efeitos negativos da poluição ambiental (Zhang et al., 2020).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram estudar a capacidade da cepa *Klebsiella* sp. LM09 para promoção *in vitro* de crescimento vegetal e avaliar a germinação de sementes de *Helianthus annuus* L., associadas ou não a este microrganismo, assim como, o crescimento de plântulas de girassol, na presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , visando sua futura utilização à biorremediação de solos contaminados com estas espécies químicas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Isolado bacteriano

A cepa *Klebsiella* sp. LM09 foi isolada da matéria-prima liofilizada de um produto agrícola usado como fertilizante biológico. Esta cepa pertence à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, campus de Jaboticabal.

2.2.2 Identificação do isolado

2.2.2.1 Extração de DNA, amplificação e purificação

O isolado foi cultivado em meio caldo nutriente (CN), pH = 6,20; composto por glicose ($5,0 \text{ g L}^{-1}$); extrato de levedura ($3,0 \text{ g L}^{-1}$); peptona de soja ($5,0 \text{ g L}^{-1}$) e NaCl ($5,0 \text{ g L}^{-1}$). O cultivo foi realizado em incubadora shaker, durante 24 h, a 30°C e 150 rpm.

O DNA genômico foi extraído com o mini kit QIAamp DNA (Qiagen), de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante. Após a extração, os fragmentos da região 16S rRNA, foram amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se primer universal fD1 (Weisburg et al., 1991). O produto das amplificações por PCR foi purificado com o kit Zymoclean Gel DNA Recovery.

2.2.2.2 Sequenciamento dos fragmentos 16S RNA e análise das sequências

Os fragmentos da região 16S rRNA foram submetidos ao sequenciamento Sanger, em sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências de nucleotídeos foram analisadas, processadas e montadas utilizando os pacotes de software Phred/ Phrap/ CONSED (Ewing et al., 1998).

Para análise comparativa com sequências similares, foram utilizados os bancos de dados públicos, BLASTn do Nacional Center for Biotechnology Information (Chen et al., 2015) e Sequence Match do Ribossomal Database Project (Cole et al., 2014).

2.2.2.3 Solubilização de nutrientes inorgânicos

A cepa bacteriana foi cultivada em meio CN, por 3 dias. Em seguida, 10 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em meio de cultivo NBRIP modificado, visando determinar a capacidade da cepa para solubilizar fosfatos de cálcio, ferro e alumínio (Nautiyal, 1999). O ensaio foi realizado com três repetições.

A avaliação da solubilização de compostos inorgânicos de potássio, zinco e silício foi realizada nos seguintes meios de cultivo: Aleksandrov (Rajawat et al., 2016); Tris minimal salts (Fasim et al., 2002) e NBRISSM (Bist et al., 2020), respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C, e o diâmetro dos halos de solubilização foram medidos após 18 dias de incubação. Todos os ensaios foram realizados com três repetições. O índice de solubilização (IS) foi calculado pela equação 1 (Oves et al. 2017).

$$IS = \frac{\text{Diâmetro total (colônia + zona do halo)}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

Para classificar a cepa bacteriana com relação a sua capacidade para solubilização de nutrientes inorgânicos, adotaram-se os seguintes critérios: baixa ($IS < 2,00$); moderada ($2,00 < IS < 4,00$) e alta ($IS > 4,0$) capacidade de solubilização. De acordo com os critérios adotados, o isolado é classificado como não solubilizador de fosfatos, quando não se observa solubilização visível até o 15º dia de avaliação (Ruiz Berraquero; Ramos-Cormenzana, 1977).

2.2.2.4 Solubilização de fosfato de cálcio em meio líquido

A quantificação do fosfato de cálcio solubilizado pela cepa bacteriana, em meio líquido, foi realizada colorimetricamente, de acordo com Bezerra e Barreto (2011). Para tanto, a cepa bacteriana foi inoculada em 30 mL de meio de cultivo líquido contendo NaCl (0,1 g L⁻¹), NH₄Cl (1,0 g L⁻¹), KCl (0,2 g L⁻¹), CaCl₂·2H₂O (0,5 g L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (1,2 g L⁻¹), glicose (10 g L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g

L^{-1}) e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5 g L^{-1}), em pH 7,0 e incubada por 48 e 120 h, a 28°C e 120 rpm de agitação (Nahas, 1994). Em seguida, 5,00 mL da suspensão bacteriana foram centrifugados e o sobrenadante foi tratado com 4,00 mL de água e 2,00 mL de solução de molibdato de amônio, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ a 5% (v/v) e metavanato de amônio, NH_4VO_3 a 0,25% (v/v). Mediu-se a absorbância da solução resultante, em 420 nm. O ensaio foi realizado com três repetições.

2.2.2.5 Produção de ácido indol acético

Para avaliação da capacidade do isolado em produzir ácido indol acético (AIA) foi adotada a metodologia colorimétrica descrita por Sarwar e Kremer (1995). A cepa foi inoculada em meio CN, ao qual foi adicionada solução de triptofano $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, previamente filtrada em milipore ($0,2 \mu\text{m}$). A suspensão bacteriana foi incubada por 6 dias, a 30°C e 130 rpm. Em seguida foi realizado o protocolado de Gordon e Weber (1951), onde a suspensão bacteriana foi centrifugada e 1,00 mL do sobrenadante foi tratado com 2,00 mL do reagente de Salkowski. A absorbância da solução resultante foi medida em 535 nm (Asghar et al. 2002). A concentração de AIA produzido pelo isolado foi calculada baseando-se na curva de calibração, obtida a partir de soluções padrões de AIA, de procedência Sigma-Aldrich. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2.6 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos pelo isolado foi avaliada em meio CAS ágar, adotando-se o método de Louden e colaboradores (2011). O corante azul foi preparado misturando-se 1,0 mL de solução de CAS $1,2 \text{ g L}^{-1}$; 9,0 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,27 \text{ g L}^{-1}$ e 40 mL de solução de HDTMA $1,8 \text{ L}^{-1}$ e, posteriormente autoclavado. O meio CAS ágar foi preparado misturando-se meio mínimo 9 (KH_2PO_4 30 g L^{-1} , NaCl 50 g L^{-1} e NH_4Cl 100 g L^{-1}), ácido casamino a 111 g L^{-1} , solução de glicose 20 % (m/v), piperazina-N,N'-bis(ácido2-etanossulfônico), PIPES, ágar bacteriológico, conforme descrito por. Em seguida, o meio de cultivo CAS e o corante azul foram misturados. A cepa bacteriana foi cultivada previamente em meio CN por um período de 6 dias e 10

μL da suspensão bacteriana foram inoculados em CAS ágar por 18 dias. O ensaio foi realizado com três repetições.

2.2.2.7 Soluções estoques de íons metálicos potencialmente tóxicos

Soluções estoques de Cd^{2+} ($0,010 \text{ mol L}^{-1}$), Cr^{3+} ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$), Cr^{6+} ($0,20 \text{ mol L}^{-1}$), Cu^{2+} ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) e Hg^{2+} ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas pela dissolução em água deionizada de cloreto de cádmio(II) monohidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cloreto de crômio(III) hexahidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), sulfato de cobre(II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de mercúrio(II) (HgCl_2), respectivamente. As soluções foram autoclavadas a 120°C por cerca de 20 min para esterilização.

2.2.2.8 Ensaios de germinação

Para avaliação da atividade de promoção da germinação de sementes pelo isolado *Klebsiella* sp. LM09 foram usadas sementes de girassol anão de jardim (*Helianthus annuus* L.). Os ensaios foram realizados com três repetições, adotando-se os procedimentos recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) à condução de testes de germinação, conforme descrito no manual de Regras para Análises de Sementes (Brasil 2009a). Previamente a inoculação da cepa bacterina nas sementes de girassol, foi determinada a sua curva de crescimento, em meio CN a 30°C , verificando-se que o pico de multiplicação celular da cepa ocorreu com 24 h de cultivo. Assim, para os ensaios de germinação e crescimento de plântulas, a cepa foi cultivada por 24 h.

Para os ensaios de germinação e de crescimento de plântulas, ambos realizados com três repetições, foram adotados 10 tratamentos (T1 a T10) e 2 controles (C1 e C2), conforme descrito na Tabela 1. As concentrações de Cd^{2+} ($1,3 \text{ mg L}^{-1}$), Cr^{3+} (75 mg L^{-1}), Cr^{6+} (75 mg L^{-1}), Cu^{2+} (60 mg L^{-1}) e Hg^{2+} ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) utilizadas nestes ensaios foram baseadas nos valores de prevenção (VP) para cádmio, crômio, cobre e mercúrio estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da resolução de n. 420 de 28/12/2009. Segundo essa resolução, o VP é a concentração de valor

limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais (Brasil, 2009b).

As sementes de girassol foram previamente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 5 % (v/v), por 10 min (Janmohammadi et al., 2015), lavadas com água esterilizada e distribuídas em papel *Germitest* para secagem. Em seguida, metade das sementes foi mergulhada em suspensão bacteriana e a outra metade ficou em contato com meio CN, por 30 min. Vinte sementes foram dispostas em papel *Germitest*, mantido em bandeja de plástico com tampa, vedada com filme de plástico para manutenção da umidade na atmosfera interna. Nos tratamentos com MPT adicionou-se, com auxílio de pipeta, volume de solução de Cd^{2+} (1,3 mg L⁻¹), Cr^{3+} (75 mg L⁻¹), Cr^{6+} (75 mg L⁻¹), Cu^{2+} (60 mg L⁻¹) e Hg^{2+} (0,5 mg mL⁻¹), em mililitros, correspondente a 2,5 vezes a massa do papel *Germitest*. Nos controles o papel *Germitest* foi umedecido com água deionizada previamente autoclavada de acordo com as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2009a).

Tabela 2.1. Descrição dos tratamentos (T) e controles (C) adotados nos ensaios de germinação e de crescimento de plântulas de *Helianthus annuus* L.

Identificação	Descrição
T1: B-Cd^{2+}	presença do isolado bacteriano e Cd^{2+}
T2: B-Cr^{3+}	presença do isolado bacteriano e Cr^{3+}
T3: B-Cr^{6+}	presença do isolado bacteriano e Cr^{6+}
T4: B-Cu^{2+}	presença do isolado bacteriano e Cu^{2+}
T5: B-Hg^{2+}	presença do isolado bacteriano e Hg^{2+}
T6: SB-Cd^{2+}	ausência do isolado bacteriano e presença de Cd^{2+}
T7: SB-Cr^{3+}	ausência do isolado bacteriano e presença de Cr^{3+}
T8: SB-Cr^{6+}	ausência do isolado bacteriano e presença de Cr^{6+}
T9: SB-Cu^{2+}	ausência do isolado bacteriano e presença de Cu^{2+}
T10: SB-Hg^{2+}	ausência do isolado bacteriano e presença de Hg^{2+}
C1: B-SM	presença do isolado bacteriano e ausência de MPT
C2: SB-SM	ausência do isolado bacteriano e de MPT

A germinação foi acompanhada em laboratório, mantido em temperatura de aproximadamente 25°C. Para o monitoramento da evaporação de água os recipientes foram pesados diariamente e, quando necessário, adicionou-se água deionizada, adotando-se como referência a massa total inicial do recipiente úmido, contendo as sementes. Foram realizadas duas avaliações, uma no 4º dia e a outra no 10º dia, nas quais contou-se o número de sementes germinadas. A taxa de germinação foi calculada pela equação 2 (Islam et al., 2016).

$$\text{Taxa de Germinação (\%)} = \frac{\text{Número de Sementes Germinadas}}{\text{Número Total de Sementes}} \times 100 \quad (2)$$

2.2.2.9 Ensaios de crescimento de plântulas

Nesta etapa, sementes de girassol previamente desinfetadas, conforme descrito na seção que descreve os ensaios de germinação, foram cultivadas em vermiculita. A fim de proporcionar a umidade necessária à vermiculita, quantidade de água correspondente a 60% de sua capacidade de retenção foi adicionada (Brasil, 2009). Foram implementados 10 tratamentos (T1 a T10) e 2 controles (C1 e C2), conforme descrito na Tabela 1. Nos tratamentos com MPT foram adicionados 2,6 mL de solução de Cd^{2+} (1,3 mg L⁻¹), Cr^{3+} (75 mg L⁻¹), Cr^{6+} (75 mg L⁻¹), Cu^{2+} (60 mg L⁻¹) e Hg^{2+} (0,5 mg mL⁻¹). Os controles, por sua vez, foram submetidos apenas à adição de água deionizada, equivalente a 60% da capacidade de retenção da vermiculita.

No quinto dia após a semeadura, foi inoculado 1 mL de suspensão bacteriana (10⁻⁸ UFC) em cada célula da bandeja nos tratamentos que deveriam conter o isolado bacteriano estudado. No décimo dia após a semeadura, foram avaliados o número de sementes germinadas, o comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas. A porcentagem de plântulas com anormalidades, que comprometeriam seu desenvolvimento posterior, foi avaliada, conforme recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2009). A germinação relativa das sementes (RSG), o crescimento relativo da raiz (RRG) e o crescimento relativo da parte aérea (RShG) foram calculados a partir das equações 3, 4 e 5, respectivamente (Hussain et al., 2018).

$$RSG (\%) = \frac{\text{Número de sementes germinadas no tratamento com bactéria}}{\text{Número de sementes germinadas no controle}} \times 100 \quad (3)$$

$$RRG (\%) = \frac{\text{Comprimento médio da raiz das plântulas no tratamento com bactéria}}{\text{Comprimento médio da raiz das plântulas no controle}} \times 100 \quad (4)$$

$$RShG (\%) = \frac{\text{Comprimento médio da parte área das plântulas no tratamento com bactéria}}{\text{Comprimento médio da parte área das plântulas no controle}} \times 100 \quad (5)$$

2.2.2.10 Análise estatística dos resultados

Aos resultados dos ensaios de germinação e de crescimento de plântulas aplicou-se- o teste ANOVA para a análise de variância ($p\text{-valor} \leq 0,05$) a fim de averiguar a presença de diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Uma vez notada tal diferença, utilizou-se o teste post-hoc Scott-Knott para a comparação par-a-par das médias ($p\text{-valor} \leq 0,05$), a fim de agrupá-las. Para isso, utilizou-se a função "SK" do pacote "ScottKnott" (Jelihovschi et al., 2014), desenvolvido para o programa estatístico R (R Core Team, 2020). As representações gráficas foram obtidas com o auxílio do pacote R "ggplot2" (Wickham, 2016).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação da cepa bacteriana

A ferramenta BLAST confirmou que a cepa bacteriana pertence ao gênero *Klebsiella* e apresenta 94% de homologia de sequência com *Klebsiella pneumoniae* DSM 30104. Trata-se de uma bactéria gram-negativa que pertence à família Enterobacteriaceae e é encontrada na natureza, habitando solos, esgotos, água potável e efluentes industriais (Jha et al., 2021).

A cepa *Klebsiella pneumoniae* proveniente da rizosfera do solo possui interesse para agricultura, em virtude de sua capacidade de promover o crescimento vegetal e estimular o sistema de resistência induzida contra fungos patogênicos e nematoides em plantas de arroz e soja (Ji et al., 2014; Liu et al., 2018). Apenas algumas cepas de *Klebsiella* sp. são capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio, enquanto outras têm comportamento patogênico oportunista, sendo capazes de causar infecções do trato respiratório, do sistema circulatório e do trato urinário (Martin; Bachman, 2018).

De acordo com Chakraborty e colaboradores (2021), a linhagem *Klebsiella* sp. TIU20, isolada de água residuária, foi capaz de remover 72,5% de Cd^{2+} , 28% de Cr^{6+} e 25,7% de Pb^{2+} . Esta cepa solubilizou fosfato e produziu AIA e amônia.

As cepas *K. pneumoniae* MB31 e *K. pneumoniae* RpSWC3 exibiram capacidade máxima de remoção de Cu^{2+} e Ni^{2+} , o que as torna candidatas promissoras para utilização em biorremediação (Aslam et al., 2020; Chakraborty et al., 2021).

Considerando o exposto, a cepa bacteriana avaliada neste trabalho pode ser promissora para mitigar os efeitos nocivos de metais tóxicos no solo e para melhorar o desenvolvimento de plantas. Para diferenciá-la de outras cepas do mesmo gênero optou-se por denominá-la *Klebsiella* sp. LM09.

2.3.2 Produção de ácido indolacético

A concentração de AIA, $(64,37 \pm 0,02) \mu\text{g mL}^{-1}$, produzida pela cepa *Klebsiella* sp. LM09 foi muito superior a dados reportados na literatura. Segundo Mazumdar e colaboradores (2018), a cepa *Klebsiella pneumoniae* rs26 produziu $27,5 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$ enquanto Kuan e colaboradores (2016), verificaram a produção de $12,99 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$ pela cepa de *Klebsiella pneumoniae* Fr1.

Ao selecionar uma cepa para uso na promoção do crescimento vegetal é importante considerar a produção de fito hormônios, pois as bactérias com essa capacidade sintetizam auxina semelhante à auxina vegetal, o que pode auxiliar no desenvolvimento adequado da planta mesmo em condições de estresse causado por compostos inibidores (Wagi; Ahmed, 2019).

2.3.3 Produção de sideróforos

A cepa *Klebsiella* sp. LM09 apresentou produção de sideróforos indicada pela alteração da coloração das placas, contendo meio CAS, formando um halo (Figura 2.1). De acordo com a literatura, essa alteração de coloração sinaliza a produção de sideróforos em meio sólido (Arora; Verma, 2017).



Figura 2.1. Presença de halo de *Klebsiella* sp. LM09 sinalizando produção de sideróforos.

Por meio da obtenção de ferro, os microrganismos produtores de sideróforos possuem vantagem competitiva, pois são capazes de solubilizar e capturar ferro presente no ambiente, tornando-se mais aptos para competir e sobreviver em condições de baixa disponibilidade de ferro. Portanto, a produção de sideróforos é um importante mecanismo de sobrevivência em ambientes de baixa disponibilidade de ferro, e tem sido amplamente estudada como um fator importante para a ecologia microbiana (Shepherdson; Elliot, 2022).

2.3.4 Solubilização de nutrientes inorgânicos

2.3.4.1 Solubilização de fosfatos de cálcio, ferro e alumínio

No teste de solubilização de fosfato de cálcio (Figura 2.2), o isolado *Klebsiella* sp. LM09 apresentou índice de solubilização (IS) igual a $3,68 \pm 0,03$; segundo o qual, a bactéria pode ser classificada como média solubilizadora de fosfato de cálcio. Na Figura 2.2, há dois halos, um translúcido intenso em volta da colônia e o outro pouco translúcido. Para o cálculo do IS, levou-se em consideração o maior halo observado. Não foi observado halo de solubilização nos meios com fosfatos de alumínio e ferro.



Figura 2.2. Imagem do ensaio para a determinação do índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio por *Klebsiella* sp. LM09.

A solubilização de fosfato de cálcio é um processo que envolve a degradação do fosfato inorgânico presente no solo, tornando-o disponível para a planta. Esse processo é realizado por diversas espécies de bactérias, como as do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, que possuem enzimas capazes de hidrolisar os compostos de fosfato inorgânico (Kalayu, 2019). A solubilização de fosfato de cálcio é um importante mecanismo de sobrevivência dessas bactérias, pois elas são capazes de obter nutrientes essenciais a partir de fontes inorgânicas (Adnan et al., 2017). Além disso, a solubilização de fosfato de cálcio por bactérias é vista como uma estratégia para melhorar a fertilidade do solo e aumentar a produção agrícola (Elhaissofi et al., 2022).

2.3.4.2 Solubilização de potássio inorgânico

A capacidade da cepa *Klebsiella* sp. LM09 para a solubilização de potássio inorgânico foi observada no meio de cultivo, no entanto, não foi possível medir o IS devido à característica gomosa e forma irregular da colônia bacteriana, que impossibilitaram a medição precisa do halo de solubilização. Na Figura 2.3 são observados dois halos, um halo translúcido intenso em volta da colônia e outro pouco translúcido em volta. De acordo com Jha e colaboradores (2021), a cepa *Klebsiella* sp. PVN-1 possui genes que a tornam capaz de solubilizar fosfatos inorgânicos e orgânicos, degradar compostos aromáticos, tolerar metais potencialmente tóxicos e produzir auxina.

Esses achados sugerem que a cepa de *Klebsiella* sp. PVN-1 pode ser considerada um recurso valioso para utilização na biorremediação.



Figura 2.3. Imagem do ensaio para a determinação do índice de solubilização (IS) de potássio inorgânico pela cepa *Klebsiella* sp. LM09.

A cepa *Klebsiella pneumoniae* M6 foi capaz de solubilizar potássio, fósforo e zinco, além de produzir amônia e quantidade considerável de auxinas, os quais são atributos que conferem à cepa mecanismos importantes de sobrevivência na rizosfera do solo, de onde normalmente é isolada (Duran-Bedolla et al., 2021).

Alguns microrganismos descritos na literatura, que possuem capacidade de solubilizar os nutrientes cálcio e potássio também apresentam outros mecanismos que promovem o crescimento vegetal. Esses mecanismos indiretamente contribuem para a disponibilidade de potássio no solo, tanto em condições normais quanto em situações de estresse. Além disso, as bactérias presentes na rizosfera desempenham papel importante na decomposição, mobilização e mineralização de outros nutrientes, o que favorece o cultivo das plantas na área (Ahmad et al., 2016; Sharon et al., 2016).

A cepa *Klebsiella* sp. LM09 estudada neste trabalho não foi capaz de solubilizar fosfatos inorgânicos de ferro, alumínio, silício e zinco.

2.3.4.3 Solubilização de fosfato de cálcio em meio líquido

As concentrações de fosfato de cálcio solubilizadas pela cepa *Klebsiella* sp. LM09, após 48 e 120 h de incubação, foram $(0,2971 \pm 0,001)$ e $(0,8717 \pm 0,006)$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, evidenciando tendência de aumento na quantidade de fosfato de cálcio solubilizada em função do tempo de incubação.

De acordo com Rajput e colaboradores (2013), as cepas de *Klebsiella* sp. SM6 e SM11 solubilizaram fósforo, especialmente nas primeiras 48 h de incubação, com tendência a aumento gradual ao longo do tempo, devido possivelmente a lise celular ou esgotamento de nutrientes mediados pela atividade bacteriana. A cepa *Klebsiella* sp. PG-64 também foi capaz de solubilizar fósforo, sendo que durante período de 72 h, constatou-se aumento capacidade que resultou em $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ seguido por um incremento substancial ao longo das 120 h subsequentes, alcançando $106 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse processo foi acompanhado por diminuição do pH, de 7,0 para 4,7 (Gohil et al., 2023).

Assim, os achados relatados nestes estudos corroboram com os obtidos no presente trabalho.

2.3.5 Germinação de sementes

Os resultados obtidos indicaram a ausência de diferenças estatisticamente significativas na presença e na ausência de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} (Figura 2.4). A taxa de germinação obtida neste trabalho é similar à observada em estudo desenvolvido por Zhao e colaboradores (2021), que também realizaram ensaios de germinação com sementes de girassol. Entretanto, Zhao e colaboradores (2021), verificaram decréscimo significativo da taxa de germinação em função do aumento da concentração de Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} no solo e do tipo de solo investigado.

O estudo realizado por Zhao e colaboradores (2021) é congruente com pesquisas anteriores que evidenciam a estreita interdependência existente entre a absorção, mobilidade e translocação de MPT do solo para a planta, em função de variáveis edáficas, como o tipo, concentração e estado de oxidação dos metais presentes no ambiente (Gupta et al., 2019). Os resultados deste estudo indicaram similaridades, uma vez que a vitalidade do girassol sofreu modificações de acordo com a concentração e o tipo de metal estudado. Verificou-se que os metais mais tóxicos foram aqueles que ocasionaram menor vigor nas plântulas.

Em estudo anterior, foi relatado que a presença de Cr^{6+} em concentrações elevadas, levou à diminuição no desenvolvimento de plantas de girassol, devido aos efeitos negativos deste íon metálico sobre os processos fisiológicos da planta. Contudo, foi observado que o uso de *Klebsiella* sp. como agente bacteriano pode ter efeito promissor na mitigação desses efeitos adversos (El Rasafi et al., 2016). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, uma vez que a presença de Cr^{6+} não afetou negativamente a germinação do girassol.

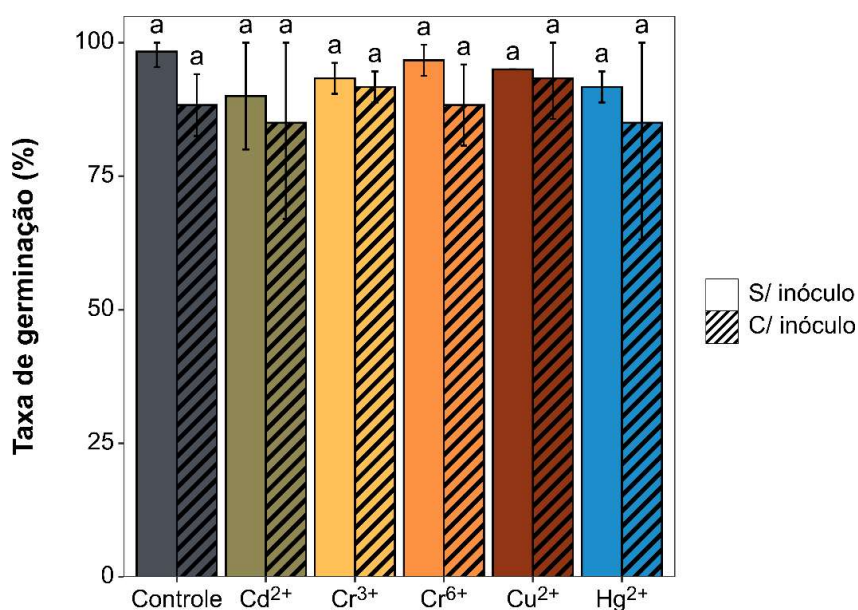


Figura 2.4. Taxa de germinação de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) na presença e na ausência de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , com e sem inoculação de *Klebsiella* sp. LM09.

2.3.6 Crescimento de plântulas

Os resultados do efeito da presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} na germinação do girassol estão na Figura 2.5 e evidenciam diferença estatisticamente significativa apenas para o tratamento contendo inóculo e Cr^{6+} em relação ao tratamento sem inóculo. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os demais tratamentos, tanto na presença quanto na ausência de inóculo.

Os resultados da avaliação do efeito dos íons Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} no comprimento da parte aérea indicaram um desempenho mais expressivo nos tratamentos contendo inóculo (Figura 2.6A). Os tratamentos controle, Cr^{3+} , Cu^{2+}

e Hg^{2+} apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos demais tratamentos, evidenciando que o uso da cepa bacteriana auxiliou no crescimento das plântulas de girassol em determinadas condições. No entanto, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos demais tratamentos, tanto na presença quanto na ausência de inóculo.

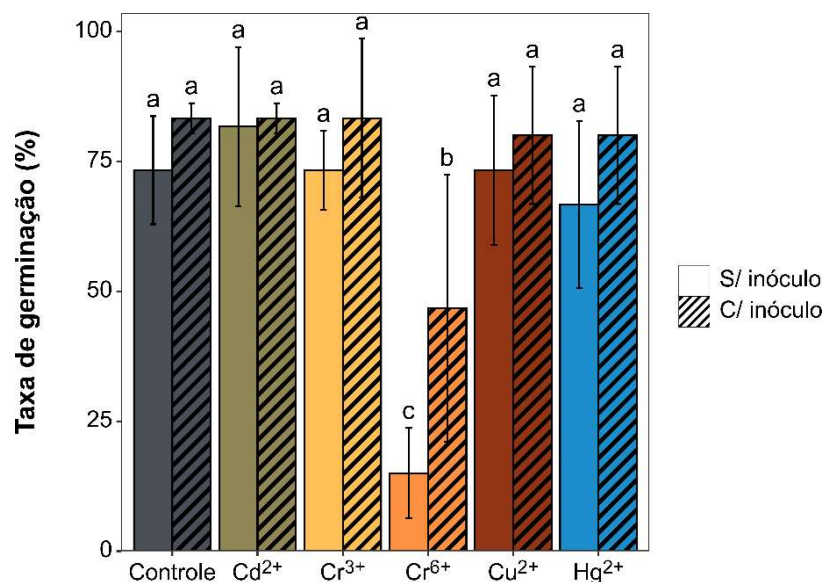


Figura 2.5. Efeito da presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} na germinação de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), inoculadas ou não com *Klebsiella* sp. LM09, em vermiculita. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

A presença da cepa *Klebsiella pneumoniae* resultou em aumento significativo no crescimento das plantas em relação à porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e comprimento da raiz, nas diferentes concentrações de Cd^{2+} (Dutta et al., 2018). A cepa bacteriana avaliada no presente estudo apresentou boa capacidade de produção de AIA, corroborando com os achados de Dutta e colaboradores (2018), demonstrando ser capaz de desempenhar importante papel no desenvolvimento da parte aérea e da raiz da planta sob estresse ocasionado por MPT.

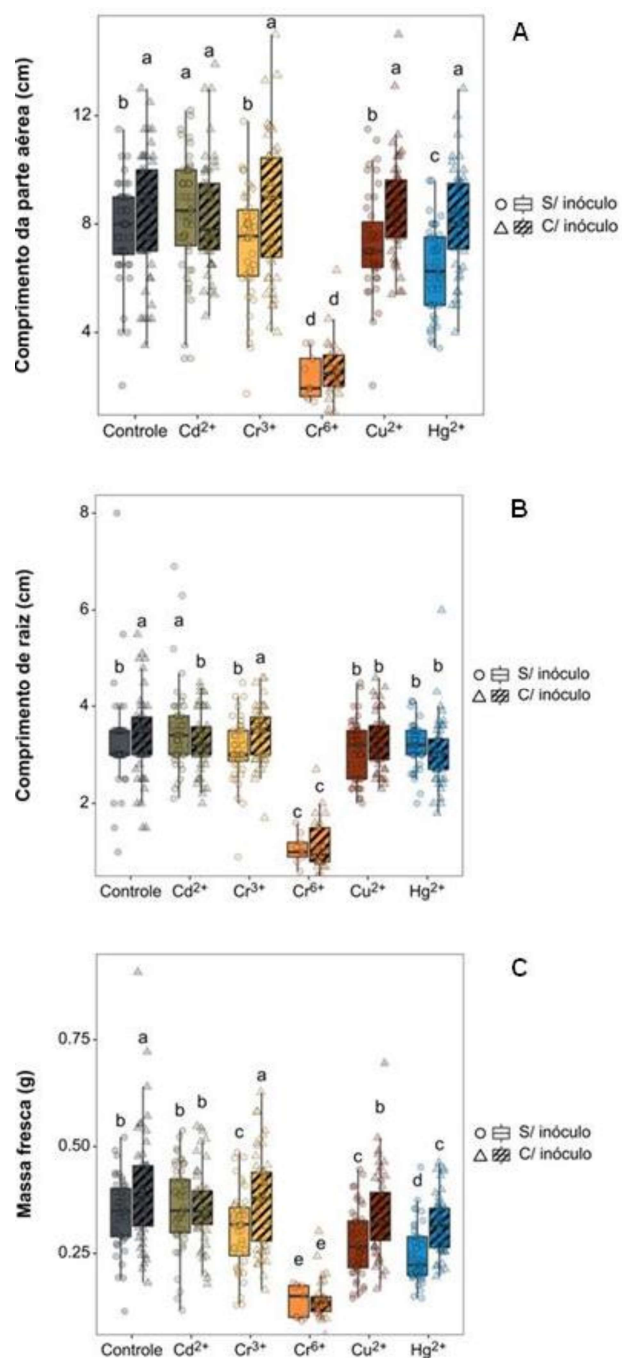


Figura 2.6. Efeito da presença de Cd²⁺, Cr³⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ e Hg²⁺ no comprimento da parte aérea **(A)** e da raiz **(B)**, e massa fresca **(C)** de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), inoculadas ou não com *Klebsiella* sp. LM09.

Com relação ao efeito sobre o comprimento da raiz (Figura 2.6B), foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos controle, com Cd²⁺ e Cr³⁺. Nos demais tratamentos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, tanto na presença quanto na ausência de inóculo.

Em relação à massa fresca (Figura 2.6C), houve maior número de tratamentos que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Nos tratamentos em que foi realizada a inoculação da bactéria *Klebsiella* sp. LM09, os valores para massa fresca foram maiores em comparação aos valores resultantes de tratamentos nos quais a bactéria não foi inoculada. Esses resultados, comparados aos obtidos para os tratamentos em que a cepa bacteriana não foi inoculada, sinalizam a eficiência da inoculação de *Klebsiella* sp. LM09 na recuperação de efeitos tóxicos decorrentes da presença Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} no meio de cultivo.

Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos obtidos por Chakraborty e colaboradores (2021), que avaliaram o efeito dos íons Cr^{6+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} em plantas de feijão, em conjunto com a inoculação da cepa *Klebsiella* sp. KTIU20. As plântulas expostas aos metais com e sem inoculação da cepa bacteriana tiveram desempenhos distintos. Nos tratamentos sem a cepa bacteriana houve diminuição no crescimento da raiz e da parte aérea, enquanto nos tratamentos com a KTIU20, houve melhor desenvolvimento das plantas.

Em relação a germinação relativa das sementes (RSG), verificou-se diferença significativa somente no tratamento contendo Cr^{6+} , sendo os demais tratamentos considerados estatisticamente equivalentes. Quanto ao crescimento relativo da parte aérea (RShG), os resultados para os íons metálicos avaliados (Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+}) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. No que se refere ao crescimento relativo de raiz (RRG), observou-se diferença estatisticamente significativa nos tratamentos com Cd^{2+} e Hg^{2+} em comparação aos demais tratamentos (Figura 2.7).

Em estudo conduzido por Gontia-Mishra e colaboradores (2016), observou-se que a presença de Hg^{2+} , em diferentes concentrações, afetou negativamente o crescimento de plantas de trigo. Contudo, o efeito nocivo do Hg^{2+} foi atenuado nos tratamentos em que cepa *Klebsiella pneumoniae* foi incorporada, devido a produção de ácido indolacético (AIA) por esta cepa e a sua capacidade de solubilizar fósforo, zinco e potássio.

Os resultados do presente trabalho corroboram com os obtidos por Gontia-Mishra e colaboradores (2016), uma vez que na maioria dos tratamentos em que a cepa bacteriana *Klebsiella* sp. LM09 foi inoculada, o desenvolvimento das plantas de girassol foi melhor.

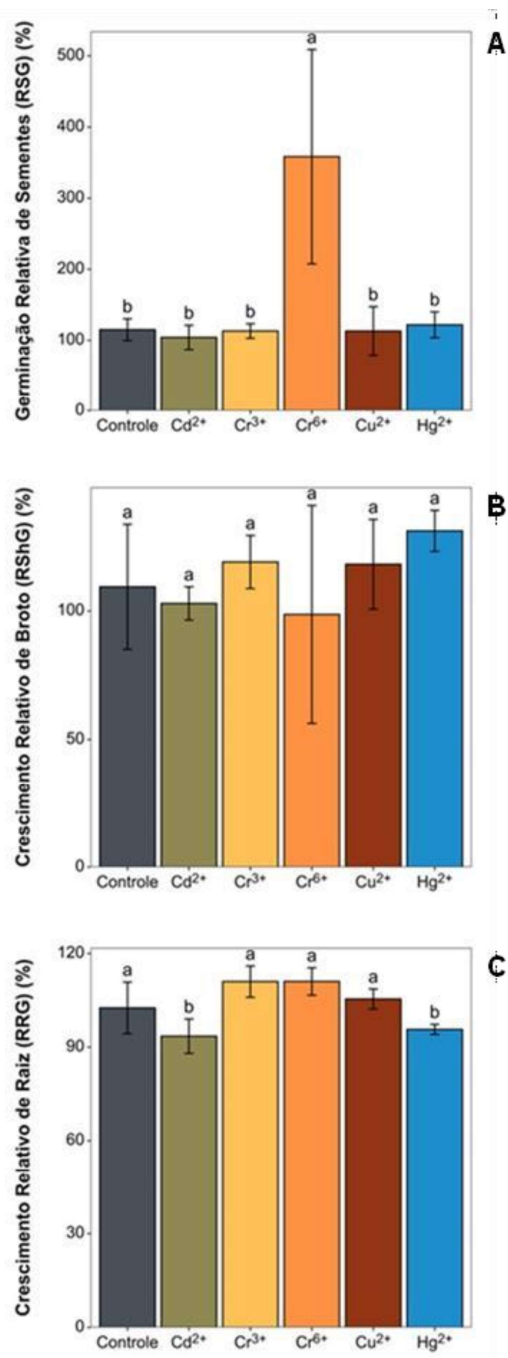


Figura 2.7. Efeito da presença de Cd²⁺, Cr³⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ e Hg²⁺ na germinação relativa das sementes, RSG (**A**), no crescimento relativo da parte aérea, RShG (**B**) e da raiz, RRG (**C**), em plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), inoculadas ou não com *Klebsiella* sp. LM09.

2.4 Conclusão

A inoculação da cepa *Klebsiella* sp. LM09 foi efetiva na proteção das plantas de girassol contra os efeitos adversos de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , além de promover seu crescimento vegetal. A cepa apresentou diversas características como a produção de ácido indol acético, produção de sideróforos e solubilização de fosfatos cálcio e potássio, que facilitam a mobilização de nutrientes e promovem o desenvolvimento mais efetivo das plantas. A cepa *Klebsiella* sp. LM09 associada a plantas como o girassol, hiperacumuladoras de MPT, tem potencial para biorremediação de solos contaminados com estas espécies químicas.

Estudos futuros, com maior tempo de duração e concentrações mais elevadas de Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} são importantes para avaliar a capacidade da cepa *Klebsiella* sp. e o papel de outras bactérias encontradas na rizosfera na promoção do crescimento vegetal e na biorremediação de solos.

2.5 Referências bibliográficas

- ABDU, N.; ABDULLAHI, A. A.; ABDULKADIR, A. Heavy metals and soil microbes. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, p. 65–84, 2017.
- ADNAN, M. et al. Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16131, 2017.
- AHMAD, M., NADEEM, S. M., NAVEED, M., & ZAHIR, Z. A. Potassium-solubilizing bacteria, and their application in agriculture. **Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture**, p. 293–313, 2016.
- ARIF, N., YADAV, V., SINGH, S., SINGH, S., AHMAD, P., MISHRA, R. K., ... & CHAUHAN, D. K. Influence of high and low levels of plant-beneficial heavy metal ions on plant growth and development. **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, p. 69, 2016.
- ARORA, N. K., VERMA, M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. **3 Biotech**, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2017.

ASLAM, F.; YASMIN, A.; SOHAIL, S. Bioaccumulation of lead, chromium, and nickel by bacteria from three different genera isolated from industrial effluent. **International Microbiology**, v. 23, p. 253–261, 2020.

ANGELOVA, V. R., PERIFANOVA-NEMSKA, M. N., UZUNOVA, G. P., IVANOV, K. I., & LEE, H. Q. Potential of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. **World J. Sci. Eng. Technol**, v. 10, n. 9, p. 1–8, 2016.

ASGHAR, H., ZAHIR, Z., ARSHAD, M., & KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231–237, 2002.

AWA, S. H.; HADIBARATA, T. Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 2, p. 1–15, 2020.

BEZERRA NETO, E., BARRETO, L. P. **Análises químicas e bioquímicas em plantas**. Recife: UFRPE, Editora Universitária da UFRPE, 2011. 267p.

BIST, V., NIRANJAN, A., RANJAN, M., LEHRI, A., SEEM, K., & SRIVASTAVA, S. Silicon-solubilizing media and its implication for characterization of bacteria to mitigate biotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 28, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA, 2009a. 395 p.

BOST, M., HOUDART, S., OBERLI, M., KALONJI, E., HUNEAU, J. F., & MARGARITIS, I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 35, p. 107–115, 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009b. Brasília, 2009.

CHAUHAN, P., MATHUR, J. Potential of *Helianthus annuus* for phytoremediation of multiple pollutants in the environment: A Review. **Journal of Biological Sciences and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 5–16, 2018.

CARVALHO, M. E.; CASTRO, P. R.; AZEVEDO, R. A. Hormesis in plants under Cd exposure: from toxic to beneficial element? **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121434, 2020.

CHAKRABORTY, S., DAS, S., BANERJEE, S., MUKHERJEE, S., GANGULI, A., & MONDAL, S. Heavy metals bio-removal potential of the isolated *Klebsiella* sp. TIU20 strain which improves growth of economic crop plant (*Vigna radiata* L.) under heavy metals stress by exhibiting plant growth promoting and protecting traits. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 38, p. 102204, 2021.

CHEN, W. M., WU, C. H., JAMES, E. K., & CHANG, J. S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 2–3, p. 364–371, 2008.

CHEN, W., HAO, H., CHEN, S. Numerical analysis of prestressed reinforced concrete beam subjected to blast loading. **Materials & Design (1980-2015)**, v. 65, p. 662–674, 2015.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D633–D642, 2014.

DUTTA, P., KARMAKAR, A., MAJUMDAR, S., & ROY, S. *Klebsiella pneumoniae* (HR1) assisted alleviation of Cd(II) toxicity in *Vigna mungo*: a case study of biosorption of heavy metal by an endophytic bacterium coupled with plant growth promotion. **Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration**, v. 3, p. 1–10, 2018.

DURAN-BEDOLLA, J., GARZA-RAMOS, U., RODRÍGUEZ-MEDINA, N., AGUILAR VERA, A., & BARRIOS-CAMACHO, H. Exploring the environmental traits and applications of *Klebsiella variicola*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2233–2245, 2021.

EL RASAFI, T., NOURI, M., BOUDA, S., & HADDIOUI, A. The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. **Ekológia (Bratislava)**, v. 35, n. 3, p. 213–223, 2016.

ELHAISSOUFI, W., GHOULAM, C., BARAKAT, A., ZEROUAL, Y., & BARGAZ, A. Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. **Journal of Advanced Research**, v. 38, p. 13–28, 2022.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

FASIM, F., AHMED, N., PARSONS, R., & GADD, G. M. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. **FEMS microbiology letters**, v. 213, n. 1, p. 1–6, 2002.

FERNÁNDEZ, P. M., VIÑARTA, S. C., BERNAL, A. R., CRUZ, E. L., & FIGUEROA, L. I. Bioremediation strategies for chromium removal: current research, scale-up approach and future perspectives. **Chemosphere**, v. 208, p. 139–148, 2018.

GONTIA-MISHRA, I., SAPRE, S., SHARMA, A., & TIWARI, S. Alleviation of mercury toxicity in wheat by the interaction of mercury-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 1000–1012, 2016.

GORDON, S.A., WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, v. 26, p.192, 1951.

GOHIL, R. B., RAVAL, V. H., PANCHAL, R. R., & RAJPUT, K. N. Plant growth promoting activities and effect of fermented panchagavya isolate *Klebsiella* sp. PG-64 on *Vigna radiata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 41, 2023.

GUPTA, P., KUMAR, V., USMANI, Z., RANI, R., CHANDRA, A., & GUPTA, V. K. A comparative evaluation towards the potential of *Klebsiella* sp. and *Enterobacter* sp. in plant growth promotion, oxidative stress tolerance and chromium uptake in *Helianthus annuus* (L.). **Journal of hazardous materials**, v. 377, p. 391–398, 2019.

HUSSAIN, N., DAS, S., GOSWAMI, L., DAS, P., SAHARIAH, B., & BHATTACHARYA, S. S. Intensification of vermitechnology for kitchen vegetable waste and paddy straw employing earthworm consortium: assessment of maturity time, microbial community structure, and economic benefit. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 414–426, 2018.

ISLAM, S., AKANDA, A. M., PROVA, A., ISLAM, M. T., & HOSSAIN, M. M. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1360, 2016.

JANMOHAMMADI, M., & SABAGHNIA, N. Effect of pre-sowing seed treatments with silicon nanoparticles on germinability of sunflower (*Helianthus annuus*). **Bot Lith**, v. 21, n. 1, p. 13–21, 2015.

JELIHOVSCHI, E. G.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. B. ScottKnott: a package for performing the Scott-Knott clustering algorithm in R. **TEMA (São Carlos)**, v. 15, p. 3–17, 2014.

JHA, V., PUROHIT, H., DAFALE, N. A. Revealing the potential of *Klebsiella pneumoniae* PVN-1 for plant beneficial attributes by genome sequencing and analysis. **3 Biotech**, v. 11, n. 11, p. 1–11, 2021.

JI, S. H., GURURANI, M. A., CHUN, S.-C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 83–98, 2014.

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, p. 1–7, 2019.

KUAN, K. B., OTHMAN, R., ABDUL RAHIM, K., & SHAMSUDDIN, Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.

LIU, D. et al. *Klebsiella pneumoniae* SnebYK mediates resistance against *Heterodera glycines* and promotes soybean growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1134, 2018.

LOUDEN, B. C., HAARMANN, D., LYNNE, A. M. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. **Journal of Microbiology & Biology Education**, v. 12, n. 1, p. 51–53, 2011.

NAHAS, E., FORNASIERI, D., ASSIS, L. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 463–469, 1994.

OVES, M.; KHAN, M. S.; QARI, H. A. *Ensifer adhaerens* for heavy metal bioaccumulation, biosorption, and phosphate solubilization under metal stress condition. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 80, p. 540–552, 2017.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MAZUMDAR, D., SAHA, S. P., GHOSH, S. *Klebsiella pneumoniae* rs26 as a potent PGPR isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) rhizosphere. **Pharm. Innovat. Int. J**, v. 7, p. 56–62, 2018.

MENDIBURU, F. de (2021) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

MONDAL, M., BISWAS, J. K., TSANG, Y. F., SARKAR, B., SARKAR, D., RAI, M., ... & HOODA, P. S. A wastewater bacterium *Bacillus* sp. KUJM2 acts as an agent for remediation of potentially toxic elements and promoter of plant (*Lens culinaris*) growth. **Chemosphere**, v. 232, p. 439–452, 2019.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.

PRATUSH, A., KUMAR, A., HU, Z. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. **International Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 97–106, 2018.

R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAJ, D., MAITI, S. K. Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review. **Environmental monitoring and assessment**, v. 191, n. 9, p. 1–22, 2019.

- RAJAWAT, M. V. S., SINGH, S., TYAGI, S. P., & SAXENA, A. K. A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. **Pedosphere**, v. 26, n. 5, p. 768–773, 2016.
- RAJPUT, M. S., NARESH KUMAR, G., RAJKUMAR, S. Repression of oxalic acid-mediated mineral phosphate solubilization in rhizospheric isolates of *Klebsiella pneumoniae* by succinate. **Archives of microbiology**, v. 195, p. 81–88, 2013.
- RUIZ-BERRAQUERO, F., RAMOS-CORMENZANA, A. Relationship between amino acid production and phosphate-dissolving capacity of bacteria. **Folia Microbiologica**, v. 22, p. 40–42, 1977.
- SANDEEP, G., VIJAYALATHA, K., ANITHA, T. Heavy metals and its impact in vegetable crops. **International Journal of Chemical Studies**, p. 11, 2019.
- SARWAR, M., KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, p. 261–269, 1995.
- SCHWYN, B., NEILANDS, J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.
- SHARMA, A., KAPOOR, D., WANG, J., SHAHZAD, B., KUMAR, V., BALI, A. S., ... & YAN, D. Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: an overview. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 100, 2020.
- SHARON, J. A., HATHWAIK, L. T., GLENN, G. M., IMAM, S. H., & LEE, C. C. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 16, n. 2, p. 525–536, 2016.
- SHEPHERDSON, E. M., ELLIOT, M. A. Cryptic specialized metabolites drive *Streptomyces* exploration and provide a competitive advantage during growth with other microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 40, p. e2211052119, 2022.
- SINGH, P., ITANKAR, N., PATIL, Y. Biomanagement of hexavalent chromium: current trends and promising perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 111547, 2021.

VERMA, S., KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology & Innovation**, v. 14, p. 100369, 2019.

WAGI, S., AHMED, A. Bacillus spp.: potent microfactories of bacterial IAA. **PeerJ**, v. 7, p. e7258, 2019.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., & LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WICKHAM, H. (2016) ggplot2: **Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>.

World Health Organization, Chromium in Drinking-water Health Criteria and Other Supporting Information, Chromium in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization; 2020 (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.3).

ZHANG, H., YUAN, X., XIONG, T., WANG, H., & JIANG, L. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: influence factors, mechanisms and evaluation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 398, p. 125657, 2020.

ZHAO, X., JOO, J. C., KIM, J. Y. Evaluation of heavy metal phytotoxicity to *Helianthus annuus* L. using seedling vigor index-soil model. **Chemosphere**, v. 275, p. 130026, 2021.

Capítulo 3. Potencial *in vitro* do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 para remoção de cádmio, crômio e níquel

RESUMO

Águas residuárias industriais estão entre as principais fontes antrópicas de íons de metais potencialmente tóxicos (MPT), como cádmio, Cd^{2+} , crômio, Cr^{3+} e níquel, Ni^{2+} . A biorremediação representa uma alternativa sustentável para remoção desses íons. Para tanto, podem ser utilizados microrganismos vivos ou inativos, que sejam capazes de bioacumular e/ou adsorver tais espécies químicas. No presente trabalho, estudou-se o potencial *in vitro* da cepa *Cupriavidus* sp. 395/10, previamente isolada de solo tropical, contaminado com Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , para bioissorção/bioacumulação destas espécies químicas. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} para o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio caldo nutriente (CN), foram, respectivamente, 3, 4 e 225 mmol L^{-1} , enquanto, em meio CN contendo simultaneamente, os três íons metálicos, a CMI foi 1 mmol L^{-1} . O intervalo ótimo para a multiplicação celular ocorreu entre 12 e 24 h de cultivo, tanto na ausência como na presença de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , tendo sido observado aumento do pH do meio CN em função do aumento do tempo de incubação, culminando em pH entre cerca de 8,25 e 8,75; após 96 h de cultivo. Imagens da microscopia eletrônica de varredura mostraram alterações na morfologia e na quantidade de células de *Cupriavidus* sp. 395/10 após cultivo em meio contendo Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} . Nas micrografias da microscopia de transmissão foram observados no interior e na parede de algumas células do isolado aglomerados discretos de natureza eletrocondutora, sinalizando possível bioissorção/bioacumulação de Cd^{2+} , Cr^{3+} e/ou Ni^{2+} . Os resultados da análise das células de *Cupriavidus* sp. 395/10 por espectroscopia molecular na região do infravermelho (FTIR) evidenciaram a presença de grupos hidroxila e carbonila, na parede celular, que podem atuar como sítios de adsorção de íons metálicos. Os resultados obtidos sinalizaram que o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 possui mecanismos que podem ser explorados para a remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} de efluentes.

Palavras-chave: isolado bacteriano; bioissorção; bioacumulação; elementos potencialmente tóxicos; metais pesados; biorremediação.

Chapter 3. *In vitro* potential of Isolate *Cupriavidus* sp. 395/10 for cadmium, chromium, and nickel removal

ABSTRACT

Industrial wastewater is among the primary anthropogenic sources of potentially toxic metal ions (PTM) such as cadmium (Cd^{2+}), chromium (Cr^{3+}), and nickel (Ni^{2+}). Bioremediation represents a sustainable alternative for the removal of these ions. To achieve this, live or inactivated microorganisms capable of bioaccumulating and/or adsorbing such chemical species can be utilized. In the present study, the *in vitro* potential of the *Cupriavidus* sp. 395/10 strain, previously isolated from tropical soil contaminated with Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} , for biosorption/bioaccumulation of these chemical species was investigated. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} for the isolate *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivated in nutrient broth (NB), were 3, 4, and 225 mmol L⁻¹, respectively, while in NB containing all three metal ions simultaneously, the MIC was 1 mmol L⁻¹. The optimal interval for cell multiplication occurred between 12 and 24 h of cultivation, both in the absence and presence of Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} , with an observed increase in the pH of the NB medium over the incubation period, resulting in a pH range of approximately 8.25 to 8.75 after 96 h of cultivation. Scanning electron microscopy images showed changes in the morphology and cell quantity of *Cupriavidus* sp. 395/10 after cultivation in a medium containing Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} . Transmission electron microscopy micrographs revealed discrete clusters of electroconductive nature inside and on the cell wall of some cells of the isolate, suggesting possible biosorption/bioaccumulation of Cd^{2+} , Cr^{3+} , and/or Ni^{2+} . Results of molecular spectroscopy analysis in the infrared region (FTIR) on *Cupriavidus* sp. 395/10 cells demonstrated the presence of hydroxyl and carbonyl groups in the cell wall, which can act as sites for the adsorption of metal ions. The obtained results indicate that the isolate *Cupriavidus* sp. 395/10 possesses mechanisms that can be exploited for the removal of Cd^{2+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} from effluents.

Keywords: bacterial isolate; biosorption; bioaccumulation; potentially toxic elements; heavy metals; bioremediation.

3.1 Introdução

Embora, vários metais e outros elementos químicos possam desempenhar funções importantes no metabolismo dos seres vivos, alguns são necessários em quantidades mínimas, enquanto outros, não apresentam função biológica relevante, podendo causar danos ao organismo (Abdu et al., 2017). Assim, Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , são essenciais a vários organismos, sendo que, o aumento de suas concentrações melhora o desenvolvimento do organismo. Porém, acima de determinados limites de concentração, essas espécies químicas são tóxicas e podem ser letais (Mondal et al., 2019). Entretanto, Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} , não são essenciais aos seres vivos, mas podem ser tolerados por eles, desde que presentes no ambiente, em determinados intervalos de concentração, acima dos quais, se tornam tóxicos e letais (Sandeep et al., 2019).

Com o avanço do setor agrícola, cresceram a aplicação de pesticidas, a irrigação de cultivos com efluentes de estação de tratamento de esgotos, o uso de fertilizantes, tanto sintéticos, como na forma de biossólido (lodo de estações de tratamento de esgotos) e, conseqüentemente, houve aumento dos teores de metais potencialmente tóxicos, como Cd, Cr e Ni, no solo e em outros compartimentos ambientais (Li et al., 2019).

A exposição do ser humano a concentrações diminutas de Cd^{2+} pode acarretar disfunções renais, hepáticas e cardiovasculares, além de mutagênese e deterioração sensorial (Genchi et al., 2020). Como o Cd^{2+} não tem nenhuma função fisiológica relevante para as plantas, pode impactar negativamente processos vitais realizados por elas, tais como, atividade enzimática, mitose, fotossíntese e germinação, além da supressão da absorção de nutrientes (Genchi et al., 2020; Mondal et al., 2019).

Embora o Cr possa apresentar vários estados de oxidação o +3 e o +6 são os mais estáveis e comumente encontrados no ambiente e em águas residuárias (Vaiopoulou; Gikas, 2020; World Health Organization, 2020). No solo, o crômio predomina como crômio trivalente (Cr^{3+}) ou como crômio hexavalente (Cr^{6+}), mais tóxico do que o Cr^{3+} . Porém, Cr^{6+} é facilmente reduzido à Cr^{3+} pela matéria orgânica presente no solo (Vaiopoulou; Gikas, 2020; World Health Organization, 2020). Cr^{3+} é tóxico para as plantas e capaz de afetar o seu crescimento, pois

pode impedir processos metabólicos, causar clorose às folhas e danificar as raízes (Sharma et al., 2020).

O Ni^{2+} é considerado um micronutriente para as plantas e possui papel importante em uma diversificada gama de funções. Entretanto, em concentrações elevadas, afeta a atividade metabólica das plantas e o processo fotossintético (Genchi et al., 2020). A exposição humana a concentrações elevadas de Ni^{2+} pode causar câncer, doenças pulmonares, cardiovasculares, imunológicas, neurológicas e endócrinas (Jiang et al., 2019).

Águas residuárias industriais estão entre as principais fontes antrópicas de íons de metais potencialmente tóxicos (MPT), como Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} (Mallakpour; Khadem, 2019). Estes efluentes não podem ser lançados em corpos d'água sem tratamento prévio visando a remoção desses íons (Ma et al., 2020). Neste sentido, a biorremediação pode representar uma alternativa sustentável para remoção desses íons, possibilitando que o efluente tratado apresente Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , de acordo com os limites de concentração legalmente estabelecidos (Ahmad; Alshammari; Ibrahim, 2023). Para tanto, podem ser utilizados microrganismos vivos ou inativos, que sejam capazes de bioacumular e/ou adsorver íons de MPT (Liu et al., 2022).

A seleção de microrganismos para emprego em processos de biorremediação, cujo mecanismo envolvido é o de bioacumulação, deve contemplar alguns aspectos, entre os quais, o microrganismo deve ter sido isolado de ambiente poluído, pois a bioacumulação por microrganismos adaptados é mais eficiente do que por microrganismos não adaptados e, adicionalmente, o microrganismo deve ser resistente a concentrações elevadas de poluentes (Diep et al., 2018).

Dentro deste contexto, Minari e colaboradores (2020), isolaram 592 bactérias de amostras de solo tropical contaminado com cádmio, cromo e níquel e avaliaram o seu potencial para uso em biorremediação. As bactérias foram isoladas de amostras de solo de três áreas destinadas ao cultivo de milho, submetidas a diferentes tipos de manejo (Minari et al., 2017). Quatro isolados foram resistentes a Cr^{3+} ($3,06 \text{ mmol L}^{-1}$) e Cd^{2+} ($2,92 \text{ mmol L}^{-1}$). Um isolado foi resistente à Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} ($0,95 \text{ mmol dm}^{-3}$) e todos os isolados se desenvolveram em meio de cultivo contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ destes cátions metálicos além de removerem Cd^{2+} (17–33%) e Cr^{6+} (60–70%). O isolado 395/10,

identificado como *Cupriavidus* sp. foi capaz de remover 60% de Cr^{6+} do meio de cultivo e produzir ácido indol acético (AIA).

Assim, no presente trabalho, estudou-se a capacidade da bactéria *Cupriavidus* sp. 395/10, isolada de solo tropical contendo acúmulo de MPT, para remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , visando ampliar o conhecimento do potencial desta bactéria para biorremediação, tendo em vista o seu emprego futuro para tratamento de águas residuárias que contenham essas espécies químicas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Isolado bacteriano

A cepa *Cupriavidus* sp. 395/10 foi isolada por Minari e colaboradores (2020) a partir de amostras de solo da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV - UNESP, e identificada por sequenciamento do gene 16S rRNA. Este isolado mostrou-se promissor à produção de AIA e à remoção de Cr^{6+} do meio de cultivo. O isolado foi armazenado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, da FCAV - UNESP.

3.2.2 Meio de cultivo

O isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 foi cultivado em meio caldo nutriente (CN), composto por extrato de levedura ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), peptona (5 g L^{-1}) e NaCl (5 g L^{-1}), preparado a partir da dissolução destes reagentes em água deionizada, sendo o pH da solução resultante ajustado para 6,8. O meio foi autoclavado a 121°C e 1 atm, durante 20 min. Para cultivo em placas, esse meio foi acrescido de ágar bacteriológico ($10,0 \text{ g L}^{-1}$) e denominado nutriente ágar (NA).

3.2.3 Soluções estoques de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+}

Soluções estoque contendo Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} a $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por meio da dissolução em água deionizada de cloreto de cádmio(II) monohidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cloreto de crômio(III) hexahidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e

cloreto de níquel(II) hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), respectivamente. Previamente ao seu uso, tais soluções foram autoclavadas a 121 °C e 1 atm, durante 20 min.

3.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória

A toxicidade do Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} ao isolado de interesse foi avaliada por meio de ensaios, em triplicata, para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI). O isolado foi inoculado em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio CN líquido contendo de Cd^{2+} (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 mmol L^{-1}), Cr^{3+} (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5 mmol L^{-1}) ou Ni^{2+} (228,0; 228,5; 2290,0; 229,5; 230 mmol L^{-1}), assim como, os três íons metálicos na proporção estequiométrica de 1:1:1, foi utilizado as seguintes concentrações 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mmol L^{-1} . As suspensões bacterianas do controle e dos tratamentos foram incubadas à 30 °C e 150 rpm, por 96 h. Em seguida, 10 μL de suspensão foram inoculados em meio nutriente ágar (NA), mantido em B.O.D a 30°C por aproximadamente 96 h. A CMI foi estabelecida como a concentração de cada íon metálico, na qual o comportamento do isolado, após 96 h de incubação em meio NA sem Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , foi semelhante ao do controle (Gururajan; Belur, 2018; Bankar et al., 2018).

3.2.5 Curva de crescimento celular

Para a determinação da curva de crescimento celular do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, 10 μL da cultura estoque, mantida em criotubo a -80°C, foram transferidos para meio nutriente ágar (NA), incubado por 48 h, a 30 °C. Para obtenção do pré-inóculo, algumas alçadas foram transferidas do meio NA para tubo do tipo Falcon, contendo 50 μL do meio CN. Após agitação da suspensão bacteriana, uma alíquota foi transferida para 100 mL de meio CN até obtenção de densidade óptica, em 600 nm (DO_{600}), aproximadamente igual a 0,1; resultando no pré-inóculo, que foi incubado por 24 h a 150 rpm e 30°C.

Em seguida, 5,0 mL do pré-inóculo foram transferidos para 50 mL de meio CN, contendo Cd^{2+} (0,5 mmol L^{-1}), Cr^{3+} (2 mmol L^{-1}) ou Ni^{2+} (1 mmol L^{-1}) bem como, os três íons metálicos (0,25 mmol L^{-1}) na proporção de 1:1:1. A concentração de cada íon metálico foi definida a partir dos resultados dos ensaios da CMI, de forma que, nesta etapa, a avaliada para cada íon foi a

concentração mais próxima da CMI, porém inferior à mesma. Como controle, foi usado meio CN sem adição destes íons. O controle e os tratamentos foram incubados, a 30 °C, a 150 rpm, por 120 h. Nos tempos 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 h, foram retiradas alíquotas de suspensão bacteriana para a determinação da DO₆₀₀ em biofotômetro e plaqueamento em meio NA sem íon metálico. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h, para posterior contagem de unidades formadoras de colônias, UFC. Todos os ensaios foram realizados com três repetições.

3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

O isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 foi cultivado, por 24 h, a 30 °C e agitação de 150 rpm, em meio CN, sem os íons metálicos de interesse (controle), em meio com 0,5 mmol Cd²⁺ L⁻¹, 2 mmol Cr³⁺ L⁻¹, 1 mmol Ni²⁺ L⁻¹, e em meio contendo simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L⁻¹. Após o período de incubação, as suspensões foram centrifugadas, os pellets obtidos foram lavados com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH $\cong$ 7,2) e, posteriormente, ressuspensos em 500 μ L de glutaraldeído a 3%. As suspensões foram armazenadas a 4 °C por 4 h, centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, e aos pellets foi adicionado tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH $\cong$ 7,2). Posteriormente, o material foi encaminhado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP – USP, para realização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), em aparelhos da marca JEOL, modelos JSM-6610LV e JEM 1200 EX, respectivamente.

3.2.7 Determinação do pH do meio de cultivo em função do tempo de incubação do isolado

Para avaliar se o tempo de incubação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 afetava o pH do meio de cultivo CN, cujo pH inicial foi ajustado para 6,8; mediu-se o pH deste meio contendo Cd²⁺, Cr³⁺ e Ni²⁺, porém sem o isolado inoculado. Em outro ensaio, o isolado foi inoculado em meio CN sem metal (controle) e, paralelamente, no meio de cultivo contendo 0,5 mmol Cd²⁺ L⁻¹, 2 mmol Cr³⁺ L⁻¹, 1 mmol Ni²⁺ L⁻¹, bem como, em meio contendo conjuntamente os três íons metálicos a 0,25 mmol L⁻¹.

As suspensões foram incubadas por 0, 24, 48, 72 e 96 h, a 30 °C, em 150 rpm, e posteriormente, o pH foi medido. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.8 Espectroscopia molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Previamente a realização das análises por microscopia molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 foi cultivado conforme descrito na seção 3.2.6. Após 24 h de cultivo, 40 mL de suspensão bacteriana foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 3 vezes com pequenas porções de água deionizada, visando a remoção do meio de cultivo do meio de cultivo residual, e posteriormente, seco em estufa com circulação de ar, a 60 °C, até obtenção de massa constante. O material obtido foi encaminhado para o Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) da Universidade de São Paulo (USP), onde foi processado para obtenção de pastilhas de brometo de potássio (KBr) e analisado em espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo IRPrestige-21.

3.2.9 Remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+}

Para avaliar a capacidade do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 para a remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , do meio de cultivo, o isolado foi incubado em meio CN, contendo cada íon metálico 0,5 mmol Cd^{2+} L⁻¹, 2 mmol Cr^{3+} L⁻¹, 1 mmol Ni^{2+} L⁻¹, bem como, em meio contendo conjuntamente os três íons metálicos 0,25 mmol L⁻¹. O inóculo foi padronizado em 10 %(v/v) de um pré-inóculo de $\text{DO}_{600} = 0,1$. O cultivo foi realizado a 30 °C, com agitação de 150 rpm, por 96 h. Como controle, foi empregado meio CN contendo o(s) íon(s) metálico(s) potencialmente tóxico(s), porém, sem o isolado.

Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada e a concentração remanescente de cada íon metálico foi determinada no sobrenadante por espectroscopia de absorção atômica com chama de ar-acetileno. Os ensaios foram realizados com três repetições e a taxa de remoção de cada íon metálico, pelo isolado, foi calculada de acordo com Chen et al. (2008).

$$TR = \frac{C_o - C_f}{C_o} \times 100 \quad (1)$$

Na equação 1, C_o é concentração inicial do íon metálico no meio de cultivo e C_f é a concentração do íon metálico remanescente no meio, após o cultivo do isolado, ambas expressas em mg L^{-1} .

3.2.10 Análise estatística dos resultados

O teste ANOVA foi aplicado aos resultados dos ensaios para obtenção das curvas de crescimento e aos resultados das medidas pH do meio de cultivo. Utilizou-se o teste post-hoc Scott-Knott para a comparação par-a-par das médias ($p\text{-valor} \leq 0,05$), a fim de agrupá-las. Para tanto, empregou-se a função "SK" do pacote "ScottKnott" (Jelihovschi et al., 2014), desenvolvido para o programa estatístico R (R Core Team, 2020). Os gráficos foram obtidos com o auxílio do pacote R "ggplot2" (Wickham, 2016).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Concentração mínima inibitória

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} para o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN, foram, respectivamente, 3, 4 e 225 mmol L^{-1} , enquanto, em meio CN contendo simultaneamente, os três íons metálicos, a CMI foi 1 mmol L^{-1} . Ressalta-se que a CMI de Cd^{2+} para o isolado estudado no presente trabalho foi maior do que as observadas para outros isolados do mesmo gênero, conforme constatado por Vicentin e colaboradores (2018), em estudo realizado com os isolados *Cupriavidus* sp. LMG 19424 e *Cupriavidus* sp. UFLA 02-71, para os quais a CMIs de Cd^{2+} foram, respectivamente, 1,93 e 2 mmol L^{-1} .

Para o isolado *Cupriavidus metallidurans* CH34, cultivado em meio contendo succinato de sódio e em meio contendo benzeno, como fontes de carbono, as CMI de Cd^{2+} foram 4 e 0,8 mmol L^{-1} , respectivamente, conforme relatado por Alviz-Gazitua e colaboradores (2022). O estudo de Alviz-Gazitua e colaboradores (2022), demonstra a diversidade intrínseca de distintas linhagens de *Cupriavidus* sp., assim como, o impacto da composição do meio de cultivo

sobre o desenvolvimento bacteriano e sua capacidade de tolerância a metais potencialmente tóxicos.

3.3.2 Curva de crescimento celular

A multiplicação das células do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 foi exponencial durante o intervalo de tempo compreendido entre 4 e 8 h de incubação, exceto para o tratamento em meio CN contendo $0,5 \text{ mmol Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, no qual a multiplicação das células se manteve “constante” até 12 h de incubação (Figura 3.1A). Houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o controle, em 4, 8 e 96 h de incubação (Figura 3.1A). Em todos os tratamentos, o intervalo ótimo para a multiplicação celular ocorreu entre 12 e 24 h de cultivo (Figura 3.1A e B).

De acordo com a Figura 3.1, a partir de 36 h de cultivo houve declínio da DO_{600} e do número de UFCs. Observou-se declínio acentuado do número de UFCs, entre 4 e 8 h de cultivo, em meio contendo $0,5 \text{ mmol Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, o que sugere que este íon, na concentração especificada, afetou a viabilidade celular (Figura 3.1B). Em meio CN contendo $2 \text{ mmol Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$ também se observou diminuição do número de UFCs, embora menos acentuada em relação à observada no tratamento com Cd^{2+} . Para os demais tratamentos, houve declínio acentuado do número de UFCs a partir de 48 h do cultivo do isolado (Figura 3.2B). Além disso, ocorreram diferenças estatisticamente significativas em 8 e 120 h de cultivo.

A curva de crescimento celular do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 apresentou padrão semelhante à do isolado *Cupriavidus* sp. STL7, cultivado em pH 6,0 e a 30°C , conforme relatado por Gupta e colaboradores (2019). De acordo com Sun e colaboradores (2016), a multiplicação celular da linhagem *Cupriavidus* sp. S1 exibiu o seu ápice entre 18 e 24 h de incubação, corroborando com os resultados observados para o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, para o qual a multiplicação celular foi mais acentuada entre 12 e 24 h de cultivo.

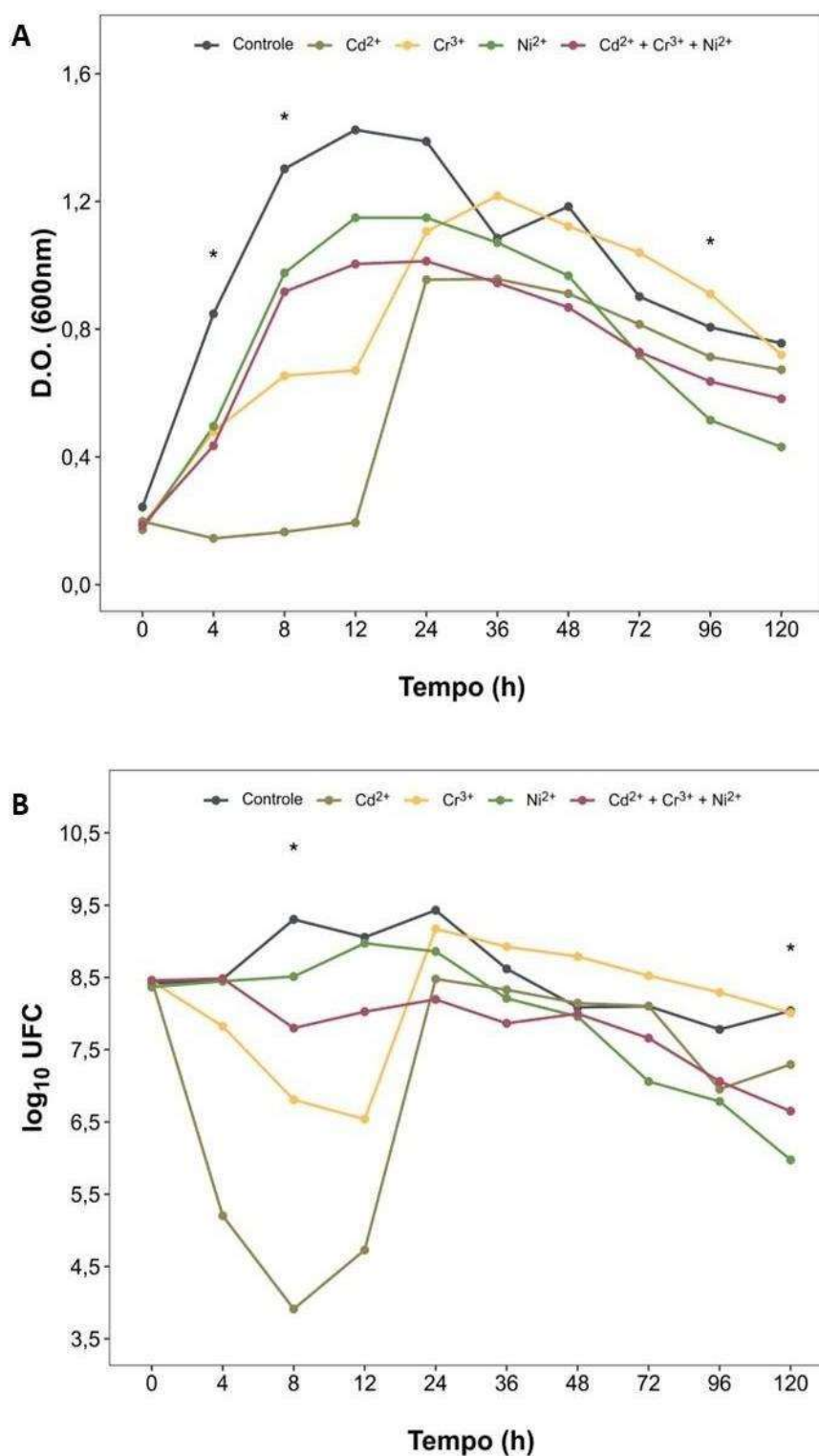


Figura 3.1. Curvas de crescimento do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, em meio CN sem íons de metais potencialmente tóxicos e em meio CN com 0,5 mmol Cd²⁺ L⁻¹, 2 mmol Cr³⁺ L⁻¹ e 1 mmol Ni²⁺ L⁻¹, e em meio contendo simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L⁻¹. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

3.3.3 Efeito do tempo de incubação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 no pH do meio de cultivo

Na Tabela 3.1 são apresentados os valores de pH do meio de cultivo CN sem os íons metálicos (controle) e contendo 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, 2 mmol $\text{Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$, 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, e simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L^{-1} , previamente a inoculação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10. Embora, inicialmente o pH do meio CN tenha sido ajustado para 6,80; a adição desses íons metálicos, em especial, o íon Cd^{2+} , baixou o pH inicial em cerca de 2 unidades.

Tabela 3.1. pH do meio de cultivo CN sem os íons metálicos (controle) e contendo 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, 2 mmol $\text{Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$, 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, e simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L^{-1} , previamente a inoculação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10. Médias de 3 repetições e respectivas estimativas do desvio padrão.

Meio de Cultivo CN	pH
Controle	6,80±0,00
Cd^{2+} 0,5mmol L^{-1}	4,93±0,06
Cr^{3+} 2 mmol L^{-1}	6,72±0,03
Ni^{2+} 1 mmol L^{-1}	6,13±0,11
Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} 0,25 mol L^{-1}	5,98±0,01

Na Figura 3.2 é apresentada a variação do pH do meio de cultivo CN em função do tempo de incubação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, para o meio sem íons de metais potencialmente tóxicos (controle) e com 0,5 mmol $\text{Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, 2 mmol $\text{Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$ e 1 mmol $\text{Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$, e simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L^{-1} .

No tempo 0, a inoculação do isolado em meio CN contendo Cr^{3+} 2 mmol L^{-1} resultou em diminuição acentuada do pH do meio em relação ao controle (Figura 3.2), e ao valor de pH apresentado na Tabela 3.1. Em todos os

tempos houve diferença estatística, quando comparado o pH do controle com os valores de pH dos tratamentos.

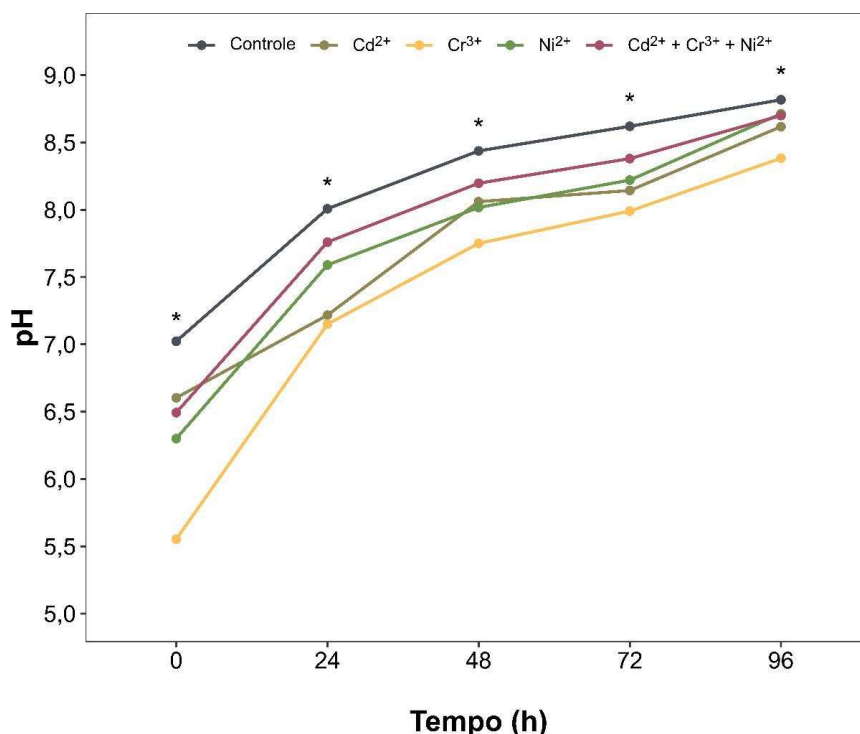


Figura 3.2. Efeito do tempo de incubação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, no pH do meio de cultivo CN, sem íons de metais potencialmente tóxicos (controle) e com 0,5 mmol Cd²⁺ L⁻¹, 2 mmol Cr³⁺ L⁻¹ e 1 mmol Ni²⁺ L⁻¹, e simultaneamente, na proporção estequiométrica 1:1:1, os três íons metálicos a 0,25 mmol L⁻¹. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Em todas as condições observou-se aumento do pH do meio de cultivo em função do aumento do tempo de incubação, culminando em pH entre cerca de 8,25 e 8,75; após 96 h de cultivo (Figura 3.2).

Os resultados observados no presente estudo corroboram com relatos presentes na literatura. Dentro deste contexto, a cepa *Cupriavidus* sp. Cd02, cultivada em meio contendo 2mg Cd²⁺L⁻¹, também promoveu aumento do pH inicial do meio de cultivo, de 7,5 para 8,4; após 120 h de incubação. Além disso, observou-se que aumentando-se a concentração de Cd²⁺, o aumento do pH foi menor comparado ao pH do controle (Li et al., 2019). Outro estudo, relata que o cultivo da cepa *Cupriavidus* sp. W12 em meio cujo pH inicial era 6,5; promoveu aumento do pH do meio para 8,5; após 120 h de incubação (Liu et al., 2022).

Tais achados podem sugerir que cepas do gênero *Cupriavidus* sp. produzem compostos que têm caráter básico fazendo com que haja aumento do pH do meio de cultivo, tornando-o alcalino, após determinado período de incubação (Li et al., 2019).

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 3.3 são apresentadas algumas imagens da microscopia eletrônica de varredura do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10. Comparando-se o controle (Figura 3.3A) com os tratamentos (Figura 3.3B/C/D/E) foram observadas alterações na morfologia das células, em especial, nas imagens B, C e D, e na quantidade de células (Figura 3B/C).

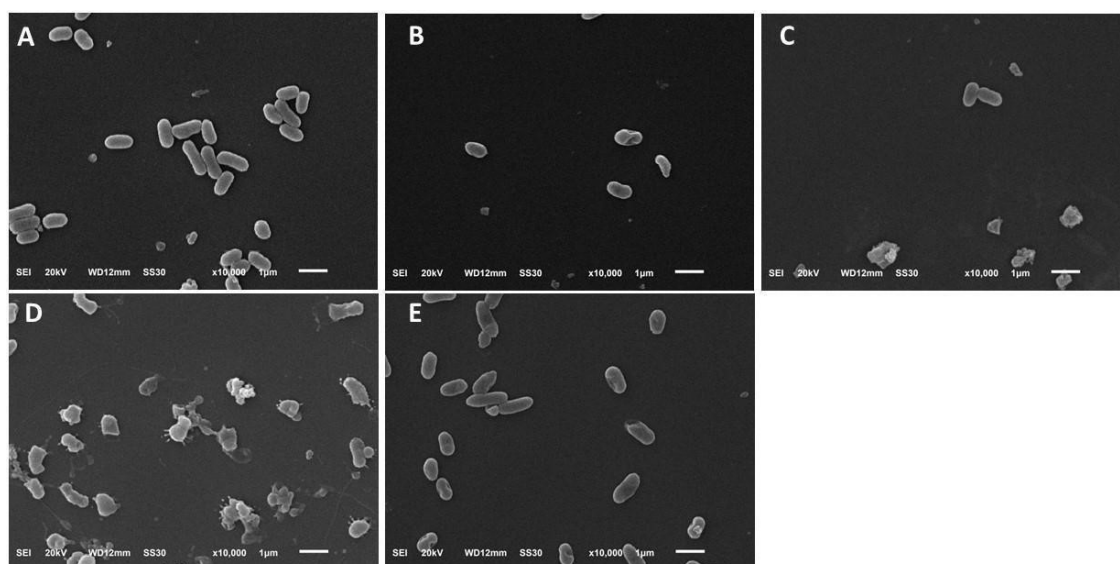


Figura 3.3. Imagens de células de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN, por 24 h e a 30 °C: **A.** controle (meio de cultivo sem MPT); **B.** 0,5 mmol Cd^{2+} L^{-1} ; **C.** 2 mmol Cr^{3+} L^{-1} ; **D.** 1 mmol Ni^{2+} L^{-1} ; **E.** meio CN contendo 0,25 mmol L^{-1} de cada íon metálico.

Segundo estudo conduzido por Zeng e colaboradores (2020), foram observadas alterações na parede celular e conexão das células de *Cupriavidus pauculus* 1490, cultivada em meio contendo 200 mg Cd^{2+} L^{-1} . diversidade nas características microbiológicas entre cepas do mesmo gênero.

No presente estudo notou-se modificação na parede celular, que passou a apresentar borda (forma) levemente irregular, quando a cepa *Cupriavidus* sp. 395/10 foi cultivada em meio CN contendo íons de metais potencialmente

tóxicos, de acordo com as imagens da Figura 3.3, em especial, as imagens C e D. Tais resultados, corroboram com os achados de Lata, Mishra e Kaur (2021), que em sua pesquisa, observaram mudanças na parede e no tamanho das células da cepa *Cupriavidus* sp. (SCd005) na presença de íons metálicos potencialmente tóxicos, como Cd^{2+} .

3.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Na Figura 3.4 são apresentadas as eletromicrografias de células do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 cultivado em meio CN sem íons de MPT e em meio contendo Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} .

Na Figura 3.4A, que corresponde a eletromicrografia do controle, é possível observar que a membrana celular do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 não é uniforme. Nas demais eletromicrografias, as quais correspondem as células do isolado, cultivado em meio contendo Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , observa-se que a membrana das células se tornou ainda mais irregular após sua exposição a estas espécies químicas (Figura 3.4B/C/D/E). Além disso, podem ser observados aglomerados discretos de natureza eletrocondutora, localizados no interior e na parede de algumas células, sinalizados por setas amarelas e vermelha, respectivamente (Figura 3.4C/D/E), e aumento do tamanho das células.

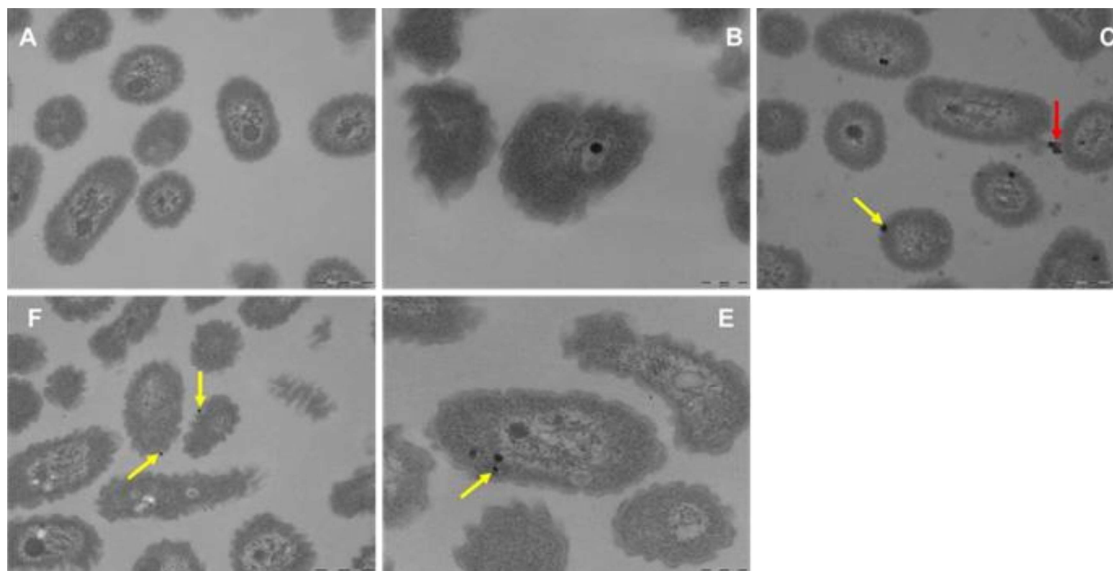


Figura 3.4. Eletromicrografias de células de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN, por 24 h e a 30 °C: **A.** controle (meio de cultivo sem MPT); **B.** 0,5 mmol Cd^{2+} L^{-1} ; **C.** 2 mmol Cr^{3+} L^{-1} ; **D.** 1 mmol Ni^{2+} L^{-1} ; **E.** meio CN contendo 0,25 mmol L^{-1} de cada íon metálico. Setas amarelas e vermelha sinalizam, respectivamente, aglomerados discretos de natureza eletrocondutora, localizados no interior e na parede das células.

Em estudo desenvolvido por Lata, Mishra e Kaur (2021), a cepa *Cupriavidus* sp. SCd005 adsorveu Cd^{2+} , tendo sido observado aumento do tamanho das células do isolado na presença de Cd^{2+} . Células de estirpes de *Cupriavidus* sp. expostas a íons metálicos potencialmente tóxicos podem sintetizar exopolissacarídeos (EPS), que recobrem a membrana celular, sendo esta, a estratégia adotada pela bactéria para se proteger da “intrusão” de íons metálicos potencialmente tóxicos. Os EPS sequestram (complexam) íons metálicos, evitando que estas espécies químicas atravessem a membrana celular e sejam bioacumuladas (Vicentin et al., 2018).

De acordo com Zeng e colaboradores (2020), células de *Bacillus* sp. S3 apresentaram alterações (irregularidades) morfológicas após exposição do isolado a íons metálicos potencialmente tóxicos. Neste sentido, células do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, também se tornaram mais irregulares após seu cultivo em meio contendo Cd^{2+} , Ni^{2+} e os três íons metálicos conjuntamente (Figura 3.4B/D/E).

3.3.6 Espectroscopia molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 3.5, são apresentados os espectros de transmissão de células de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN sem Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} (controle) e em meio de cultivo contendo tais espécies químicas.

A bioacumulação de MPT por microrganismos ocorre em duas etapas, ou seja, inicialmente tem-se a adsorção dos íons metálicos na parede celular do microrganismo, caracterizada por um mecanismo de natureza passiva e, posteriormente, tais íons atravessam a membrana da célula e se alojam em seu interior, sendo esta etapa dependente do metabolismo do microrganismo (Sprocati et al., 2006).

Assim, no presente estudo, a análise da biomassa microbiana inativa, por FTIR, visou identificar a presença de grupos funcionais, na membrana celular do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, que pudessem atuar como sítios de adsorção (Karlupudi et al., 2018) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , como também, a ocorrência de alterações no espectro de transmissão do material analisado, tais como, o

deslocamento de bandas de transmissão, supressão e/ou aparecimento de bandas adicionais (Faghihzadeh et al., 2016), decorrentes da bioadsorção desses íons metálicos, pelo isolado.

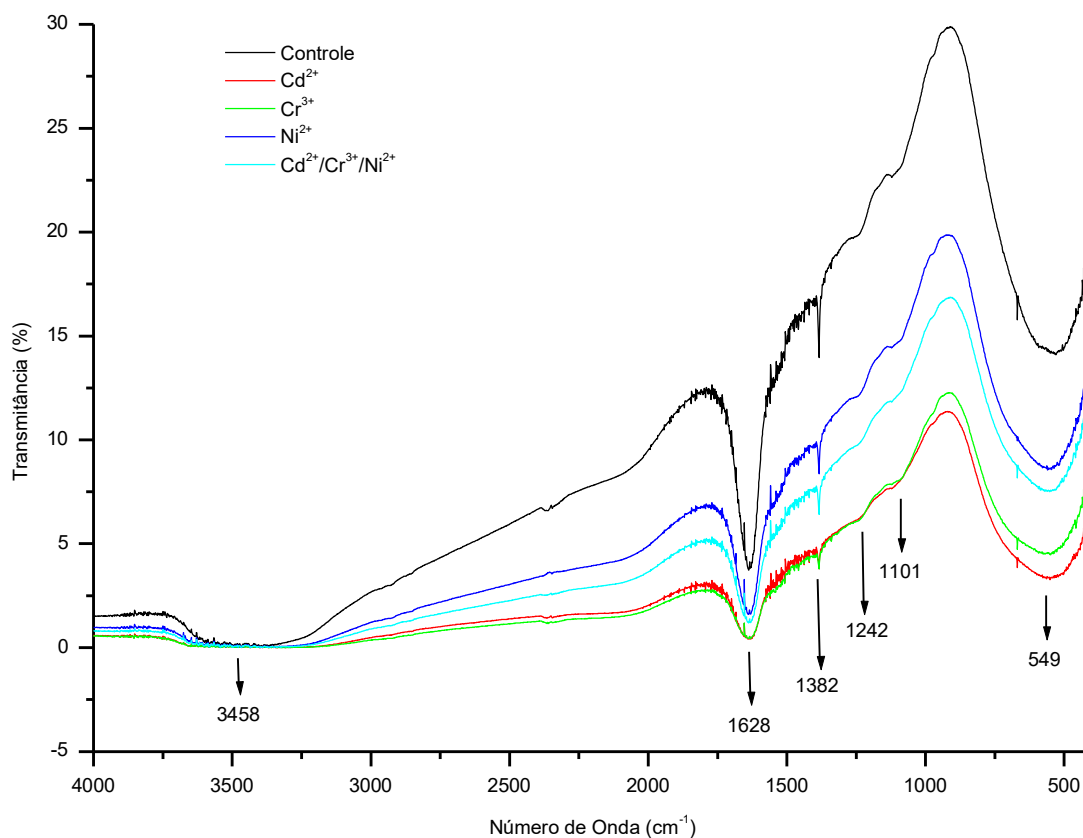


Figura 3.5. Espectros de transmitância na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado por 24 h em meio CN sem Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} (controle) e em meio contendo estas espécies químicas.

Na Figura 3.5, verificam-se bandas de transmissão, na região de $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, que podem estar relacionadas ao estiramento O-H, decorrente da presença de grupo hidroxil (OH), em 3458 cm^{-1} , típico de álcool, encontrado em carboidratos ou ao estiramento N-H, decorrente da presença de grupamento amina (Barbosa, 2007). A banda em 1628 cm^{-1} é, possivelmente, devida ao estiramento C=O e indicativa da presença de moléculas carboniladas na parede celular. As bandas em 1382 , 1242 e 1101 cm^{-1} podem estar relacionadas ao estiramento C-O-C, devido a presença de grupamento éster.

O espectro do controle e os espectros dos tratamentos (Figura 3.5), exibiram o mesmo perfil, ou seja, em todos, as bandas de transmissão ocorrem

nas mesmas regiões, de forma que, não houve deslocamento de bandas, de uma região para outra, supressão se bandas ou aparecimento de novas bandas, após o cultivo do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 em meio CN contendo Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} . Entretanto, de forma geral, as bandas existentes nas regiões apontadas são mais intensas no espectro do controle do que nos espectros dos tratamentos.

3.3.7 Remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+}

Na Tabela 3.2 são apresentadas as taxas de remoção (TR) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , pelo isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, após seu cultivo, por 24 h, em meio contendo, separadamente, Cd^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cr^{3+} ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e Ni^{2+} ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), assim como, em meio contendo os três íons metálicos conjuntamente, sendo $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de cada íon.

Tabela 3.2. Taxas de remoção (TR) de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} , pelo isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, após seu cultivo, por 24 h, em meio contendo, separadamente, Cd^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cr^{3+} ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e Ni^{2+} ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), assim como, em meio contendo os três íons metálicos conjuntamente, sendo $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de cada íon.

Íon Metálico	TR (%)
Cd^{2+}	13,8
Cr^{3+}	0,0
Ni^{2+}	2,9
Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+}	0,0/11,0/21,9

Embora na imagem da microscopia eletrônica de transmissão das células de *Cupriavidus* sp. 395/10, cultivado em meio CN contendo $0,5 \text{ mmol Cd}^{2+} \text{ L}^{-1}$, não tenham sido observados aglomerados de natureza eletrocondutora, localizados no interior ou na parede das células (Figura 3.4B), a concentração de Cd^{2+} remanescente no meio de cultivo, após 24 h de incubação, foi menor do que a concentração inicial deste íon, resultando na taxa de remoção (13,8%) presente na Tabela 3.2. Em contrapartida, apesar da micrografia das células do

isolado cultivado em meio CN contendo $2,0 \text{ mmol Cr}^{3+} \text{ L}^{-1}$, ter apresentado alguns grânulos de natureza eletrocondutora no interior e na parede das células (Figura 3.4C), sinalizando à possível bioissorção/bioacumulação desse íon metálico, pelo isolado, a concentração de Cr^{3+} no meio de cultivo após 24 h de incubação, foi igual a concentração inicialmente presente no meio, apontando para a não remoção desse íon. Houve discreta remoção de Ni^{2+} (Tabela 3.2/ Figura 3.4D) do meio de cultivo, após 24 h de incubação do isolado *Cupriavidus* sp. 395/10 em meio CN contendo $1 \text{ mmol Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$.

Em meio de cultivo CN contendo simultaneamente $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de cada íon metálico potencialmente tóxico, observou-se que não houve remoção de Cd^{2+} , apesar da sua concentração inicial ser metade da concentração utilizada nos ensaios conduzidos apenas com a presença deste íon, no meio de cultivo. É possível que este resultado esteja relacionado a presença de Cr^{3+} e Ni^{2+} , além de Cd^{2+} , no meio de cultivo. Nestas mesmas condições, observou-se que houve remoção de Cr^{3+} e aumento na taxa de remoção de Ni^{2+} , para os quais, as concentrações iniciais no meio de cultivo foram, respectivamente, 8 e 4 vezes menores do que as usadas nos ensaios conduzidos com cada íon separadamente, além disso, cabe ressaltar que ambos são micronutrientes.

Há relatos na literatura, de estudos desenvolvidos por outros pesquisadores, no quais foram obtidos resultados que demonstram o potencial de isolados do gênero *Cupriavidus*, tais como, *Cupriavidus necator* UFLA0271 (Ferreira et al., 2018) e *Cupriavidus necator* GX_5 (CP002878) (Li et al., 2018) para remoção de Cd^{2+} , e *Cupriavidus necator* H16 (Akkurt et al., 2023), para remoção de Cd^{2+} e Cr^{6+} .

Um estudo preliminar realizado com o isolado *Cupriavidus* sp. 395/10, incubado por 96 h em meio CN contendo, inicialmente, e separadamente, Cd^{2+} e Cr^{6+} , 5 mmol L^{-1} , as taxas de remoção obtidas foram 28,2 e 60,8%, respectivamente (Minari et al., 2020). Estes resultados são superiores aos obtidos no presente trabalho, no qual as concentrações iniciais de Cd^{2+} e Cr^{3+} avaliadas foram, respectivamente, 10 e 2,5 vezes menores, assim como, o tempo de contato, 24 h. É possível que as condições experimentais adotadas por Minari e colaboradores (2020), tenham favorecido a bioissorção e/ou outros processos de remoção de Cd^{2+} e Cr^{6+} , culminando nos resultados obtidos pelos pesquisadores.

3.4 Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que a linhagem do gênero *Cupriavidus* sp. avaliada, possui mecanismos que podem ser explorados para a remoção de Cd^{2+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} de efluentes. Esta cepa mostrou uma taxa de crescimento robusta e capacidade de suportar altas concentrações desses íons. Para uma compreensão mais aprofundada da capacidade da cepa para remoção destas espécies químicas de efluentes que as contêm e aplicação prática da cepa *Cupriavidus* sp. no campo da biorremediação ambiental, é necessário realizar estudos com maior tempo de incubação e com outras concentrações destas espécies químicas.

3.5 Referências bibliográficas

ABDU, N., ABDULLAHI, A. A., ABDULKADIR, A. Heavy metals and soil microbes. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 65–84, 2017.

ADELEKE, B. S., BABALOLA, O. O. Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 9, p. 4666–4684, 2020.

AHMAD, A., ALSHAMMARI, M. B., IBRAHIM, M. N. M. Impact of self-fabricated graphene–metal oxide composite anodes on metal degradation and energy generation via a microbial fuel cell. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 163, 2023.

ALABOUDI, K. A., AHMED, B., BRODIE, G. Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, n. 1, p. 123–127, 2018.

ALI, H., KHAN, E. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’ – proposal of a comprehensive definition. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 6 – 19, 2018.

ALVIZ-GAZITUA, P., DURÁN, R. E., MILLACURA, F. A., CÁRDENAS, F., ROJAS, L. A., & SEEGER, M. *Cupriavidus metallidurans* CH34 possesses aromatic catabolic versatility and degrades benzene in the presence of mercury and cadmium. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 484, 2022.

ANYANWU, E. D., UMEHAM, S. N. An index approach to heavy metal pollution assessment of Eme River, Umuahia, Nigeria. **Sustainability, Agri, Food and Environmental Research**, v. 8, n. 4, 2020.

ASHRAF, S., ALI, Q., ZAHIR, Z. A., ASHRAF, S., & ASGHAR, H. N. Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 174, p. 714–727, 2019.

ASGHAR, H., ZAHIR, Z., ARSHAD, M., KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231–237, 2002.

AKKURT, Ş., ALKAN UÇKUN, A., VARINCA, K., & UÇKUN, M. Ability of *Cupriavidus necator* H16 to resist, bioremove, and accumulate some hazardous metal ions in water. **Water Science and Technology**, 2023.

AWA, S. H.; HADIBARATA, T. Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 2, p. 1–15, 2020.

BAHADUR, A., AHMAD, R., AFZAL, A., FENG, H., SUTHAR, V., BATOOL, A., KHAN, A., MAHMOOD-UL-HASSAN, M. The influences of Cr-tolerant rhizobacteria in phytoremediation and attenuation of Cr(VI) stress in agronomic sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Chemosphere**, v. 179, p. 112–119, 2017.

BANKAR, A., ZINJARDE, S., SHINDE, M., GOPALGHARE, G., & RAVIKUMAR, A. Heavy metal tolerance in marine strains of *Yarrowia lipolytica*. **Extremophiles**, v. 22, p. 617–628, 2018.

BISWAS, J.K., MONDAL, M., RINKLEBE, J., SARKAR, S.K., CHAUDHURI, P., RAI, M., SHAHEEN, S.M., SONG, H., RIZWAN, M. Multi-metal resistance and plant growth promotion potential of a wastewater bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and its synergistic benefits. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 39, n. 6, p. 1583–1593, 2017.

CHAUHAN, P.; MATHUR, J. Phytoremediation efficiency of *Helianthus annuus* L. for reclamation of heavy metals-contaminated industrial soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 29954–29966, 2020.

CHAUHAN, P.; MATHUR, J. Potential of *Helianthus annuus* for phytoremediation of multiple pollutants in the environment: A Review. **Journal of Biological Sciences and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 5–16, 2018.

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

DA SILVA ARAÚJO, A., DA SILVA, D. J., DE SOUZA SILVA, A. V., MAGALHÃES, I. C. S., & DE BARROS, R. P. Análise da fenologia do Girassol *Helianthus annuus* L. variedade anão. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 184–190, 2018.

DE ALMEIDA BARBOSA, L. C. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. [s.l.] Ed. UFV, 2007.

DE LEÓN-GÓMEZ, H., DEL CAMPO-DELGADO, M. A. M., ESTELLER-ALBERICH, M. V., VELASCO-TAPIA, F., ALVA-NIÑO, E., & CRUZ-LÓPEZ, A. Assessment of nitrate and heavy metal contamination of groundwater using the heavy metal pollution index: case study of Linares, Mexico. **Environmental Earth Sciences**, v. 79, n. 18, p. 1–19, 2020.

DIAS, S.P.; VAGHETTI, J. P.; LIMA, E. C.; BRASIL, J. L. **Química Analítica: Teoria e Prática Essenciais**. Bookman, 2016.

DIEP, P.; MAHADEVAN, R.; YAKUNIN, A. F. Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 157, 2018.

ELBESHEHY, E. K.; ELAZZAZY, A. M.; AGGELIS, G. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 453, 2015.

FAGHIHZADEH, F., ANAYA, N. M., SCHIFMAN, L. A., & OYANEDEL-CRAVER, V. Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, v. 1, p. 1–16, 2016.

FERNÁNDEZ, P. M., VIÑARTA, S. C., BERNAL, A. R., CRUZ, E. L., & FIGUEROA, L. I. Bioremediation strategies for chromium removal: current research, scale-up approach and future perspectives. **Chemosphere**, v. 208, p. 139–148, 2018.

FERREIRA, P. A. A., BOMFETI, C. A., SOARES, C. R. F. D. S., SOARES, B. L., & MOREIRA, F. M. D. S. *Cupriavidus necator* strains: zinc and cadmium tolerance and bioaccumulation. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 452–460, 2018.

GAYATRI, N.; SAILESH, A. R.; SRINIVAS, N. Phytoremediation Potential of *Brassica juncea* for removal of selected heavy metals in urban soil amended with cow dung. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 10, n. 5, p. 463–469, 2019.

GENCHI, G., CAROCCI, A., LAURIA, G., SINICROPI, M. S., & CATALANO, A. Nickel: Human health and environmental toxicology. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 679, 2020.

GENCHI, G., SINICROPI, M. S., LAURIA, G., CAROCCI, A., & CATALANO, A. The effects of cadmium toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 3782, 2020.

GOHIL, R. B., RAVAL, V. H., PANCHAL, R. R., & RAJPUT, K. N. Plant growth promoting activities and effect of fermented panchagavya isolate *Klebsiella* sp. PG-64 on *Vigna radiata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 41, 2023.

GORDON S. A., WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 2, p. 192, 1951.

GUPTA, J., RATHOUR, R., SINGH, R., & THAKUR, I. S. Production and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) generated by a

carbofuran degrading strain *Cupriavidus* sp. ISTL7. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 417–424, 2019.

GURURAJAN, K.; BELUR, P. D. Screening and selection of indigenous metal tolerant fungal isolates for heavy metal removal. **Environmental Technology & Innovation**, v. 9, p. 91–99, 2018.

HAO, X., ZHU, J., RENSING, C., LIU, Y., GAO, S., CHEN, W., HUANG, Q., LIU, Y. R. Recent advances in exploring the heavy metal(loid) resistant microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 94–109, 2021.

HUSSAIN, N., DAS, S., GOSWAMI, L., DAS, P., SAHARIAH, B., & BHATTACHARYA, S. S. Intensification of vermitechnology for kitchen vegetable waste and paddy straw employing earthworm consortium: assessment of maturity time, microbial community structure, and economic benefit. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 414–426, 2018.

ISLAM, S., AKANDA, A. M., PROVA, A., ISLAM, M. T., & HOSSAIN, M. M. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1360, 2016.

JIANG, D., YANG, Y., HUANG, C., HUANG, M., CHEN, J., RAO, T., RAN, X. Removal of the heavy metal ion nickel(II) via an adsorption method using flower globular magnesium hydroxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 373, p. 131–140, 2019.

KARLAPUDI, A. P., VENKATESWARULU, T. C., TAMMINEEDI, J., KANUMURI, L., RAVURU, B. K., RAMU DIRISALA, V., & KODALI, V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. **Petroleum**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2018.

KHAN, A. H. A., KIYANI, A., MIRZA, C. R., BUTT, T. A., BARROS, R., ALI, B., IQBAL, M., YOUSAF. Ornamental plants for the phytoremediation of heavy metals: Present knowledge and future perspectives. **Environmental Research**, v. 195, p. 110780, 2021.

KUSS, A. V., KUSS, V. V., LOVATO, T., FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459–1465, 2007.

LATA, S., MISHRA, T., KAUR, S. Cadmium Bioremediation Potential of *Bacillus* sp. and *Cupriavidus* sp. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, 2021.

LARKIN, P. **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. [s.l.] Elsevier, 2017.

LEE, S., KHANAL, A., CHO, A. H., LEE, H., KANG, M.S., UNNO, T., HOR-GIL H., JI-HOON L. *Cupriavidus* sp. strain Ni-2 resistant to high concentration of nickel and its genes responsible for the tolerance by genome comparison. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 10, p. 1323–1331, 2019.

LI, C., ZHOU, K., QIN, W., TIAN, C., QI, M., YAN, X., & HAN, W. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 28, n. 4, p. 380–394, 2019.

LI, F., ZHENG, Y., TIAN, J., GE, F., LIU, X., TANG, Y., & FENG, C. *Cupriavidus* sp. strain Cd02-mediated pH increase favoring bioprecipitation of Cd²⁺ in medium and reduction of cadmium bioavailability in paddy soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109655, 2019.

LI, X., LI, D., YAN, Z., & AO, Y. Biosorption and bioaccumulation characteristics of cadmium by plant growth-promoting rhizobacteria. **RSC Advances**, v. 8, n. 54, p. 30902–30911, 2018.

LIU, Q., DING, X., PANG, Y., CAO, Y., LEI, J., WU, J., & ZHANG, T. New insights into the safety assessment of quantum dots: potential release pathways, environmental transformations, and health risks. **Environmental Science: Nano**, 2022.

LIU, J., SU, J., ALI, A., WANG, Z., & ZHANG, R. Potential of a novel facultative anaerobic denitrifying *Cupriavidus* sp. W12 to remove fluoride and calcium

through calcium bioprecipitation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, p. 126976, 2022.

MA, J., WU, S., SHEKHAR, N. V., BISWAS, S., & SAHU, A. K. Determination of physicochemical parameters and levels of heavy metals in food waste water with environmental effects. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2020, 2020.

MAHARDIKA, G., RINANTI, A., FACHRUL, M. **Phytoremediation of heavy metal copper (Cu^{2+}) by sunflower (*Helianthus annuus* L.)**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**IOP Publishing, 2018.

MALLICK, I., HOSSAIN, S. T., SINHA, S., & MUKHERJEE, S. K. *Brevibacillus* sp. KUMAs2, a bacterial isolate for possible bioremediation of arsenic in rhizosphere. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 236–244, 2014.

MALLAKPOUR, S.; KHADEM, E. Carbon nanotubes for heavy metals removal. Em: **Composite nanoadsorbents**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 181–210.

MINARI, G. D., SARAN, L. M., LIMA CONSTANCIO, M. T., CORREIA DA SILVA, R., ROSALEN, D. L., JOSÉ DE MELO, W., & CARARETO ALVES, L. M. Bioremediation potential of new cadmium, chromium, and nickel-resistant bacteria isolated from tropical agricultural soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111038, 2020.

MINARI, G. D., ROSALEN, D. L., DA CRUZ, M. C. P., DE MELO, W. J., ALVES, L. M. C., & SARAN, L. M. Agricultural management of an Oxisol affects accumulation of heavy metals. **Chemosphere**, v. 185, p. 344–350, out. 2017.

MONDAL M, BISWAS J. K., TSANG Y. F., SARKAR B., SARKAR D., RAI M., SARKAR S. K., HOODA P. S. A wastewater bacterium *Bacillus* sp. KUJM2 acts as an agent for remediation of potentially toxic elements and promoter of plant (*Lens culinaris*) growth. **Chemosphere**, v. 232, p. 439–452, 2019.

NUNES, R. T. C., NETO, A. C. A., SOUZA, U. O., MORAIS, O. M. Desempenho germinativo de sementes de girassol submetidas ao estresse salino. **Revista Cultura Agronômica**, v. 25, n. 1, p. 79–92, 2016.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4a edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

POKETHITIYOOK, P.; POOLPAK, T. Biosorption of heavy metal from aqueous solutions. In: **Phytoremediation**, p. 113–141. Springer, 2016.

PRATUSH, A., KUMAR, A., HU, Z. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. **International Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 97–106, 2018.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019.

SANDEEP, G., VIJAYALATHA, K., ANITHA, T. Heavy metals and its impact in vegetable crops. **International Journal of Chemical Studies**, v. 7, n. 1, p. 1612–1621, 2019.

SARWAR, M., KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, p. 261-269, 1995.

SAS-NOWOSIELSKA, A., KUCHARSKI, R., MAŁKOWSKI, E., POGRZEBA, M., KUPERBERG, J. M., & KRYŃSKI, K. J. E. P. Phytoextraction crop disposal—an unsolved problem. **Environmental Pollution**, v. 128, n. 3, p. 373–379, 2004.

SHARMA, A., KAPOOR, D., WANG, J., SHAHZAD, B., KUMAR, V., BALI, A. S., JASROTINA, S., ZHENG., YUAN, H., YAN, D. Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: An Overview. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 100, 13, 2020.

SHEHATA, S. M., BADAWEY, R. K., ABOULSOUD, Y. I. Phytoremediation of some heavy metals in contaminated soil. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1–15, 2019.

SHI, Z., ZHANG, Z., YUAN, M., WANG, S., YANG, M., YAO, Q., BA, W., ZHAO, J., XIE, B. Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2. **Chemosphere**, v. 247, p. 125834, 2020.

SHI, Y., YAN, X., LI, Q., WANG, X., XIE, S., CHAI, L., & YUAN, J. Directed bioconversion of Kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 238–242, 2017.

SPROCATI, A. R., ALISI, C., SEGRE, L., TASSO, F., GALLETTI, M., & CREMISINI, C. Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. **Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2–3, p. 649–658, 2006.

SUN, Z., LV, Y., LIU, Y., & REN, R. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 142–150, 2016.

SUMIAHADI, A.; ACAR, R. **A review of phytoremediation technology: heavy metals uptake by plants**. IOP conference series: earth and environmental science. **Anais** IOP Publishing, v. 142, p. 012023 2018.

TIMKOVÁ, I., SEDLÁKOVÁ-KADUKOVÁ, J.; PRISTAŠ, P. Biosorption and bioaccumulation abilities of actinomycetes/streptomyces isolated from metal contaminated sites. **Separations**, v. 5, n. 4, p. 54, 2018.

TORRES, S. B., QUEIROZ, A. L. F. G., SANTOS, A. N. A., ALVES, G. Q., SILVA, I. A., BRITO, J. K. C., SULTANUN, R. F. S., MONTEIRO, A. C. S. Óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) como cicatrizante de feridas em idosos diabéticos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 4692–4703, 2021.

VAIOPOULOU, E.; GIKAS, P. Regulations for chromium emissions to the aquatic environment in Europe and elsewhere. **Chemosphere**, v. 254, p. 126876, 2020.

VERMA, S.; KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology & Innovation**, v. 14, p. 100369, 2019.

VEMPATI, R. K., RAO, A., HESS, T. R., COCKE, D. L., & LAUER JR, H. V. Fractionation and characterization of Texas lignite class 'F' fly ash by XRD, TGA, FTIR, and SFM. **Cement and Concrete Research**, v. 24, n. 6, p. 1153–1164, 1994.

VICENTIN, R. P., SANTOS, J. V. D., LABORY, C. R. G., COSTA, A. M. D., MOREIRA, F. M. D. S., & ALVES, E. Tolerance to and Accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by *Cupriavidus necator*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 42, 2018.

VOCCIANTE, M., CARETTA, A., BUA, L., BAGATIN, R., FRANCHI, E., PETRUZZELLI, G., & FERRO, S. Enhancements in phytoremediation technology: environmental assessment including different options of biomass disposal and comparison with a consolidated approach. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 560–568, 2019.

World Health Organization, Chromium in Drinking-water Health Criteria and Other Supporting Information, Chromium in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization; 2020 (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.3).

ZHANG, H., YUAN, X., XIONG, T., WANG, H., & JIANG, L. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: influence factors, mechanisms and evaluation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 398, p. 125657, 2020.

ZENG, W., ZHANG, S., XIA, M., WU, X., QIU, G., & SHEN, L. Insights into the production of extracellular polymeric substances of *Cupriavidus pauculus* 1490 under the stimulation of heavy metal ions. **RSC Advances**, v. 10, n. 34, p. 20385–20394, 2020.

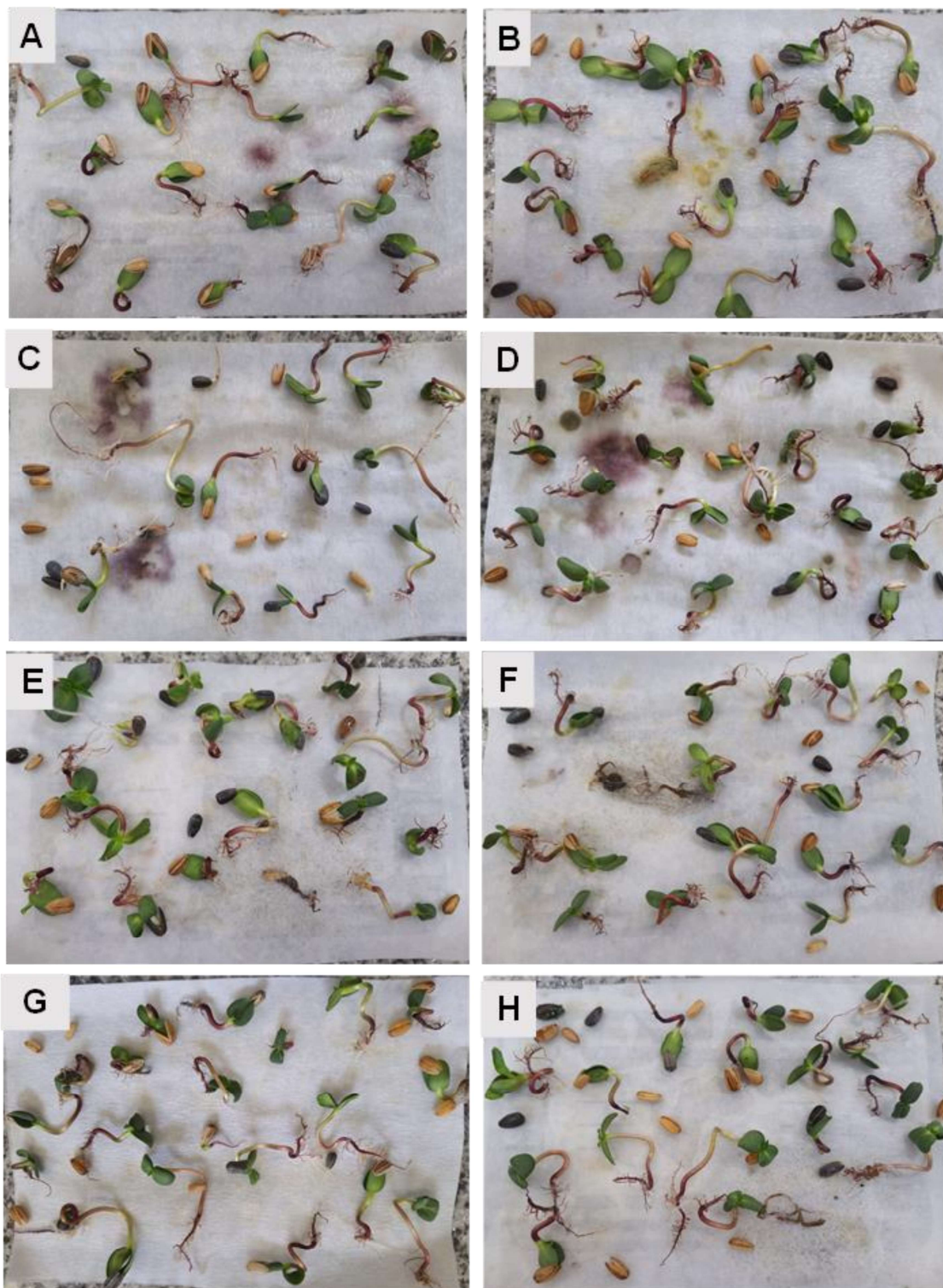
ZENG, W.; LI, F.; WU, C.; YU, R.; WU, X.; SHEN, L.; LIU, Y. QIU, G.; LI, J. Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus* sp. S3 to multiple heavy metals. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 1, p. 153-167, 2020.

4 Considerações finais

Neste estudo, foi investigado o potencial das cepas de *Klebsiella* sp. LM09 e *Cupriavidus* sp. 395/10 para a biorremediação de solos e efluentes contaminados com metais potencialmente prejudiciais, respectivamente. Os resultados foram promissores no que diz respeito à capacidade da cepa *Klebsiella* sp. LM09 para promoção de crescimento de plantas, uma vez que sua produção de ácido indolacético (AIA) superou a de cepas estudadas por outros pesquisadores. Além disso, a *Klebsiella* sp. LM09 solubilizou nutrientes inorgânicos, o que é fundamental para auxiliar no crescimento das plantas. Observeu-se a inoculação da cepa *Klebsiella* sp. LM09 foi eficaz na proteção das plantas de *Helianthus annuus* L. expostas a metais potencialmente tóxicos.

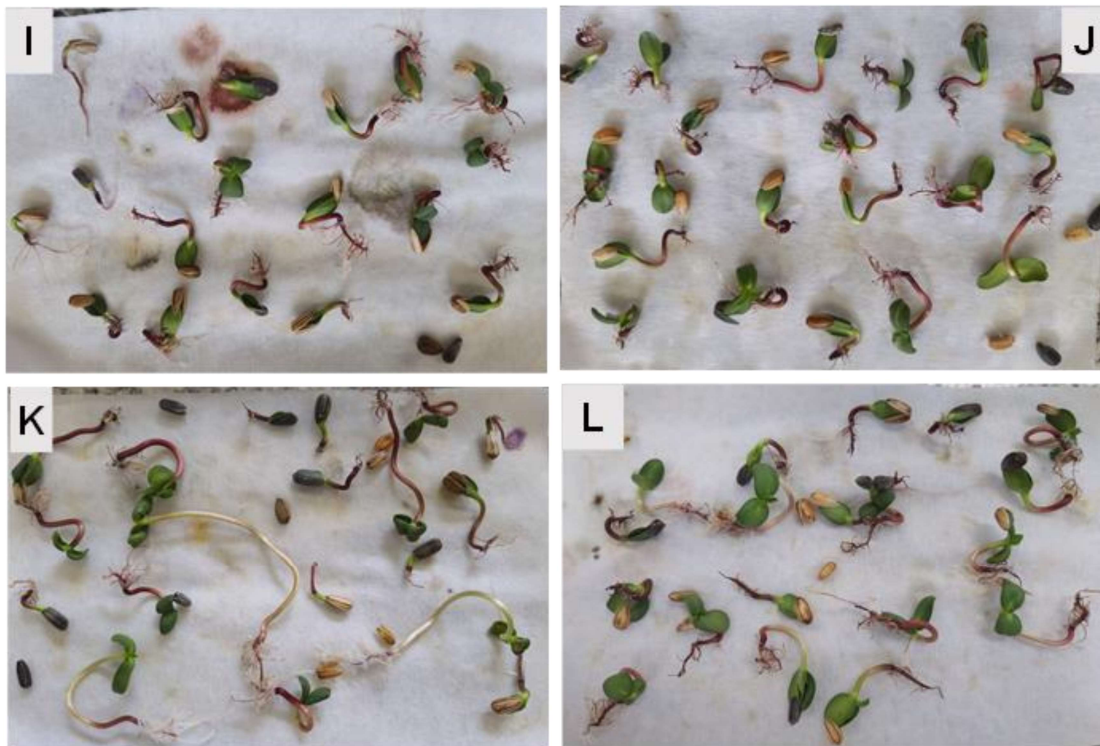
Para a cepa *Cupriavidus* sp. 395/10, também foram obtidos resultados promissores para sua aplicação em biorremediação. Essa cepa foi tolerante aos metais potencialmente tóxicos estudados e suas células foram capazes de se multiplicar em condições adversas, recorrendo a mecanismos de defesa, como a alcalinização do meio de cultivo, para sua sobrevivência na presença desses metais.

Para um entendimento mais abrangente e direcionado, estudos futuros devem estender o período de avaliação das cepas e diversificar as concentrações de metais usadas. Além disso, é importante explorar o potencial dessas cepas em relação a outros metais potencialmente tóxicos encontrados em solos e efluentes, para que seja possível direcionar sua utilização com maior precisão, aproveitando ao máximo suas capacidades.

ANEXO I. Imagens dos ensaios de germinação de sementes de girassol.

A e B. Controle com e sem bactéria inoculada, respectivamente. **C e D.** Meio CN contendo Cd^{2+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente. **E e F.** Meio CN contendo Cr^{3+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente. **G e H.** Meio CN contendo Cr^{6+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente.

ANEXO I. Imagens dos ensaios de germinação de sementes de girassol (continuação).



I e J. Meio CN contendo Cu^{2+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente.

K e L. Meio CN contendo Hg^{2+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente.

ANEXO II. Imagens dos ensaios de crescimento de plântulas de girassol.

A e B. Controle com e sem bactéria inoculada, respectivamente. **C e D.** Meio CN contendo Cd^{2+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente. **E e F.** Meio CN contendo Cr^{3+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente. **G e H.** Meio CN contendo Cr^{6+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente.

ANEXO II. Imagens dos ensaios de crescimento de plântulas de girassol (continuação).



I e J. Meio CN contendo Cu^{2+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente.

K e L. Meio CN contendo Hg^{2+} , com e sem bactéria inoculada, respectivamente.