



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEONILA MARIA LEANDRO ACIOLY

***Pantoea* ISOLADA DE EFLUENTE INDUSTRIAL:
IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO,
SUSCEPTIBILIDADE E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO
DE METAIS PESADOS**

Recife - PE
2014

LEONILA MARIA LEANDRO ACIOLY

***Pantoea* ISOLADA DE EFLUENTE INDUSTRIAL:
IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO,
SUSCEPTIBILIDADE E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO
DE METAIS PESADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisitos para obtenção do título a Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-Orientadora: Profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento

Recife - PE
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Acioly, Leonila Maria Leandro

***Pantoea* isolada de efluente industrial: identificação, caracterização, susceptibilidade e aplicação na remoção de metais pesados / Recife: O Autor, 2014.**

157 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Coorientadora: Aline Elesbão do Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2014.

Inclui referências e anexos

- 1. Biorremediação 2. Antibióticos 3. Metais pesados I. Takaki, Galba Maria de Campos (orient.) II. Nascimento, Aline Elesbão do (coorient.) III. Título**

620.11223

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 488

LEONILA MARIA LEANDRO ACIOLY

***Pantoea* ISOLADA DE EFLUENTE INDUSTRIAL: IDENTIFICAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO, SUSCEPTIBILIDADE E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE
METAIS PESADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisitos para obtenção do título a Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki - Orientadora), Universidade Católica de Pernambuco -UNICAP

Profa. Dra. Celuta Sales Alviano, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Profa. Dra. Hévila Walewska Casullo de Araujo, Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital, Universidade Federal de Roraima - UFRR

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, Universidade Federal do Rural de Pernambuco – UFRPE

DEDICO

*Aos meus pais Socorro Acioly e Paulo Acioly,
aos meus queridos irmãos, Paulinho e Ênio Petrônio,
às minhas avós, tios e primos que me ensinaram o valor da educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, que se fez presente na minha vida, me iluminando e dando forças durante toda essa caminhada.

À minha orientadora Prof^a. Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki, muito obrigada. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela orientação sempre motivadora e pela amizade e confiança em mim.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr.^a Aline Elesbão do Nascimento, por estar sempre disposta a me ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao Dr^o Camilo Enrique La Rotta Hernández, pela colaboração e conhecimentos compartilhados na realização dessa tese.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., pelo acesso aos laboratórios do NPCIAMB/UNICAP, para a realização desta pesquisa.

Ao técnico Severino Humberto de Almeida, ao laboratorista André Felipe de Lima, pelo apoio, paciência e colaboração, em todos os momentos. À secretária Sônia Maria de Souza, por todos os conselhos e apoio no decorrer do desenvolvimento desta dissertação.

Às gestoras Socorro Araújo e Edjane do Colégio Normal Estadual de Afogados da Ingazeira, do qual faço parte do corpo docente, pelo incentivo e compreensão nesses quatro anos em que tive que me deslocar de um trabalho ao outro.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Fabíola Carolina, Patrícia Souza, Raquel Berguer e Carlos Vilar pela ajuda em momentos difíceis e colaboração nos trabalhos.

Aos amigos Aline Barbosa, Marcela Leita, Marta Cristina, Grayce Kelly, Jaceline, Marcos, Ladiel, Thaíse e a todos aqueles que participaram desta etapa da minha vida.

Aos meus tios, Neuza, Edleuza, João Carlos, Maria José, Reginaldo, José Augusto, Francisco Albert (*in memória*), e Amadeu pelo incentivo, ajuda e amor.

Aos meus primos, Alexsandro, Milena, Giselle, Geovanna, Augusto César, Cíntia Barbora, Marília, Anammélia e Priscila, pela amizade e companheirismos durante todos os anos de convivência.

Aos meus avós, Leonila Paz, Pedro Severo (*in memória*), Josefa Leandro e Fulgêncio (*in memória*), pela presença constante na minha vida e pelas preces.

A todos os meus amigos Christina Kelly, Raísa Rabelo, Laura Albuquerque, Dionília, Andréa Rabelo, Robson Vêras, Marcos Aurélio e João Lira que sempre torceram por mim e estiveram sempre presentes em minha vida.

Às instituições de fomento à pesquisa: FACEPE, CAPES, CNPq e FINEP, pelo suporte financeiro para realização desta etapa acadêmica.

RESUMO

As espécies de *Pantoea* são geralmente reconhecidas como bactérias fitopatogênicas associadas a plantas e amplamente distribuídas no ambiente, contudo, também promovem o crescimento de diferentes culturas, sendo capazes de controlar pragas específicas de plantas. Ressalta-se que o gênero *Pantoea* foi formado para acomodar dois grupos de hibridação do complexo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans* que não se correlacionavam nem com *Erwinia* nem com *Enterobacter*. Neste trabalho, foi isolado de efluente de lavanderia industrial, uma cepa de *Pantoea sp*, caracterizada, a partir, da sua morfologia, bioquímica e fisiologia, além do seu perfil enzimático. Em seguida, testes foram realizados com a susceptibilidade para antibióticos e metais sulfato de cobre, sulfato de zinco e o cloreto de cádmio em meio Müller Hinton nas concentrações entre 200 e 2200 µg/mL. Para os testes de susceptibilidade à antibióticos, foram testados 15 antibióticos de 09 classes (Ertapenem (ETP, 10 µg), Oxacilina (OXA, 1 µg), Cefotaxime (CFX, 5 µg), Cefepime (CPM, 30 µg), Cefpodoxime (CPD, 10 µg), Vacomicina (VA, 30 µg), Cloranfenicol (CLO, 30 µg), Tobramicina (TOB, 10 µg), Gentamicina (GEN, 10 µg), Amicacina (AMI, 30 µg), Eritromicina (ERI, 15 µg), Ácido Nalidixico (NAL, 30 µg), Ciproflaxina (CIP, 5 µg), Tigeciclina (TGC, 15 µg) e Clindamicina (CLI, 2 µg)). Por outro lado, considerando que a presença de metais pesados no ambiente pode ter origem natural ou antropogênica, podendo causar, distúrbios muitas vezes de difícil recuperação para o ambiente. Neste sentido, estudos foram realizados também com a remoção do metal cádmio pela bactéria isolada, utilizando quantificação do metal através de voltametria de redissolução anódica com voltametria de onda quadrada. Os resultados de susceptibilidade a antibióticos indicaram a resistência do micro-organismo à classe das cefalosporinas (cefotaxima, cefepime, cefpodoxime), como também para a classe dos aminoglicosídeos (amicacina) e licosamida (clindamicina). Nos testes de tolerância a metais pesados testados, a bactéria mostrou resistência na seguinte ordem, Cu>Zn>Cd. A linhagem de *Pantoea sp*., biomassa viva e inativa, apresentou ótima capacidade de remoção de Cd²⁺, removendo uma concentração de 10 ppm de Cd²⁺ em 24h, nas temperaturas de 25 e 35°C. Em concentrações mais elevadas de 100 ppm a biomassa inativa apresentou maior potencial de remoção (38,47%) com temperatura de 35°C com um pH 3.0 após 24 horas. *Pantoea sp*. Apresentou grande potencial biotecnológico na descontaminação ambiental de águas contaminadas pelo metal cádmio.

Palavras chave: *Pantoea sp*., metais pesados, susceptibilidade, antibióticos, bioabsorção de cádmio.

ABSTRACT

Pantoea species are generally recognized as phytopathogenic bacteria attached to plants and widely distributed in the environment, but also promote the growth of cultures, able to control specific plant pests. It should be noted that gender *Pantoea* was formed to accommodate two groups of hybridization complex herbicola-Enterobacter agglomerans Erwinia not correlated either with Erwinia or with Enterobacter. In this work, was isolated from industrial laundry effluent, a strain of *Pantoea* sp, characterized, from, their morphology, biochemistry and physiology, besides its enzymatic profile. Then, tests were performed with the antibiotic susceptibility metals and copper sulfate, zinc sulfate and cadmium chloride in Müller Hinton medium at concentrations between 200 and 2200µg / ml. For susceptibility testing antibiotics were tested 15 antibiotics of 09 classes (Ertapenem (ETP, 10 µg), oxacillin (OXA, 1 µg), cefotaxime (CFX, 5µg), Cefepime (CPM, 30µg), Cefpodoxime (CPD, 10 µg) , Vacomicina (VA, 30µg), Chloramphenicol (CLO, 30µg), tobramycin (TOB, 10 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), amikacin (AMI, 30µg), erythromycin (ERI, 15µg) Nalidixic Acid (NAL, 30µg) , ciprofloxacin (CIP, 5µg), Tigecycline (TGC, 15µg) and clindamycin (CLI, 2 µg)). On the other hand, considering that the presence of heavy metals in the environment may have natural or anthropogenic origin, may cause, disorders often difficult to recover the environment. In this regard, studies were also performed with metal cadmium removal by bacteria isolated using metal quantification by anodic stripping voltammetry with a square wave voltammetry. Antibiotic susceptibility results indicated the resistance of the microorganism to the class of cephalosporins (cefotaxime, cefepime, cefpodoxime), as well as for the aminoglycosides (amikacin) and licosamida (clindamycin). In tests of tolerance to heavy metals tested, proved resistant bacterium in this order, Cu>Zn>Cd. The lineage of *Pantoea* sp., alive and inactive biomass, showed great Cd²⁺ removal capacity by removing a concentration of 10 ppm of Cd²⁺ in 24 hours, at temperatures of 25 and 35°C. At higher concentrations of 100 ppm inactive biomass showed higher uptake potential (38.47%) at 35 °C at pH 3.0 after 24 hours. *Pantoea* sp. Showed great biotechnological potential environmental decontamination water contaminated by metal cadmium.

Keywords: *Pantoea* sp, heavy metals, susceptibility, antibiotics, Cadmium biosorption.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Revisão da Literatura

Figura 1. Composição química das Paredes Celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas..... 43

Capítulo II: Isolamento, Identificação, Caracterização e Perfil Enzimático de *Pantoea* sp. Isolada de Efluente Industrial e Respostas ao Estresse Abiótico

Figura 1. Efeito do pH no crescimento de *Pantoea* sp.após 48h, OD: densidade óptica de 600nm..... 75

Figura 2. Efeito da temperatura °C no crescimento da *Pantoea* sp. após 48h, OD: densidade óptica de 600nm. 76

Figura 3. Efeito da salinidade (mM) no crescimento da *Pantoea* sp. após 48h, OD: densidade óptica de 600nm. 77

Capítulo IV: Biorremediação de Cádmio por Biomassa de *Pantoea* sp.

Figura 1. Histograma apresentando a bioabsorção do cádmio pela biomassa viva (10ppm) de *Pantoea* sp. nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C). 101

Figura 2. Histograma apresentando a bioabsorção do cádmio pela biomassa viva (100ppm) de *Pantoea* sp. nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C). 102

Figura 3. Histograma apresentando a bioabsorção do cádmio (10ppm) pela biomassa inativada (100mg) de *Pantoea* sp. nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C) de contato. 104

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Revisão da Literatura

Tabela 1. Comparação entre bioabsorção e bioacumulação.	31
---	----

Capítulo II: Isolamento, Identificação, Caracterização e Perfil Enzimático de *Pantoea* sp. Isolada de Efluente Industrial e Respostas ao Estresse Abiótico

Tabela 1. Características da bactéria isolada de efluente industrial de lavanderia em Pernambuco.	74
---	----

Tabela 2. Enzimas produzidas pela linhagem bacteriana isolada de efluente industrial de Pernambuco.	78
---	----

Capítulo III: Associação da Tolerância a Metal Pesado com a Multi-resistência a Antibióticos em *Pantoea* sp. Isolada de Efluente Industrial de Lavanderia

Tabela 1. Suscetibilidade de <i>Pantoea</i> sp. a antibióticos.	90
---	----

Tabela 2. Resistência de <i>Pantoea</i> sp a metais	91
---	----

Capítulo IV: Biorremediação de Cádmio por Biomassa de *Pantoea* sp.

Tabela 1. Valores de variação (ppm/h) na remoção de Cd ²⁺ apresentado pelas biomassas inativas e vivas nas concentrações de 10 e 100ppm e temperaturas de 25 e 35°C nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tempo de contato e pH, 3,0, 5,0 e 7,0.	106
--	-----

SUMÁRIO

CAPITULO I	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 POLUIÇÃO DE ÁGUAS	17
2.2 METAIS PESADOS	17
2.3. METAIS E MICRO-ORGANISMOS: RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA	20
2.3.1 Mecanismos de Resistência Microbiana	22
2.3.1.1 Transporte Ativo de Metais Através da Célula/Organismo	22
2.3.1.2 Exclusão do Metal por Barreira de Permeabilidade	23
2.3.1.3. Sequestro Intracelular do Metal por Proteínas de Ligação	24
2.3.1.4 Sequestro Extracelular.....	25
2.3.1.5 Detoxificação Enzimática para uma forma menos tóxica.....	25
2.3.1.6 Redução da sensibilidade de alvos celulares a metais.....	26
2.3.2 Determinante Genético de Resistência a Metais.....	27
2.4 BIORREMEDIAÇÃO: BIOSSORÇÃO E BIOACUMULAÇÃO	29
2.4.1 Definição de Adsorção e Absorção	32
2.4.2 Fundamentos da Biossorção	33
2.4.2.1 Biossorbatos.....	34
2.4.2.2 Biossorvente.....	34
2.4.3 Mecanismos de Biossorção de Metais por Micro-organismos.....	35
2.4.3.1 Transporte através da membrana celular	36
2.4.3.2 Adsorção	37
2.4.3.3 Troca Iônica.....	37
2.4.3.4 Complexação e Precipitação	38
2.4.4 Fatores que afetam a Biossorção	38
2.4.4.1 Efeitos do pH.....	39
2.4.4.2 Influência da Temperatura	40
2.4.4.3 Concentração do Metal.....	40
2.4.4.5 Biomassa	40
2.4.6 Técnicas de Detecção de Metais.....	41

2.5 BIOSSORVENTES BACTERIANOS	42
2.6 GÊNERO <i>PANTOEA</i>	45
2.6.1 Potencial Biotecnológico de <i>Pantoea</i>	48
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO II	66
Isolamento, Identificação, Caracterização e Perfil Enzimático de <i>Pantoea</i> sp Isolada de Efluente Industrial de Lavandera e Respostas ao Estresse Abiótico	67
1. Introdução	68
2. Materiais e Métodos	70
3. Resultados e Discussão	72
4. Conclusões	79
5. Referências Bibliográficas	80
CAPÍTULO III	84
Associação da Tolerância a Metal Pesado com a Multi-resistência a Antibióticos em <i>Pantoea</i> sp. Isolada de Efluente Industrial de Lavandaria	85
1. Introdução	85
2. Materiais e Métodos	87
3. Resultados e Discussão	88
4. Conclusões	92
5. Referências	92
CAPÍTULO IV	95
Biorremção de Cádmio por Biomassa de <i>Pantoea</i> sp.	96
1. Introdução	97
2. Materiais e Métodos	98
3. Resultados e Discussão	100
4. Conclusões	109
5. Referências	109
ANEXOS	113
Trabalhos em Congressos	115
ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO	116
Isolation, Identification, Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of <i>Pantoea agglomerans</i>	117

Abstract.....	117
Introduction.....	118
Materials and methods	119
Conclusion	126
References.....	126

An investigation on the heavy metal tolerance and antibiotic profile of the <i>Pantoea agglomerans</i> UCP1320	138
--	-----

1. Introduction	139
2. Materials and Methods.....	140
3. Results and Discussion.....	141
4. Conclusions.....	144
5. References.....	145

Cadmium Removal from Aqueous Solution by Batch Studies Using A New Strain of <i>Pantoea agglomerans</i> UCP1320	148
---	-----

Abstract.....	148
1. Introduction.....	149
2. Materials and Methods.....	150
3. Results	151
4. Discussion	155
5. Conclusions.....	156
References.....	157

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

O acelerado desenvolvimento tecnológico e industrial conduziu a comunidade científica à procura de novas técnicas de prevenção e controle de poluição. No Brasil, o déficit de tratamentos de esgoto e, conseqüentemente, o impacto sobre o meio ambiente, a saúde e a qualidade de vida da população não deixa dúvidas quanto à necessidade de se pesquisar e aplicar técnicas de baixo custo de implantação de tratamento de resíduos líquidos e sólidos (MOREIRA, 2007, PLANO NACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS, 2011).

Um dos problemas mais sérios que afetam o meio ambiente é a poluição química, de natureza orgânica ou inorgânica, decorrente dos despejos residenciais e industriais que acarreta a deterioração dos ecossistemas, com o acúmulo de poluentes. Neste sentido, uma crescente atenção está sendo dada aos perigos contra a saúde e danos ocasionados por tais contaminantes no ambiente. Dentre os principais contaminantes inorgânicos estão os metais pesados, os quais são responsáveis pela poluição dos ecossistemas em resposta aos despejos de resíduos industriais e domésticos sem tratamento prévio, além de pesticidas, fertilizantes, emissões das incineradoras de resíduos urbanos, escapamentos de automóveis, e indústrias de fundição (GARBUSU; ALKORTA, 2003; HALIM *et al.* 2003; ZENG; CHENG, 2013). Muitos metais são essenciais para as células e podem ser encontrados naturalmente na crosta terrestre. No entanto, independentemente da origem dos metais no solo, níveis excessivos podem resultar na degradação da qualidade do solo, redução da produtividade das culturas, e má qualidade dos produtos agrícolas (LANG *et al.*, 2002) e põem riscos significativos à saúde humana, animal e ao ecossistema (YANG *et al.*, 2005; ZENG; CHENG, 2013; MAHMOOD; MALIK, 2014).

A principal característica destes elementos é a tendência em acumular-se no ecossistema através de fácil assimilação na cadeia alimentar dos seres vivos. Geralmente, são dispostos no solo e nas águas na forma solubilizada, associados a elementos orgânicos na forma de complexos organometálicos, e na forma de colóides e suspensões, como precipitados. Quando a concentração destes metais pesados, lançadas no meio ambiente por inúmeros processos industriais é maior que os níveis

determinados pelos órgãos competentes, iniciam-se um processo de degradação dos recursos naturais, tendo por consequência sérios prejuízos aos seres vivos em geral e à saúde humana (HAYASHI, 2001; SILVA, 2006; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2008; GADD, 2009; GADD; FOMINA, 2011; KUMAR *et al.*, 2013; MAHMOOD; MALIK, 2014).

Metais tóxicos podem inibir o crescimento de micro-organismos, além de causar mudanças morfológicas e fisiológicas e afetar a reprodução. Esses também reduzem o número, a diversidade e selecionam populações microbianas resistentes ou tolerantes (EZZOUHRI *et al.*, 2009).

Alguns metais são essenciais para o metabolismo dos organismos, no entanto, são tóxicos quando presentes em excesso. Os metais essenciais ao metabolismo dos micro-organismos incluem cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco e níquel, e são identificados como tóxicos em concentrações poucas vezes superiores às requeridas para o metabolismo. Os níveis de toxicidade de cada metal variam de acordo com a espécie de micro-organismo, o metal e o pH (HUHES *et al.*, 1991; GADD, 1993; BALDRIAN, 2003; VALIX; LOON, 2003; GADD; FOMINA, 2011; KUMAR *et al.*, 2013).

O estudo das interações entre micro-organismos e metais pode auxiliar no conhecimento das relações tóxicas de metais com organismos superiores como plantas e animais. Alguns sistemas microbianos de tolerância ao metal poderiam ser utilizados em processos biotecnológicos, tais como biorremediação de ambientes poluídos com metais (CERVANTES *et al.* 2006).

A busca de novas tecnologias tem se focado no uso de materiais biológicos para a remoção e recuperação de metais pesados (biossorção), ganhando muita credibilidade nos últimos anos por apresentar um bom desempenho. A biossorção é uma tecnologia nova que utiliza materiais biológicos para a remoção de metais de soluções através da sorção. A biossorção pode ser definida como a capacidade de alguns materiais biológicos em acumular metais pesados dos efluentes mediante métodos físico-químicos de captura. Surge como um processo alternativo ou suplementar em decorrência de características como o preço reduzido do material biossorvente, aplicação em sistemas com capacidade de detoxificar grande volume

de efluente com baixo custo operacional, possível seletividade e recuperação da espécie metálica (HUAMÁN PINO, 2005; GADD, 2009; GADD, 2010).

Os micro-organismos são usados nos processos de biotransformação ou de bioissorção para transformar ou adsorver metais. Nestes processos, as células microbianas vivas ou mortas e os produtos do seu metabolismo podem ser bioacumuladores eficientes (KOVACEVIC *et al.*, 2000; SHOBA; THENMOZHI, 2013).

Em efluentes industriais, a presença de metais pesados leva a intoxicação crônica em animais aquáticos (ELLIS, 1989). No entanto, pequenas quantidades de alguns metais são essenciais para a vida, contudo, é muito tóxico em concentrações elevadas (BADAR *et al.*, 2000). Assim, elevadas concentrações de metais pesados pode danificar as membranas das células, alterar a especificidade de enzimas, alterar as funções celulares e danificar a estrutura do DNA. Os metais pesados em águas residuais e ou efluentes não são biodegradáveis e tendem a se acumular no organismo, podendo causar inúmeras doenças e distúrbios, tornando-se fundamental a utilização de métodos convencionais, para a remoção de metais pesados, como estratégia para evitar a geração de grandes volumes de lodo de tóxicos. Nos últimos anos, a biotecnologia tem apresentado metodologias eficientes e menos onerosas na remoção metais pesados (OZER; PIRINCCI, 2006).

Neste sentido, os métodos convencionais utilizados para a remoção de metais pesados de águas residuais incluem precipitação química, tratamento eletroquímico, evaporação, tratamento com membrana, evaporação e extração por solvente. No entanto, a aplicação destes processos de tratamento verificou-se, por vezes, ser restrito, por causa de investimento oneroso devido aos custos operacionais e a geração de poluição secundária, gerando novos produtos e ou a transferência de um meio para outro, sem propiciar a solução definitiva do problema (LAMROOD PRASAD *et al.*, 2013).

Os estudos de bioissorção tem focado no potencial de diferentes tipos de biomassas (BRIERLEY, 1990). A literatura relata que bactérias, fungos, leveduras e algas podem remover metais pesados em grandes quantidades a partir de soluções aquosas. A biomassa pode ser mais econômica e facilmente obtida como subproduto

dos processos de fermentação industrial, que também podem resultar em agregação de valor para a biomassa devido a utilização de resíduos, com redução efetiva dos custos de produção e eliminação eficiente dos metais pesados contaminantes (LAMROOD PRASAD *et al.*, 2013).

Bactérias do gênero *Pantoea* podem ocorrer em ampla variedade de ambientes, incluindo solo, água, poeira, produtos lácteos, carne, peixe, insetos, animais e seres humanos como também podem ser endofíticas. Portanto, a ampliação do conhecimento sobre o potencial biotecnológico da bactéria em estudo, possibilitará o seu uso em pesquisas potencializando a biorremediação de metais pesados.

Neste sentido, os estudos realizados tiveram como Objetivo Geral: Realizar o isolamento de *Pantoea* a partir de efluente de lavanderia industrial, identificar e caracterizar, bem como avaliar o efeito de estresse abiótico, resistência a antibióticos e tolerância a metais pesados, além de investigar a capacidade biossortiva da biomassa viva e morta na remoção do metal pesado Cádmio.

A partir dos resultados obtidos foram gerados os seguintes artigos:

Artigo 1:

Isolamento, Identificação, Caracterização e Perfil Enzimático de *Pantoea sp*. Isolada de Efluente Industrial e Respostas ao Estresse Abiótico

Artigo 2:

Associação da Tolerância à Metal Pesado com a Multi-resistência à Antibióticos em *Pantoea sp* Isolada de Efluente Industrial de Lavanderia

Artigo 3

Biorremediação de Cádmio por Biomassa de *Pantoea sp*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 POLUIÇÃO DE ÁGUAS

Composta por mais de 70% da superfície da Terra, a água é, inegavelmente, o recurso natural mais valioso existente em nosso planeta. Sem esse composto inestimável, a vida na Terra não existiria. Embora esse fato seja amplamente reconhecido, a poluição dos recursos hídricos é uma ocorrência comum. E em particular, a água potável tornou-se muito afetada, e em muitos casos perdeu sua finalidade original (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

Há muitas fontes de poluição de águas, dentre estas, existem duas categorias de grande importância: as fontes de contaminação direta e indireta. As fontes diretas incluem descargas de efluentes de indústrias, refinarias e plantas de tratamento. As fontes indiretas incluem os contaminantes que entram no abastecimento de água dos solos e vindos da atmosfera através da água da chuva. Em geral, os contaminantes são oriundos de duas grandes classes: orgânicos e inorgânicos. Os poluentes orgânicos, em geral, incluem os solventes industriais, compostos orgânicos voláteis, inseticidas, pesticidas, resíduos de processamento de alimentos, entre outros. Os poluentes inorgânicos incluem metais, fertilizantes e acidez causada por descargas industriais (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

2.2 METAIS PESADOS

A maior parte dos 110 elementos químicos da tabela periódica é constituída por metal pesado. Os critérios, utilizados para a definição, de metal pesado, têm levado diversos autores a apresentar classificações distintas. Segundo Hillert (1997), no mínimo 70 elementos são considerados metais, enquanto outros 05 (cinco) são metaloides com propriedades metálicas e não metálicas. Torem *et al.* (2002) consideram que 59 elementos são metais pesados. No entanto, Marques *et al.* (2002) define metais pesados como os elementos com densidade atômica maior que 5 ou 6 g cm³, ou ainda, que possuem número atômico maior que vinte.

Hillert (1997) apresenta interessantes considerações sobre o que são metal e metal pesado. Segundo o autor, o termo metal também se refere aos elementos metálicos, contudo, quando esses são combinados com outros elementos, formam

compostos não metálicos, tais como sais e óxidos, por exemplo, sulfato de cobre e cloreto de sódio (sal de cozinha). Ele afirma também, que quando um elemento é absorvido pelo corpo humano ou pelo ambiente não o é em forma metálica pura, mas em formas combinadas. Acrescenta que, a depender da temperatura ou sob certas condições podem apresentar características metálicas ou não metálicas, como o arsênio. Também podem ser divididos em metal leve: berílio, magnésio, alumínio, titânio e suas ligas metálicas, e metal pesado. Já o termo metais pesados é utilizado por formuladores de políticas para referir-se a metais com potencial tóxico, em função das atividades antrópicas terem aumentado significativamente suas concentrações nos e águas solos das zonas urbanas e agrícolas.

Por fim, a expressão “metal pesado” com definição controvertida e muito criticada, vem sendo usada na literatura científica para caracterizar um conjunto heterogêneo de elementos, incluindo metais, semi-metais e não metais e é a mais empregada para designar elementos classificados como poluentes do ar, da água, do solo e dos alimentos, prejudicando a saúde dos seres vivos (BIRD, 2002). Neste trabalho, consideramos o mais correto a definição dada por Hillert (1997).

Embora, o termo metal pesado tenha conotação de toxicidade, alguns destes elementos atendem aos critérios de essencialidade às plantas, aos animais e ao homem e são ditos *bioenergéticos*, isto é, sua presença é essencial para permitir o funcionamento normal de algumas rotas metabólicas (AGUIAR *et al.*, 2002; SOARES 2004). Sódio (Na), magnésio (Mg), potássio (K), cálcio (Ca), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), molibdênio (Mo), são elementos essenciais à fisiologia humana (SCHROEDER, 1966); outros como o mercúrio (Hg), o chumbo (Pb), o cádmio (Cd) e o arsênio (As), não existem naturalmente em nenhum organismo, sendo sua presença prejudicial em qualquer concentração (CESÁRIO SILVA *et al.*, 2001; SOARES 2004). Os metais são ubíquos na maioria dos materiais e persistentes como poluentes ambientais derivados das atividades antropogênicas, como minerações, fundições, irrigação e outras fontes de resíduos industriais (HEC DA SILVA, 2011).

A presença de metais pesados no ambiente representa um risco à longo prazo, pois não são biodegradáveis e apresenta uma tendência à bioacumulação, permanecendo ao longo do tempo nos diversos níveis tróficos (KOBAYASHI *et al.*, 2008;

HEC DA SILVA, 2011). O problema é de particular importância para a saúde humana como o consumidor final. Nos humanos, o acúmulo de metais, causam problemas nos sistemas gastrointestinal, neurológico e imunológico. Os metais considerados mais perigosos são chamados de "trio tóxico": cádmio, chumbo e mercúrio, para os quais nenhuma função biológica foi encontrada, ainda. Mas há uma longa lista de outros metais que, embora essenciais em baixas concentrações, tornam-se tóxicos em altas doses (CHOJANACKA, 2010).

A introdução no meio ambiente de metais pode induzir diversas alterações relacionadas às comunidades microbianas, bem como em suas atividades biológicas, pois podem exercer ação inibitória através do bloqueio de grupos funcionais essenciais, deslocamento de íons metálicos, ou modificações da conformação ativa de enzimas biológicas (RYAN *et al.*, 2005). Alguns metais são micronutrientes, como o cromo (Cr), níquel (Ni), ferro (Fe), manganês (Mn), cobalto (Co) e zinco (Zn), sendo essenciais às reações bioquímicas dos micro-organismos, ditos como elementos traços (BRUINS *et al.* 2000). Estão envolvidos em processo redox, como estabilizadores de moléculas, cofatores de reações enzimáticas e na regulação do balanço osmótico celular (HUSSEIN *et al.*, 2005; HEC DA SILVA 2011).

Em contrapartida, muitos dos metais não têm função biológica, sendo prejudiciais aos micro-organismos mesmo em baixas concentrações, como cádmio (Cd), mercúrio (Hg), arsênio (As) e chumbo (Pb), embora a toxicidade dos metais em geral seja desencadeada em altas concentrações, seja o metal um elemento essencial ou não (LEEDJÄRV *et al.*, 2009; RATHNAYAKE *et al.*, 2009; HEC DA SILVA, 2011). Os metais pesados interferem na atividade metabólica e no crescimento das populações microbianas causando impactos sobre sua diversidade (ROANE; PEPPER, 1999; HEC DA SILVA, 2011), bem como danos à estrutura da membrana celular e do DNA, alterações de especificidade de enzimas e rompimento de funções celulares. A toxicidade também ocorre por deslocamento de metais essenciais de seu sítio ligante em proteínas, alterações na estrutura de conformação do DNA, ou interferindo em fosforilações oxidativas e no balanço osmótico (BRUINS *et al.*, 2000). A sobrevivência dos microrganismos em solos poluídos com metais pesados está intimamente relacionada às adaptações estruturais, fisiológicas e genéticas, bem

como na especiação dos metais para formas menos tóxicas (WUERTZ; MERGEAY, 1997; HEC DA SILVA, 2011).

Os metais pesados encontram-se distribuídos por toda a natureza. Nos solos, os metais são originários da rocha de origem e de outras fontes adicionadas ao solo, como: precipitação atmosférica, cinzas, calcário, fertilizantes químicos e adubos orgânicos (esterços de animais, lixo domiciliar e biossólidos).

A água é o grande transportador de metais pesados na litosfera, no qual os sólidos presentes no solo, águas superficiais e subterrâneas podem conduzir significantes quantidades de metais tóxicos, proporcionando a interação com vários ciclos hídricos e processos geoquímicos (BOURG; LOCH 1995).

2.3. METAIS E MICRO-ORGANISMOS: RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA

Metais pesados têm sido abundantes no planeta Terra e a exposição dos micro-organismos à eles, existe desde o início da vida, cerca de 4 bilhões de anos atrás. Portanto, os determinantes de resistência à metais tóxicos, em micro-organismos, evoluíram há milhares de anos e não só em detrimento as atividades antropogênicas. Esta conclusão, se dá pela existência de tais sistemas em bactérias isoladas tanto, de ambientes “primitivos” quanto, de ambientes poluídos (SILVER;PHUNG, 2005).

Em concentrações elevadas, íons de metais pesados reagem para formar compostos tóxicos nas células (NIES, 2003). Para ter um efeito tóxico, no entanto, íons de metais pesados devem primeiro entrar na célula. Isso porque, alguns metais pesados são necessários para as funções enzimáticas, como estabilizadores de estruturas protéicas e paredes celulares bacterianas, crescimento bacteriano, e no balanço osmótico (JI; SILVER, 1995). Metais tais como, cobalto, zinco, cobre e níquel, em baixas concentrações são essenciais aos micro-organismos, desde que eles forneçam co-fatores vitais para metaloproteínas e enzimas (HASSEN *et al.*,1998). Outros não apresentam nenhuma função biológica conhecida (prata, alumínio, cádmio, ouro, chumbo e mercúrio) e portanto, não são essenciais (FILIALI *et al.* 2000).

Existem dois tipos básicos de mecanismos de absorção de íons metálicos na célula. Um é rápido e inespecífico, impulsionado por um gradiente quimiosmótico através da membrana celular e, assim, não necessitando de ATP, e o outro é mais lento e mais específico do substrato, conduzido por energia a partir da hidrólise de ATP. O primeiro mecanismo é mais eficiente, e resulta em um influxo de uma ampla variedade de metais pesados e, quando estes metais estão presentes em altas concentrações, eles são mais propensos a ter efeitos tóxicos, uma vez dentro a célula (NIES; SILVER, 1995).

Sendo os metais tóxicos em altas concentrações, eles acabam exercendo uma ação inibitória nos micro-organismos pelo bloqueio dos grupos funcionais essenciais, substituindo íons metálicos essenciais, ou através de interações entre ligantes (cátions). Metais não essenciais ligam-se com maior afinidade aos grupos contendo tiol e locais de oxigênio do que os metais essenciais. A toxicidade resulta em alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas e interfere na fosforilação oxidativa e equilíbrio osmótico (SEVGI, *et al.* 2010).

Em um esforço para proteger componentes celulares suscetíveis, uma célula pode criar resistência aos metais. Resistência é definida como a capacidade temporária ou permanente de um organismo e sua descendência em permanecer viável e / ou multiplicar-se em condições que destroem ou inibem outros membros da linhagem microbiana (CLOETE, 2003).

Ambientes contendo metal representam pressões seletivas, que eventualmente, levam à expressão de mecanismos de resistência a praticamente a todos os metais pesados (SUNDAR *et al.*, 2011). Limitando o acesso ao metal ou alterando componentes celulares, a célula diminui a sua sensibilidade para os metais. Vários factores determinam o grau de resistência de um micro-organismo: o tipo e o número de mecanismos para a absorção do metal, o papel que cada um desses metais desempenha no metabolismo normal, e a presença de genes localizados em plasmídeos, cromossomos ou transposons que controlam a resistência a metais. Seis mecanismos são postulados e estão envolvidos na resistência a metais (ROUCH *et al.*, 1995; SILVER, 1996). Os micro-organismos podem possuir uma ou mais combinações de vários mecanismos de resistência. Podem existir outros mecanismos, mas exemplos na natureza não foram encontrados.

2.3.1 Mecanismos de Resistência Microbiana

São admitidos seis mecanismos envolvidos na resistência a metais pesados (SILVER; PHUNG, 1996; BRUINS *et al.* 2000; NIES, 2003): exclusão de metais por barreira de permeabilidade; transporte ativo de metais através da célula/organismo; sequestro intracelular de metais por proteínas de ligação; sequestro extracelular; detoxificação enzimática do metal para forma menos tóxica; redução da sensibilidade dos metais por alvos celulares.

2.3.1.1 Transporte Ativo de Metais Através da Célula/Organismo

O mecanismo mais comum é a extrusão de íons metálicos da célula por transporte ativo, utilizando bombas de efluxo, embora as reações de oxidação, redução, metilação e desmetilação também desempenhem eficiência durante a resposta ao estresse (LEEDJÄRV *et al.*, 2008).

As bombas de efluxo correspondem a uma classe de transportadores, proteínas integrantes da membrana plasmática, envolvidos na captação de nutrientes essenciais e íons, excreção de produtos do metabolismo bacteriano e de substâncias tóxicas, além de participarem em processos de comunicação entre células, com o meio ambiente e também estar relacionado à patogenicidade bacteriana (durante a colonização e sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro) (LI *et al.*, 2004; MARCHETTI, 2010). O sistema de efluxo, pode ser mediado por cromossomos ou plasmídios. Metais não essenciais normalmente entram na célula através de sistemas normais de transporte de nutrientes, mas são rapidamente exportados. Estes sistemas de efluxo podem ser ligado ou não á ATPase e são altamente específico para o cátion ou ânions que exportam (NIES; SILVER, 1995; BRUINS *et al.* 2000).

Várias bactérias demonstram resistência ao Cd (II), tais como *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (SMITH; NOVICK, 1972; LADDAGA; SILVER, 1985; COHEN *et al.*, 1991). A resistência a cádmio ocorre através de todos os mecanismos de resistência bioquímica, com exceção da desintoxicação enzimática. Ao contrário do mercúrio Hg (II) ou Arsênio Ar (V), o cádmio Cd (II) não sofre desintoxicação enzimática. Resistência enzimática através da reação de NAD(P)H-dependente não é favorecida energeticamente por metais como o Cd (II), Zn (II), Ni (II) e Co (II) (NIES, 1992). A modificação covalente da forma bivalente

destes metais também não é biologicamente favorável porque esta forma é mais estável e tóxica. Ao contrário do Hg (II), estes metais não se movem para fora da célula, em vez disso eles continuarão a sofrer oxidação de volta à sua forma original (NIES, 1992). Resistência ao Cd (II) e Zn (II) pode ser mediada por cromossomos, plasmídeos ou transposons. O sistema de resistência do metal mais proeminente para Cd (II) é por meio de bombas de efluxo (BRUINS *et al.*, 2000).

2.3.1.2 Exclusão do Metal por Barreira de Permeabilidade

Alterações na parede celular e na membrana plasmática dos micro-organismos, são exemplos de exclusão de metal por barreira de permeabilidade. Este mecanismo é uma tentativa do organismo para proteger componentes celulares essenciais sensíveis ao metal. Um exemplo importante é a exclusão de cobre (Cu (II)), resultante da produção alterada da proteína porina presente em canais de membranas de *E. coli* B (ROUCH *et al.*, 1995). Isso geralmente é uma mutação de um único gene, o que diminui a permeabilidade da membrana para íons metálicos (JI; SILVER, 1995). Outro exemplo é uma ligação não específica dos metais com a membrana exterior. Isso oferece proteção metálica limitada devido à saturação de sítios de ligação (HOYLE; BEVERIDGE, 1983). Apesar de não ser totalmente provado, acredita-se que algumas formas de resistência ao cobre são baseados em ligações no periplasmática celular (MERGEAY, 1991; SILVER; JI, 1994).

As bactérias que formam, naturalmente, uma camada extracelular de polissacarídeos apresentam grande capacidade de adsorção de íons metálicos, impedindo-os de interagir com os componentes vitais da célula (SCOTT; PALMER, 1990). Várias estirpes de bactérias apresentam esta capacidade: *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* e *Arthrobacter viscosus*. Cepas de *K. aerogenes* apresentaram duas vezes mais capacidade de sobrevivência em solução de Cd(II) do que estirpes sem produção de exopolissacarídeos (SCOTT; PALMER, 1990). O exopolissacarídeo por si só não é tão eficiente a Cd (II) como organismos com revestimento extracelular intacto (SCOTT; PALMER, 1990). Esta camada protetora aparece para evitar a absorção, mantendo os íons metálicos distantes dos componentes celulares vitais.

A ligação de Cu (II) no espaço periplasmático é encontrado em *Pseudomonas* sp. onde a resistência é codificado por um operon de quatro genes: *copA*, *copB*, *copC* e *copD*. Os genes *copA* e *copB* conferem resistência parcial com a adição de *copC* e *copD*, proporcionando resistência plena ao Cu (II) (SILVER; WALDERHAUG, 1992; SILVER; JI, 1994). As proteínas *copA* e *copC* estão localizados entre a membrana interna e externa e *copB* é encontrada na membrana externa. Em algumas espécies de *Staphylococcus aureus*, os plasmídeos penicilinase podem mediar resistência, alterando a permeabilidade da membrana celular para Cd (II), bem como a outros metais. Neste caso, parece haver mudanças conformacionais na membrana, que impedem a entrada de íons metálicos. Esta resistência é normalmente de baixo nível na gama de 0,01 a 0,1 nM de Cd (II) (MCENTEE *et al.*, 1986).

2.3.1.3. Sequestro Intracelular do Metal por Proteínas de Ligação

Sequestro intracelular é a acumulação de metais dentro do citoplasma para evitar a exposição dos componentes celulares essenciais. Metais sequestrados são comumente Cd (II), Cu (II) e Zn (II). Existem dois exemplos para esta forma de resistência a metais: a produção de metalotioneína por *Synechococcus* sp. e proteínas ricas em cisteína por *Pseudomonas* sp. (SILVER; PHUNG, 1996). O sistema de resistência do metal em *Synechococcus* sp. consiste de dois genes: *smtA* e *smtB*. O gene *smtA* codifica uma metalotioneína que se liga ao Cd (II) e Zn (II) (SILVER, 1992). Este gene é induzido pelos elevados níveis de Cd (II), Zn (II), e Cu (II) e é reprimido pelo produto do gene de *smtB*. A proteína *smtB* atua como um repressor da transcrição para desligar a expressão do *smtA* e produção de metalotioneína (SILVER *et al.*, 1989). Até agora, apenas linhagens de cianobactérias como *Synechococcus* sp. demonstram a produção de metalotioneína procariotas. Este tipo de metalotioneína contém menos resíduos de cisteína do que metalotioneínas animais (SILVER *et al.*, 1979). Resíduos de cisteína por *smtA* e a metalotioneína pode agir como um dissipador para o excesso de cátions tóxicos. Recentemente a estrutura de *smtB* foi determinada. A proteína *smtB* é um dímero semelhante à outras proteínas de ligação de DNA. A análise da estrutura indica que a proteína pode ter quatro moléculas de Zn (II), nos locais de ligação (COOK *et al.*, 1998).

Outro organismo que demonstra sequestro intracelular de Cd (II), é uma estirpe de *P. putida*, que foi isolado a partir de águas residuais (TREVORS, 1986).

Este organismo produz três proteínas ricas em cisteína de baixo peso molecular, que podem estar relacionados com metalotioneínas. *Mycobacterium scrofulaceum* também demonstra acumulação intracelular de Cu (II), sequestrando-o na forma de um precipitado de sulfato de cobre preto (MERGEAY, 1991).

2.3.1.4 Sequestro Extracelular

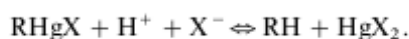
Resistência a metais com base no sequestro extracelular tem sido implicado apenas em bactérias, mas foi encontrado em várias espécies de leveduras e fungos (JOHO *et al.*, 1995). Uma das formas de Ni (II), a resistência em levedura pode basear-se neste mecanismo. *Saccharomyces cerevisiae*, pode reduzir a absorção de Ni (II) por excretar grandes quantidades de glutathione (MURATA *et al.*, 1985). A glutathione tem grande afinidade a metais pesados. A levedura que transporta o gene de resistência a metilglioxal demonstra a capacidade para formar complexos metálicos de glutathione extracelular em meios ricos em metais (MURATA *et al.*, 1985). A resistência resulta, quando o metal tóxico se liga a um complexo e não pode entrar na membrana celular. Existe um mecanismo semelhante em fungos resistentes a Cu (II) (MURPHY ;LEVY, 1983). Estes fungos secretam oxalato para formar um complexo de metal-oxalato. Outros micro-organismos, tais como leveduras ou *Citrobacter* sp. formam complexos insolúveis de fosfato de cádmio para conferir resistência (MCENTEE *et al.*, 1986). Levedura forma complexos durante a produção de sulfeto de hidrogênio e *Citrobacter* usa fosfato. Uma estirpe de *K. aerogenes* exibiu a capacidade de remover íons de Cd (II) a partir do ambiente circundante, excretando enxofre para limitar o influxo de metal por precipitação externa (AIKING *et al.*, 1982; SCOTT; PALMER, 1990).

2.3.1.5 Detoxificação Enzimática para uma forma menos tóxica

A resistência a Mercúrio é um exemplo de modelo de um sistema de desintoxicação enzimática em micro-organismos. Tanto bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *Bacillus* sp.) quanto, bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, e *Thiobacillus ferrooxidans*) demonstram resistência ao mercúrio Hg (II) (MISRA, 1992). O mercúrio é tóxico, porque se liga e inativa grupos tióis essenciais que fazem parte de enzimas e proteínas. Algumas bactérias contêm um conjunto de genes que formam o operon (*mer*) de resistência ao Hg (II). Este operon não só desintoxica a bactéria com Hg (II), mas também transporta e

auto-regula a resistência (MISRA, 1992; O'HALLORAN, 1993; JI; SILVER, 1995). Em tempos de ausência de Hg (II) os códigos de operon de uma proteína regula negativamente a transcrição. Este mesmo conjunto de genes também codifica a produção de uma proteína de ligação periplasmática e proteínas de transporte associados a membrana. A proteína periplasmica de ligação recolhe Hg (II) no meio ambiente e proteínas de transporte o lava para o citoplasma para a desintoxicação.

A resistência a Hg (II) por códigos do operon *mer* mediam a produção de duas enzimas. A primeira, denominada liase organomercurial, catalisa a seguinte reação (MISRA, 1992; BRUINS *et al.*, 2000):



A segunda, Redutase de íons de mercúrio catalisa a seguinte reação (MISRA, 1992; BRUINS *et al.*, 2000):



A Liase organomercurial é efetiva em hidrolisar ligações estáveis entre carbono e mercúrio.

Os organismos resistentes ao mercúrio podem ser divididos em duas categorias: estreito e largo espectro. Organismos de estreito espectro apresentam ausência do gene para a liase organomercurial e, por conseguinte, não são resistentes à maior parte dos organomercúricos. Organismos de amplo espectro têm ambas as enzimas e são resistentes à maior parte dos compostos contendo mercúrio. O operon *mer* tem sido extensivamente estudado nos plasmídeos de vários micro-organismos e é composto de cinco a seis genes. (MISRA, 1992; BRUINS *et al.*, 2000).

2.3.1.6 Redução da sensibilidade de alvos celulares a metais

Alguns micro-organismos adaptam-se à presença de metais tóxicos, alterando a sensibilidade dos componentes celulares essenciais, isto proporciona um grau de proteção natural (ROUCH *et al.*, 1995.) A proteção é conseguida por mutações que diminuem a sensibilidade, mas não alteram a função básica dos alvos celulares. Ou

por aumento da produção de um componente celular particular para manter a frente a inativação dos metais. Mecanismos de reparo do DNA fornecem proteção limitada ao plasmídeo e DNA genômico. O micro-organismo pode também proteger-se através da produção de componentes resistentes ao metal ou vias alternativas, num esforço para ultrapassar os componentes sensíveis.

A adaptação tem sido encontrada em *E. coli*. após a exposição ao Cd (II). *E. coli* inadaptadas demonstram danos consideráveis no DNA, no entanto, após a subcultura os mesmos organismos mostram resistência (MCENTEE *et al.*, 1986; MERGEAY, 1991). A fase de retardamento de crescimento do organismos diminui o tempo de exposição ao Cd (II). Postula-se que a fase de latência prolongada, inicialmente é devido a um período de indução de mecanismos de reparação do DNA. A resistência natural pode resultar das funções celulares normais, que dão ao organismo um nível básico de tolerância (ROUCH *et al.*, 1995). Um exemplo é a glutathione, o que pode proporcionar proteção para os íons metálicos como Ag (I), Cu (I, II), Cd (II), e Hg (II) (NIBHRIAIN *et al.*, 1983). A glutathione pode oferecer proteção a partir de Cu (II) e Fe (II), por supressão de formação de radicais livres (ROUCH *et al.*, 1995).

Parece haver diferenças na capacidade das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em tolerar certos íons metálicos (MOROZZI *et al.*, 1986). Bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Pseudomonas* sp.) apresentam maior tolerância do que as bactérias Gram-positivas, para continuar a síntese de proteínas na presença de Cd (II).

2.3.2 Determinante Genético de Resistência a Metais

A resistência bacteriana a alguns metais pesados pode ser controlada por genes de resistência e fatores extra-cromossomais (R) ou plasmídeos que podem também controlam a resistência aos antibióticos (NOVICK, 1969; BRUINS *et al.*, 2000). Os plasmídeos foram principalmente estudado no que diz respeito à transferência de resistência a antibióticos, mas é evidente que resistência a drogas e a metais estão intimamente ligados e muitas vezes ocorrem juntos em isolados clínicos. Por exemplo, em um estudo utilizando isolados clínicos de *P. aeruginosa*, verificou-se que a maioria exibiram resistência múltipla a metais e antibióticos,

embora um pequeno número exibiam resistência a metal (GADD; GRIFFITHS, 1978). A resistência plasmidial á metais é mais estudada com mercúrio e cádmio, principalmente porque somente com estes metais há diferenças significativas de resistência entre estirpes sensíveis e tolerantes. Com outros metais, como chumbo, níquel, cobalto e prata, as diferenças de resistência são pequenas entre cepas sensíveis e tolerantes e torna os estudos fisiológicos difíceis (NOVICK; ROTH, 1968; SILVER, *et al.* 1976; GADD; GRIFFITHS, 1978; GADD, 1992).

No entanto, existem diferenças entre resistência cromossômica e plasmidial. Sistemas de resistência á metais essenciais são geralmente mediados por cromossomos e são mais complexos do que os sistemas de plasmídeos. Sistemas mediados por plasmídeos, por outro lado, são geralmente mecanismos de efluxo íons-tóxico. Isto sugere que os mecanismos de efluxo de íons são mais propensos a serem transmitidos por plasmídeo, porque eles podem ser rapidamente mobilizados para outros organismos e reduzem o gene transportando carga, uma vez que só são necessários em determinadas ocasiões (SILVER; WALDERHAUG, 1992).

Portanto, a resistência do metal mediada por plasmídeo pode ser ecologicamente importante, já que a resistência pode ser rapidamente transferida de resistentes a bactérias sensíveis. Isto tem sido demonstrado para a *E. coli* de mercúrio-resistentes em que os genes para resistência ao mercúrio podem ser transferidos para as estirpes de *E. coli* sensíveis e também para *Aerobacter aerogenes* (GADD; GRIFFITHS, 1978). Assim, as populações em habitats naturais poderiam adaptar-se geneticamente a condições de toxicidade de metais mais rápido do que pelos processos de mutação espontânea e seleção natural (SILVER, *et al.* 1976; GADD; GRIFFITHS, 1978).

Uma boa compreensão dos mecanismos de resistência e tolerância aos metais pesados pelos micro-organismos pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens para a biorremediação (AHMAD; MALIK, 2012).

Há correlação entre tolerância a metais pesados e resistência a antimicrobianos, sendo vantajoso, em termos ecológicos que um micro-organismo possua ou adquira resistência a antimicrobianos e metais pesados, simultaneamente, em benefício de sua adaptação e sobrevivência em um ambiente contaminado

(LAWRENCE, 2000; SPAIN; ALM, 2003). As populações microbianas evoluem rapidamente em direção a uma resistência fenotípica por meio de mutação de genes alvo, que compartilham mais de um determinante de resistência (THELWELL *et al.*, 1998). A resistência a antimicrobianos e metais pesados ocorrem simultaneamente tendo em vista que os genes que expressam os fatores de resistência estão inseridos no mesmo elemento genético, sendo geralmente um plasmídeo, transposon ou integron (FROST *et al.*, 2005; VENNER *et al.*, 2012). Plasmídeos são os mais conhecidos por estarem relacionados aos mecanismos de resistência bacteriana (VENNER *et al.*, 2012).

A resistência a antimicrobianos é uma consequência inevitável de adaptação evolutiva dos micro-organismos, o uso abusivo de drogas antimicrobianas tem levado ao rápido aumento de resistência tanto em micro-organismos patogênicos como em sapróbios (SILBERGELD *et al.*, 2008). Fato esse, que corrobora a realidade do aumento progressivo de surtos infecciosos de grande complexidade de tratamento e longos períodos de terapia entre a população.

A capacidade de crescimento em elevadas concentrações de metais é encontrada em muitos organismos e pode ser o resultado de mecanismos intrínsecos ou induzidos, assim como fatores ambientais que podem reduzir a toxicidade do metal (GADD, 1992). Gadd, em 1992, define a *tolerância* como a capacidade de lidar com a toxicidade do metal por meio de propriedades intrínsecas do organismo. *Resistência*, por outro lado, seria a capacidade de sobreviver aos metais tóxicos por mecanismos de desintoxicação produzidos em resposta direta ao metal.

2.4 BIORREMEDIAÇÃO: BIOSSORÇÃO E BIOACUMULAÇÃO

Existem diversas alternativas para tentar minimizar problemas de contaminação ambiental, como por exemplo, o uso de técnicas de biorremediação, ou seja, processos que empregam organismos e suas enzimas na biodegradação de compostos xenobióticos (compostos constituídos por moléculas estranhas ao ambiente natural, ou em concentrações maiores que as encontradas em ambientes não contaminados), visando a sua erradicação, redução ou transformação em substâncias menos tóxicas (LEONEL *et al.* 2010).

Vários métodos vêm sendo utilizados para remoção de íons metálicos em soluções, e estão agrupados em dois grandes grupos: métodos abióticos e bióticos. Os métodos abióticos incluem precipitação, adsorção, troca iônica, membranas e tratamentos eletroquímicos, mas nem sempre são eficientes e apresentam-se com elevados custos, principalmente quando aplicados a soluções diluídas de metais (COLLA *et al.*, 2012). Tratamentos biológicos, com base em micro-organismos, algas e plantas vivos ou não vivos, oferecem redução dos níveis de metais tóxicos aos limites ambientalmente aceitáveis em uma forma rentável, e podem se realizadas *in situ* e são ambientalmente saudáveis (OYETIBO *et al.* 2013). Os micro-organismos não podem degradar ou destruir metais pesados, mas podem afetar a migração e transformação, destes, modificando suas características físicas e químicas (YAO *et al.* 2012).

A bioacumulação e a bioissorção são os métodos biológicos mais bem aceitos no tratamento de efluentes industriais. A bioacumulação pode ser definida como o fenômeno de células vivas onde há absorção de substâncias tóxicas. O agente tóxico acumula-se intracelularmente, através da membrana e do ciclo metabólico celular. Inversamente, a bioissorção pode ser definida como a absorção passiva de substâncias tóxicas pela biomassa morta/inativa ou por materiais derivados de fontes biológicas. O fenômeno da bioissorção, independe do metabolismo celular, ocorrendo essencialmente na parede celular. Os mecanismos de absorção do poluente serão diferentes para cada tipo de biomassa (MALIK, 2004; VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

A bioissorção oferece vantagens sobre o processo de bioacumulação (Tabela 1). Em geral o uso de organismos vivos pode não ser uma opção para o tratamento contínuo de contaminantes orgânicos e inorgânicos altamente tóxicos. Uma vez, que a concentração da substância tóxica torna-se elevada ou o longo tempo de funcionamento do processo, faz com que o agente tóxico acumulado atinja a saturação. Para além desse ponto, o metabolismo de um organismo pode ser interrompido, o que resulta na morte do organismo (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

Tabela 1. Comparação entre bioissorção e bioacumulação.

Características	Bioissorção	Bioacumulação
Custo	Normalmente baixo. Muitos bioissorventes são biomassas resultantes de resíduos industriais ou de agricultura. Custo envolve o transporte ou alterações de processos.	Geralmente elevado. O processo envolve as células vivas e, portanto, a manutenção das células.
pH	O pH da solução influencia fortemente a capacidade de absorção da biomassa. No entanto, o processo pode ser operado sob uma ampla gama de condições de pH.	As células vivas são fortemente afetadas sob condições extremas de pH.
Temperatura	Investigadores relataram melhora na absorção com o aumento da temperatura.	A temperatura afeta gravemente o processo.
Manutenção/armazenamento	Fácil de armazenar e usar	Energia metabólica externa é necessária para a manutenção da cultura.
Seletividade	Pobres. No entanto, a selectividade pode ser melhorada por modificação / processamento de biomassa	Melhor do que bioissorção
Versatilidade	Razoavelmente bom. Os locais de ligação podem acomodar uma variedade de íons.	Não é muito flexível. Propenso a ser afetado por condições de alta concentração do metal / sal.
Grau de Absorção	Muito alta. Algumas biomassas absorvem uma quantidade de substância tóxica quase tão alto quanto o seu peso seco.	As células vivas são sensíveis à altas concentrações de tóxicos e a remoção é geralmente baixa.
Taxa de Captação	Normalmente rápido. A maioria dos mecanismos de bioissorção é rápida.	Normalmente mais lento que a bioissorção. Uma vez que a acumulação intracelular é demorada.
Afinidade Tóxica	Alta em condições favoráveis.	Depende da toxicidade do poluente.
Regeneração e reutilização	Alta possibilidade da regeneração do bioissorvente com uma possível reutilização durante um número de ciclos.	Como os metais tóxicos são acumuladas intracelularmente, as chances são muito limitadas.

Recuperação da substância tóxica	Em muitos casos, as soluções ácidas ou alcalinas promovem um meio eficiente para recuperar substâncias tóxicas.	A biomassa não poderá ser utilizada para o próximo ciclo.
Imobilização	É possível utilizar a biomassa em estruturas sólidas.	Não é possível imobilizar a biomassa viva.
Reversibilidade	Possível	Parcialmente reversível
Velocidade	Rápida	Lenta
Número de Estágios	Estágio único (só bioadsorção)	Estágio duplo (bioadsorção+ bioacumulação).
Ligação do metal	Os metais se ligam na superfície celular.	Os metais se ligam na superfície celular e em seu interior.

Fonte: Adaptação de (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; CHOJNACKA, 2010)

O processo de bioadsorção envolve uma fase sólida (adsorvente ou bioadsorvente: material biológico) e uma fase líquida (solvente, normalmente água) contendo uma espécie dissolvida para ser adsorvida (adsorbato, íons metálicos). Devido à alta afinidade do adsorvente pelos adsorbatos, o último é atraído e ligado por diferentes mecanismos. O processo continua até que o equilíbrio seja estabelecido entre a quantidade de sólido ligado com os adsorbatos e sua porção remanescente na solução. O grau de afinidade do adsorvente pelo adsorbato determina sua distribuição entre o sólido e a fase líquida (AHALYA *et al.*, 2003).

2.4.1 Definição de Adsorção e Absorção

Apesar do prefixo "bio" que indica o envolvimento de uma entidade biológica, o fenômeno da bioadsorção é um processo físico-químico que pode ser simplesmente definido como a remoção de substâncias em solução por material biológico. A sorção pelo material biológico envolve, bioadsorção e bioabsorção (GADD, 2009; FOMINA; GADD 2014). A absorção é a incorporação de uma substância em um estado para outro diferente (por exemplo, líquido a ser absorvido por um sólido ou gases a serem absorvidos pela água), ou seja, dentro de uma matriz tridimensional. A adsorção é a adesão física ou ligação de íons e moléculas para a superfície de uma outra molécula, isto é, numa superfície de duas dimensões. A bioadsorção é uma subcategoria de adsorção, onde o adsorvente é uma matriz

biológica (MICHALAK *et al.*, 2013; FOMINA; GADD 2014). A adsorção é a forma mais comum de sorção envolvido em processos "tradicionais" de limpeza, mas a menos que seja claro que o processo (absorção ou adsorção) é operativo, a sorção é o termo preferido, e pode ser utilizado para descrever qualquer sistema onde um sorbato (por exemplo, um átomo, molécula, um íon molecular) interage com um adsorvente (ou seja, uma superfície sólida), resultando numa acumulação na interface sorbato - sorvente (BORDA; SPARKS, 2008). Se a adsorção ocorre e continua através da formação de uma nova espécie de superfície tridimensional, esta nova espécie pode ser definida como um precipitado de superfície. Um número de diferentes sistemas existem claramente no continuum de adsorção de precipitação (GADD, 2009; FOMINA; GADD 2014).

É importante perceber a dimensão dos processos de bioadsorção, tanto da biomassa ativa quanto inativa, em ligar-se a compostos orgânicos e inorgânicos (KOTRBA, 2011). A bioadsorção é uma parte importante de muitos processos que ocorrem na natureza, incluindo, por exemplo, sorção do solo, reações imune antígeno-anticorpo e adsorção às células hospedeiras como uma primeira etapa de replicação do vírus, que são todos os assuntos de diferentes disciplinas científicas. Muitas abordagens metodológicas utilizadas nas ciências da vida, biotecnologia e medicina são, de fato, com base em processos de bioadsorção, por exemplo, coloração de células microbianas para microscopia eletrônica e terapias-alvo no tratamento do câncer. Em certo sentido, todos os fenômenos da vida são de alguma forma relacionados às interações entre superfícies biológicas e um sorbato (FOMINA; GADD 2014).

2.4.2 Fundamentos da Bioadsorção

Como mencionado anteriormente, a bioadsorção é um processo físico-químico que independe do metabolismo celular, e resulta na remoção de substâncias em solução pelo material biológico (GADD, 2009). O processo de bio-adsorção envolve, portanto, uma fase sólida (biossorvente) e uma fase líquida (solvente: normalmente água) que contém as espécies dissolvidas ou suspensas para ser sorvido (sorbato) (FOMINA; GADD 2014).

2.4.2.1 Biossorbatos

Uma grande variedade de sorbatos podem ser removidos de soluções aquosas com o uso de biossorbentes. Metais, partículas e colóides estão sendo estudados, bem como organo-metais (metalóides) compostos inorgânicos e orgânicos, incluindo corantes, fluoreto, e os produtos farmacêuticos (MICHALAK *et al*, 2013). Uma variedade de mecanismos estão envolvidos na remoção destas substâncias em solução. Dentre tantos sorbatos, a maioria das pesquisas de biossorção foi realizada com metais e elementos relacionados, incluindo actinídeos, lantanídeos, metalóides e vários radioisótopos destas substâncias (GADD, 2009; DHANKHAR; HOODA, 2011). 75% dos elementos da tabela periódica são classificados como metais e quase todos eles têm recebido atenção em relação a biossorção. As únicas exceções, são elementos altamente móveis de baixa toxicidade, por exemplo, K^+ e Mg^{2+} . A toxicidade do metal, a importância como um poluente, se é radioativo, ou valioso são as principais razões que determinam os metais de interesse para a biossorção. Isso também define os objetivos importantes da pesquisa, por exemplo, limpeza ambiental, proteção à saúde, reciclagem e/ou recuperação, bem como diferenças de escala e abordagem e potenciais consequências econômicas. Alguns dos metais mais estudados são os poluentes ambientais, por exemplo, chumbo, cobre, mercúrio, cádmio, cromo e arsênio, bem como radionuclídeos de cobalto, estrôncio, urânio, tório, etc (GADD, 2010; GADD; FOMINA, 2011).

2.4.2.2 Biossorvente

Biossorbentes para remoção de metais podem ser: bactérias, fungos, algas, resíduos industriais, resíduos agrícolas e outros materiais polissacarídicos. Em geral, todos os tipos de biomateriais têm mostrado boa capacidade de biossorção para todos os tipos de íons metálicos (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008). Estes, possuem a propriedade de sequestrar metais diminuindo as concentrações dos íons metálicos em nível de ppm a ppb de forma rápida. Sendo assim, são considerados bons biossorbentes no tratamento de elevado volume e baixas concentrações em águas residuais (WANG; CHEN, 2008).

A capacidade de alguns micro-organismos em acumular elementos metálicos foi primeiramente, observada pelo ponto de vista toxicológico (VOLESKY, 2007). Biomassa microbiana inativa pode passivamente ligar-se a íons metálicos através de vários mecanismos físico-químicos. Os mecanismos envolvidos na biossorção pode ser uma combinação de um ou mais processos como, permuta iônica, complexação, coordenação, adsorção, interação eletrostática, quelação e microprecipitação (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

A capacidade biosortiva de vários tipos de biomassa têm sido demonstrada em diversos trabalhos de pesquisa e quantitativamente comparados (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; PARK *et al*, 2010; FOMINA; GADD 2014). Em alguns casos, a absorção de metais tóxicos por biomassa atinge 50% do peso seco (PARK *et al.*, 2010). A capacidade de biossorção pode variar, consideravelmente, entre biomassa da mesma espécie microbiana. Por exemplo, a capacidade de biossorção de chumbo variou de 2 a 93 mg/g-1 peso seco para fungos filamentosos das espécies *Aspergillus niger* e 79-270 mg/g peso seco⁻¹ para leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (DHANKHAR; HOODA, 2011; FOMINA; GADD 2014). No entanto, a capacidade biosortiva de um biossorvente depende em grande parte das condições experimentais, sua pré-história e pré-tratamento. Ao comparar as capacidades biosortivas de biossorventes para um poluente alvo, os dados experimentais de cada pesquisador deve ser cuidadosamente considerado.

2.4.3 Mecanismos de Biossorção de Metais por Micro-organismos

Décadas de pesquisa sobre biossorção proporcionaram uma compreensão dos mecanismos de biossorção microbiana de metais e elementos relacionados (GADD, 2009; KOTRBA, 2011).

Quando há dependência do metabolismo celular, a captação envolve o transporte ativo de metais através do envoltório celular para o interior da célula. Do contrário, os metais são capturados na superfície do micro-organismo (MOREIRA, 2007). De acordo com o sítio onde o metal é removido, a biossorção pode ocorrer conforme a classificação apresentada a seguir.

Processo de acumulação extracelular, que é a sorção na superfície da célula acompanhada de precipitação intracelular (MURALEEDHARAN *et al*, 1991;

MOREIRA, 2007). Este último processo depende do metabolismo celular e toma lugar nas células viáveis. Normalmente está associado ao sistema de defesa de micro-organismos, os quais reagem à presença de metais pesados (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997).

Quando ocorrem interações físico-químicas entre metais e grupos funcionais presentes na superfície celular, os mecanismos incluem: adsorção, troca iônica e complexação, podendo ser uma biossorção rápida e reversível com propriedades biossorvente análogas às resinas de troca iônicas convencionais (GADD, 2009).

No entanto, o material biológico é complexo e de uma variedade de componentes estruturais presentes na biomassa, o que significa que muitos grupos funcionais são capazes de interagir com as espécies de metais, por exemplo, grupos carboxila, fosfato, hidroxilo, amino, tiol, entre outros, em graus variados e influenciados por fatores físico-químicos. O fenômeno físico-químico na biossorção metálica é um mecanismo não dependente do metabolismo celular, é relativamente rápido e pode ser reversível permitindo a dessorção e reuso da biomassa (FOMINA; GADD, 2014).

Na realidade, dependendo do sistema e dada às condições, a biossorção pode ser um processo mecanicamente complexo (GADD, 2009; FOMINA; GADD, 2014). Precipitação e cristalização são outros possíveis mecanismos, que podem ocorrer e complicar a sorção e/ou dessorção. Os vários mecanismos envolvidos na biossorção podem acontecer simultaneamente em diferentes graus (GADD; FOMINA, 2011).

2.4.3.1 Transporte através da membrana celular

Como já foi dito, este é um fenômeno associado ao metabolismo celular. A toxicidade dos metais não permite trabalhar com altas concentrações, por isso o processo é pouco empregado. O mecanismo exato é difícil de ser identificado, pois o metal é transportado através da membrana celular e pode sofrer o mesmo processo que os metais essenciais tais como potássio, magnésio e sódio (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997; MOREIRA, 2007).

2.4.3.2 Adsorção

A adsorção é um processo no qual, substâncias solúveis presentes em solução são captados em uma interface, ou seja, há uma transferência seletiva de um ou mais solutos de uma fase fluida para uma fase sólida. Em geral, a adsorção inclui a acumulação de moléculas de soluto em uma interface, neste caso, líquido-sólido (TOBIN et al, 1994; MOREIRA, 2007). Se há adsorção, significa que os sítios ativos da biomassa devem estar livres para aceitar íons metálicos. Essa interação se dar de duas formas: interações do tipo covalente e iônicas.

O tipo de ligação que se forma a partir deste tipo de energia superficial pode ser fraca ou forte. Quando o sólido é, por exemplo, iônico e a molécula que se adsorve é polarizável, a ligação formada é forte, e passa a ser conhecida como Adsorção Química ou quimiossorção. Se a ligação é fraca, ao nível de forças de Van der Waals (atração como a de moléculas no estado líquido), a adsorção é conhecida como Adsorção Física ou Fisissorção. Na adsorção física podem formar-se camadas moleculares sobrepostas, enquanto que na adsorção química se forma uma única camada molecular adsorvida (monocamada) (FOUST, 1982; SOUZA, 2012). O processo de adsorção é, por muitas vezes, reversível, de modo que a modificação da temperatura e/ou pressão pode provocar a fácil remoção do soluto adsorvido no sólido (FOUST, 1982; SOUZA, 2012).

2.4.3.3 Troca Iônica

Em geral, a troca iônica acontece em todas as dimensões do sólido polimérico. Os compostos de cargas positivas, cátions ou negativas, ânions, presentes na fase fluída, deslocam íons não semelhantes com o mesmo tipo de carga que inicialmente se encontravam na fase sólida. O trocador iônico contém permanentemente pares iônicos (VOLESKY, 1990; MOREIRA, 2007).

Na parede celular dos micro-organismos encontram-se polissacarídeos que são basicamente blocos que contêm os ânions e cátions responsáveis pela troca iônica.

Neste mecanismo, não é necessário que os sítios ativos para a biossorção estejam livres, pelo contrário, este é baseado na troca de íons com diferentes

afinidades pelo bioadsorvente. Existem íons de maior e menor afinidade que se encontram ligados aos bioadsorventes. Dependendo das condições do meio, o íon de maior afinidade é capaz de trocar de posição com o íon do sítio ativo, realizando-se assim a troca de íons. Igualmente na adsorção, podem apresentar-se dois tipos de interações, tanto covalentes como iônicos, entre a biomassa e o metal (MOREIRA, 2007).

2.4.3.4 Complexação e Precipitação

A remoção do metal da solução pode ocorrer através da formação de um complexo na superfície da célula depois da interação entre o metal e grupos ativos. Este mecanismo envolve a coordenação de um íon metálico com um grupo funcional da parede celular como, por exemplo, o ácido carboxílico. Este fenômeno pode trocar os estados de oxidação dos metais tanto para torná-los solúveis como insolúveis (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997; SOUZA, 2012).

Aksu; Sag e Kutsal (1992) consideraram a hipótese de que a biossorção de cobre por *C. vulgaris* e *Z. ramigera* ocorre através de ambos os mecanismos de adsorção e formação de bandas coordenadas entre metal e grupos amino e carboxil dos polissacarídeos da parede celular. Complexação foi considerado como sendo o mecanismo único responsável pela acumulação de cálcio, magnésio, cádmio, zinco, cobre e mercúrio por *Pseudomonas syringae*. Micro-organismos podem também produzir ácidos orgânicos (por exemplo, ácido cítrico, oxálico, fumárico, glucônico, láctico e málico), que podem quelar metais tóxicos formando moléculas metal-orgânicas. Estes ácidos orgânicos ajudam na solubilização de compostos metálicos e na lixiviação da superfície. Metais podem ser biossorvidos ou complexados por grupos carboxílicos encontrados em polissacarídeos microbiais e outros polímeros.

2.4.4 Fatores que afetam a Biossorção

O desempenho da sorção de um metal por um determinado biossorvente depende de alguns fatores. Além da presença de outros íons (que poderiam competir pelos mesmos sítios de ligação), bem como de materiais orgânicos em solução (atuando como agentes complexantes) e de produtos metabólicos da célula em solução (que poderiam causar precipitação do metal), o pH, a temperatura, a

concentração do metal e as condições da biomassa (se viva ou morta, quantidade, tamanho, pré-tratamentos) podem afetar sua capacidade de sorção.

2.4.4.1 Efeitos do pH

O valor do pH da solução é um dos fatores que mais afeta a sorção de metais pesados. A sorção aumenta com o aumento do pH, devido ao aumento da densidade de cargas negativas na solução, gerando sítios ativos para interação com o metal pesado. A exceção é feita para íons metálicos presentes como espécies aniônicas, onde a biossorção é favorecida pelo decréscimo do valor do pH (PARK *et al*, 2010). Os valores muito altos do pH, causam precipitação dos complexos metálicos, e devem ser evitados durante experimentos de sorção, pois a distinção entre sorção e precipitação na remoção metálica seria difícil (SCHIEWER; VOLESKY, 1995; MOREIRA, 2007; PARK *et al*, 2010).

Os íons metálicos podem ser classificados em três classes com base no efeito do pH no processo de biossorção (WASE; FORSTER, 1997). A primeira classe é adsorvida a $\text{pH} > 5$ e pode ser dessorvida a $\text{pH} < 2$. Nesta classe estão Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} . Estes cátions ligam-se aos sítios ativos presentes na parede celular do biossorvente. Mas, à medida que o pH diminui, a carga da parede celular torna-se positiva e inibe a aproximação dos íons positivos. Para as espécies metálicas aniônicas (segundo grupo) como TcO_4^- , PtCl_4^{3-} , CrO_4^{2-} , SeO_4^{2-} e $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ a situação inverte-se: para valores inferiores de pH a biossorção aumenta. Este efeito é explicado pelo aumento da ligação dos prótons aos sítios ativos, o que torna a superfície carregada positivamente atraindo os ânions. Estão descritas algumas situações em que não foi observado nenhum efeito do pH na capacidade de biossorção, como, por exemplo, na biossorção do molibdênio pela alga *Chlorella regularis* (SAKAGUCHI *et al.*, 1981), embora a biossorção de outros metais pela mesma alga seja afetada pelo pH. Outras espécies metálicas, cujo processo de biossorção é independente do pH, são Ag^+ , Hg^{2+} e AuCl_4^- (HOSEA *et al.*, 1986). Estes metais constituem o terceiro grupo e, geralmente, são considerados “macios” na natureza porque formam, preferencialmente, complexos covalentes com ligantes “macios”, contendo nitrogênio e enxofre.

2.4.4.2 Influência da Temperatura

O aumento da bioadsorção de íons metálicos com a temperatura pode ser explicado pela dissociação de espécies químicas presentes no bioadsorvente, o que faz com que haja mais sítios livres para a fixação dos íons metálicos, ou pela diminuição do calor de adsorção, o que facilita a remoção dos íons ligados aos sítios ativos dos bioadsorventes, os quais são depois ocupados pelo íon metálico (PARK *et al.*, 2010; KOTRBA; 2011).

Os estudos realizados têm demonstrado que na faixa de 5 a 35°C a temperatura exerce pouco efeito sobre a bioadsorção em meio aquoso (PARK *et al.*, 2010).

2.4.4.3 Concentração do Metal

Um dos fatores mais importantes que influenciam na remoção metálica é a concentração do metal pesado presente na solução. Bioadsorção pode ser aplicada em uma ampla faixa de concentração metálica. Com o aumento da concentração metálica em equilíbrio, a capacidade de bioadsorção (mg de metal por grama de biomassa) aumenta, e a eficiência da bioadsorção diminui (GADD, 2009; PARK *et al.*, 2010). A capacidade de sorção é limitada pelo número de sítios ligantes na biomassa. Para baixas concentrações do metal pesado, como ocorre em águas de produção da indústria de petróleo é necessário pequenas concentrações de biomassa para atingir a capacidade máxima de remoção metálica (BARROS JÚNIOR, 2001; MOREIRA, 2007).

2.4.4.5 Biomassa

A eficiência da bioacumulação por organismos vivos depende das condições do meio de cultura, estado fisiológico ou idade do organismo (TSEZOS *et al.*, 1995). Em determinadas situações, a bioadsorção por material morto provou ser mais eficiente do que a bioacumulação por organismos vivos (TSEZOS *et al.*, 1995; WASE; FORSTER, 1997).

A natureza do bioadsorvente e da disponibilidade de sítios de ligação, pré-história de crescimento e tratamento, modificação física ou química, dosagem e

tamanho são de grande importância para o desempenho (GADD, 2009; PARK *et al*, 2010;. KOTRBA, 2011; LI; TAO, 2013).

Alguns tipos de biomassa (por exemplo, alga *Chlorella Vulgaris*, biomassa de *Bacillus*, *Sphagnum* sp.) (GUPTA *et al.*, 2001) têm demonstrado uma eficiência semelhante ou maior que a das resinas de permuta iônica. Brower *et al.* (1997) compararam algumas resinas de permuta iônica com um biossorvente (NCP - *Neurospora Crossa Gene*) (recombinação da bactéria *Escherichia coli*) e verificaram que, para os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , e Cr^{3+} , a eficiência do biossorvente é semelhante ou maior que a das resinas de permuta iônica (Duolite GT-73 – resina com o grupo funcional tiol; IRC-718 – resina quelante com o grupo funcional ácido iminodiacético; BIO-FIX – turfa de musgo imobilizado com polissulfonas).

2.4.6 Técnicas de Detecção de Metais

Uma série de técnicas analíticas estão sendo usadas no estudo de biossorção e incluem espectrofotometria de absorção atômica (AAS), eletrodos seletivos de íons (ISE), UV-Vis espectrofotômetro, titulação potenciométrica, digitalização ou microscopia eletrônica de transmissão, juntamente com energia dispersiva de espectroscopia de raios X (SEM / TEM-EDX), espectroscopia no infravermelho com transformação de Fourier ou espectroscopia de infravermelho (IR ou FTIR), espectroscopia de absorção de raios-X (XAS), a análise de difração de raios X (XRD), espectroscopia de ressonância de spin de elétrons (ESR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (PARK *et al*, 2010;. MICHALAK *et al*, 2013). Estas técnicas podem complementar-se e ajudar na compreensão dos mecanismos de biossorção (PARK *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foram utilizados os métodos de Voltametria por Redissolução Anódica (VRA) e de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), que são técnicas eletroquímicas utilizadas para determinação quantitativa de baixas concentrações de metais pesados em soluções aquosas, como substituintes dos métodos espectroscópicos e de titulação.

2.5 BIOSSORVENTES BACTERIANOS

As bactérias são os mais abundantes e versáteis micro-organismos e constituem uma parte significativa de toda a biomassa viva terrestre de $10 \sim 10^{18}$ g (MANN, 1990). No início de 1980, alguns micro-organismos foram selecionados pela alta capacidade de acumulação de metais (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; WANG; CHEN, 2009). Micro-organismos marinhos enriquecido com Cd e Pb com fatores de 1.7×10^5 e $1,0 \times 10^5$, respectivamente, em relação à concentração de soluto destes elementos nas águas do oceano (MANN, 1990). As bactérias foram usadas como biosorventes devido à sua pequena dimensão, a sua ubiquidade, a sua capacidade de crescer em condições controladas, e a sua resistência a uma vasta gama de condições ambientais. Espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Micrococcus*, entre outros, têm sido testadas para a captação de metais e compostos orgânicos (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; WANG; CHEN, 2009).

As bactérias possuem estrutura celular relativamente simples, não apresentando núcleo celular, porém possuindo paredes celulares (SALTON, 1964). A parede celular bacteriana proporciona integridade estrutural para a célula, mas difere de todos os outros organismos, devido à presença de peptidoglicano, formado pelos açúcares (poli- *N* - acetilglucosamina e ácido *N* - acetilmurâmico), que está localizada do lado de fora da membrana citoplasmática (ROGERS *et al.*, 1980). O peptidoglicano é responsável pela rigidez da parede celular bacteriana, e determina a forma da célula (KOLENBRANDER; ENSIGN, 1968). Também é relativamente porosa e considerada como uma barreira de impermeabilidade aos pequenos substratos (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; WANG; CHEN, 2009).

As paredes celulares das bactérias não são todas idênticas. De fato, a composição da parede celular é um dos fatores mais importantes na análise e diferenciação de espécies bacterianas. Deste modo, há dois tipos gerais de bactérias, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 1). A parede celular das bactérias Gram-positivas consiste de uma camada espessa de peptidoglicano (BEVERIDGE, 1981; DIJKSTRA; KECK, 1996) ligadas por pontes de aminoácidos. Além disso, contêm ácidos teicóicos, que consistem principalmente de álcool (como glicerol ou ribitol) e fosfato. Existem duas classes de ácidos teicóicos: ácido lipoteicoico, que

atravessa a camadas de peptideoglicana e está ligada a membrana plasmática, e ácido teicoico da parede, que está ligado à camada de peptideoglicana. Devido a sua carga negativa (proveniente do grupo fosfato), os ácidos teicoicos podem se ligar e regular o movimento dos cátions (íons positivos) para dentro e para fora da célula (TORTORA *et al.*, 2012). De um modo geral, 90% da parede celular de bactérias Gram-positivas é composta de peptidoglicano.

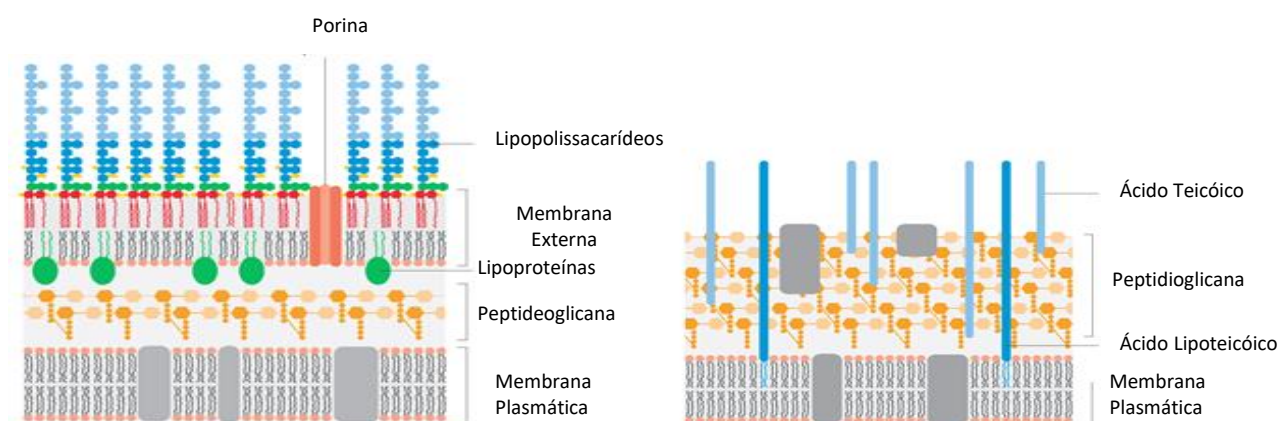


Figura 1. Composição química das Paredes Celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Fonte (<http://epidemiologiamolecular.com>).

Entretanto, a parede celular das bactérias Gram-negativas (Figura 1) é composta por apenas 10-20% do peptidoglicano (BEVERIDGE, 1999). Trata-se de uma estrutura de várias camadas, onde há uma camada de peptidoglicano entre a membrana plasmática e uma membrana externa. A membrana externa consiste em lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, fosfolipídios e enzimas. O espaço entre a membrana externa e a membrana plasmática é referido como espaço periplasmático (TORTORA *et al.*, 2012). A natureza altamente carregada dos lipopolissacarídeos da membrana externa confere uma carga negativa global sobre a parede celular de bactérias Gram-negativas. Sherbert (1978), mostrou que os grupos aniônicos funcionais presentes nos ácidos peptidoglicano, e ácidos teicoico de bactérias Gram-positivas, e peptidoglicano, fosfolipídios e lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas foram os componentes principais responsáveis pelo caráter aniônico e capacidade de sequestro de metal pela parede celular. No entanto, a disponibilidade de lipopolissacarídeos depende

da espécie bacteriana e condições de crescimento, e podem ser facilmente removidos por simples ruptura mecânica ou lavagem química (YEE; FEIN, 2001).

A parede celular bacteriana é o primeiro componente que entra em contato com íons metálicos, onde os solutos podem ser depositados sobre a superfície ou no interior da estrutura da parede celular (BEVERIDGE; 1999; VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; WANG; CHEN, 2009). Uma vez que o modo de absorção de solutos por células inativas é extracelular, os grupos químicos funcionais da parede celular desempenham um papel vital na bioabsorção. Devido à natureza dos componentes celulares, vários grupos funcionais estão presentes na parede celular bacteriana, incluindo carboxila, fosfonato, amina e hidroxila (DOYLE *et al.*, 1980; VAN DER WAL *et al.*, 1997). Como eles são carregados negativamente e abundantemente disponíveis, os grupos carboxilas participam ativamente na ligação de cátions metálicos. Golab e Breitenbach (1995) indicaram que os grupos carboxila do peptidoglicano da parede celular de *Streptomyces pilosus* eram responsáveis pela ligação de cobre. Além disso, os grupos amina são muito eficazes na remoção de íons de metais, uma vez que não só os íons metálicos catiônicos quelatos, mas também absorve espécies metálicas aniônicas. Kang e colaboradores (2007) observaram que os grupos amina protonados a pH 3 atraíam íons cromato carregados negativamente através de interação eletrostática. Em geral, o aumento do pH aumenta a carga global negativa sobre a superfície das células até que todos os grupos funcionais são desprotonados, o que favorece a atração eletroquímica e adsorção de cátions. Os ânions interagem mais fortemente com as células com concentrações crescentes de cargas positivas, devido à protonação dos grupos funcionais com valores de pH mais baixos.

A solução química não só afeta a química da superfície bacteriana, mas a especiação do metal. Os íons metálicos na solução são sujeitos a hidrólise com o aumento de pH. Os diferentes valores de pH e a sequência de hidrólises à formação de espécies monoméricas hidroxilados, seguido pela formação de espécies poliméricas, e formação de óxido cristalino precipitado após envelhecimento (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008; WANG; CHEN, 2009). Por exemplo, no caso da solução de níquel, (LOPEZ *et al.*, 2000) indicaram que, dentro da faixa de pH de 1 a 7, o níquel existia na solução em forma de íons de Ni^{2+} (90%), ao passo que, a pH 9, co-existiam Ni^{2+} (68%), $\text{Ni}_4\text{OH}_4^{+4}$ (10%) e $\text{Ni}(\text{OH})^+$ (8,6%). As diferentes espécies químicas de

um metal que ocorre com as alterações de pH terá cargas variáveis e adsorção nas interfaces líquido-sólido. Em muitos casos, as experiências conduzidas pela biossorção a elevados valores de pH alcalinos foram relatados para complicar a avaliação do potencial biossorvente como resultado da precipitação de metal (SELENITA *et al.*, 2004; IQBAL; SAEED, 2007).

2.6 GÊNERO *PANTOEA*

O gênero *Pantoea* foi formado para acomodar dois grupos de hibridação do complexo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans* que não se correlacionavam nem com *Erwinia* nem com *Enterobacter* (GAVINI *et al.*, 1989). Os primeiros trabalhos referentes as bactérias, que posteriormente fariam parte deste complexo, foram isolados de plantas, sementes e frutos e nomeadas de *Bacterium herbicola aureum* (DÜGGELI, 1904 citado por GRAHAM; HODGKISS, 1967) e *Erwinia lathyri* (MANN; DAUBENHAUS, 1913 citado por GRAHAM; HODGKISS, 1967). Outras espécies, que mais tarde, aderiram ao complexo grupo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans* foi *Pseudomonas trifolii*, que se tornou *Xanthomonas trifolii* senão *Xanthomonas herbicola* (GRAHAM; HODGKISS, 1967). Em 1964, foi sugerido por Dye que *X. trifolii* e *E. lathyri* apresentavam características morfológicas e bioquímicas semelhantes, sendo assim, reclassificados para *Erwinia herbicola* (DYE, 1964). Graham e Hodgkiss (1967) notaram as semelhanças entre *B. typhi flavum* e as bactérias cromogênicas *E. herbicola*, *E. lathyri*, *E. ananas*, *E. cassavae*, *E. milletiae* e *E. uredovora*. Em 1972, Ewing e Fife coparam “bacteria *herbicola-lathyri* “ com isolados de um surto de septicemia nosocomial ocorrido nos EUA em 1971, e sugeriram que todos os isolados deveriam ser incorporados ao gênero *Enterobacter* como *Enterobacter agglomerans* (EWING; FIFE, 1972). O epíteto *agglomerans* (BEIJERINCK, 1888) refere-se à *herbicola* e *trifolii*. Os nomes *Erwinia herbicola* e *Enterobacter agglomerans* foram incluídos no Approved Lists of Bacterial Names, resultando em uma grande confusão à respeito da taxonomia correta dessas bactéria (SKERMAN *et al.*, 1980). A partir de então, muitos estudos foram realizados sobre o complexo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans* no intuito de resolver a nomenclatura dessas linhagens (GAVINI *et al.*, 1983; MERGAERT *et al.*, 1983, BRENNER *et al.*, 1984, VERDONCK *et al.*, 1987, BEJI *et al.*, 1988). Um dos trabalhos mais bem sucedidos foi o de Brenner *et al.*, (1984), que realizou hibridação DNA-DNA em 124 linhagens pertencentes ao

complexo *Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans*. Noventa amostras foram divididos em 13 grupos de hibridação de DNA (Grupos de I á XIII) ás trinta e quatro linhagens restantes foram designadas como espécies novas.

O grupo de hibridação de DNA XIII é representados pelas linhagens: *Erwinia herbicola* ssp. *Herbicola*, *Erwinia lathyri*, *Erwinia milletiae* e *Xanthomonas trifolii* (BRENNER *et al.*, 1984). Estas linhagens e linhagens referêntes á essas espécies foram mais tarde hibridizados com linhagem de *Enterobacter agglomerans* (ATCC 27155^T) e demonstraram mais de 90% de DNA homólogo. Com base nos dados de hibridação de DNA, eletroferogramas de proteínas e dados fenotípicos, foi proposto o sinônimo de *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* e *Enterobacter agglomerans* (BEJI *et al.*, 1988). De acordo com Ewing e Fife (1972), denominação *agglomerans*, tinha prioridade, mas a determinação das espécies em um gênero estava ainda confusa. Um ano mais tarde, um novo gênero *Pantoea* foi proposto para conter as espécies *agglomerans* as quais, eram sinonimas *Erwinia herbicola* e *Erwinia milletiae* (GAVINI *et al.*, 1989). Também foi descrita uma nova espécie, *Pantoea dispersa* linhagem pertencente ao grupo III de hibridização de DNA proposto por Brenner *et al.*(1984).

No Japão, em 1988, cepas de bactérias que produzem ácido 2,5-diceto-D-glucônico (DKGA) foram isoladas de frutas e amostras de solos. À medida que essas linhagens partilhavam as características gerais do gênero *Erwinia*, foram provisoriamente denominadas “*Erwinia citreus*” “*Erwinia punctata*” e “*Erwinia terreus*” (SONOYAMA *et al.*, 1988). Após mais testes, concluiu-se que estas linhagens que produzem DKGA pertenciam ao complexo *Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans*, como eram fenotipicamente relacionada com grupos de hibridização de DNA II, III e IV de Brenner *et al.* (1984). Seguinte hibridization de DNA e testes fenotípicos, as cepas produtoras de DKGA foram descritas e classificadas no gênero *Pantoea* como *P. citre*, *P. punctata* e *P. terrea* (KAGEYAMA *et al.*, 1992).

Posteriormente foi transferido *Erwinia ananas*, *Erwinia uredovora* e *Erwinia stewartii* para o gênero *Pantoea* usando Hibridação de DNA e perfil de proteínas (MERGAERT *et al.* 1993). *E. ananas* e *E. uredovora* mostraram-se sinônimos subjetivos e unidos como uma única espécie que foi classificada como *Pantoea*

ananas. Várias linhagens de Brenner's, gupos de hibridação de DNA VI, foram encontrados grupos de proteínas com o mesmo perfil de *Pantoea ananas*, resolver outro grupo a partir do complexo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans*. O epíteto *ananas* mais tarde foi corrigida para *ananatis* de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (TRÜPER; DE'CLARI, 1997). Duas subspécies foram criadas dentro das espécies *Pantoea stewartii* (antigamente *Erwinia stewartii*), *P. Stewartii* subsp. *stewartii* e *P. Stewartii* subsp. *indologenes* (MERGAERT *et al.* 1993). Estas duas subsespécies partilhavam 60-83% de homologia de DNA, porém, eram significativamente diferentes em características bioquímicas e composição de ácidos graxos. Dentre os 13 grupos de hibridização de DNA de Brenner *et al.*, (1984), tres grupos (III, VI e XII) foram classificadas conclusivas para espécies de *Pantoea* e quatro grupos (I, II e IV) provisoriamente atribuídas ao gênero *Pantoea* (GRIMONT; GRIMONT, 2005). Os seis grupos restantes, têm sido atribuídos à outros gêneros dentro do *Enterobacteriaceae*.

Pantoea sp. são isolados de diversos nichos ecológicos, apresentam pigmentação amarela ou bege e mobilidade, são endofíticos não patogênicos de plantas ou epífitas. Neste contexto, podem ser benéficas para a planta hospedeira, contribuindo na promoção do crescimento por meio da produção de hormônio, de ácido indol-acético (IAA), solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (DE MAAYER *et al.* 2012).

Algumas cepas de *Pantoea* apresentam proteção contra várias bacterioses em plantas, bem como doenças fúngicas e podridões pós-colheita de frutas (DE MAAYER *et al.* 2012; SMITS *et al.*, 2011). Isso sugere que os membros deste gênero sofreram diversificação genotípica extensa. Um meio pelo qual isso ocorre, entre as bactérias, é através da aquisição e manutenção de plasmídeos, transferência de elementos genéticos extra-cromossômicos entre espécies (KADO, 1998; DE MAAYER *et al.* 2012). Contribuindo também, resistência a antibióticos e metais pesados e sobrevivência em condições adversas, catabolismo dos amino e ácidos orgânicos, carboidratos e íons inorgânicos, colonização e disseminação (VIVIAN *et al.*, 2001; DE MAAYER *et al.* 2012).

A tranferência de plasmídeo também transporta genes para a biossíntese de sideróforo desferrioxamina E, biosíntese de acil-homoserina lactona e quorum

sensing, resistência à ampicilina e as vias de utilização de hidratos de carbono que podem contribuir para a aptidão ecológica e eficácia de biocontrole (SMITS *et al.*, 2011; DE MAAYER *et al.* 2012).

2.6.1 Potencial Biotecnológico de *Pantoea*

Recentemente, os benefícios da combinação bacteria endofítica com plantas, usados na biorremediação de poluentes têm sido experimentados com êxito para remoção de metais tóxicos em solos. Bactérias endofíticas residem em plantas hospedeiras sem causar doença. Sendo assim, endófitos metálicos resistentes podem estar presentes em plantas hiper-acumuladoras, que crescem em solos contaminados com metais pesados, desempenhando papel importante na sobrevivência e crescimento destas plantas. Além disso, os endófitos resistentes metálicos são relatados como promotores do crescimento da planta por diversos mecanismos, tais como a fixação de nitrogênio, solubilização de minerais, produção de fitormônios, sideróforos, utilização de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico como única fonte de nitrogênio e transformação de nutrientes (RAJKUMAR *et al.* 2009). Características estas, presentes na maioria das linhagens de *Pantoea* e que corroboram para os estudos na biorremediação, e trabalhos de susceptibilidade aos metais pesados.

Pantoea agglomerans tem sido usada na produção de pão centeio, que sofre fermentação com bactérias do ácido láctico, em uma etapa da produção a *P. agglomerans* é cultivada antes do crescimento de *Lactobacilos*, proporcionando ácido fólico, uma vitamina essencial para o crescimento dos *Lactobacilos* (MATSUZAWA *et al.*, 2012). Além disso, na Europa, várias linhagens de *P. agglomerans* têm sido usadas como agentes de controle biológico de doenças pós-colheita de pomóideas (macieira e pereiras) (NUNES *et al.*, 2001).

Os lipopolissacarídeos (LPS), os quais são derivados das paredes das células de *P. agglomerans* IG1, e denominados, IP-PA1 (Potencializador Imuno de *Pantoea agglomerans*) mostraram ativação de macrófagos moderada (NISHIZAWA *et al.*, 1992; MATSUZAWA *et al.*, 2012) tendo, como consequência, múltiplos efeitos úteis, tais como proteção contra úlceras gástrica, efeitos analgésicos, antidiabéticos, profilático e efeitos anti-hiperlipidêmicos, regulação da renovação óssea, efeitos anti-alérgicos e anti-tumoral, quando administrados por via transdérmica ou por via oral

(TAKAHASI *et al.*, 2000; MATSUZAWA *et al.*, 2012). Estes lipopolissacarídeos, produzidos a partir da fermentação de *P. agglomerans* IG1 em farinha de trigo, apresentam potencial aplicação na saúde, alimentação, cosméticos, alimentos na pecuária e aquicultura e na indústrias de medicamentos (SOMA *et al.*, 2008; MATSUZAWA *et al.*, 2012).

REFERÊNCIAS

AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T.V.; KANAMADI, R.D. Biosorption of heavy metals. **Research Journal of Chemistry And Environment**, v. 7 n. 4, p.71-79, 2003.

AHEMAD, M.; MALIK, A. Bioaccumulation of Heavy Metals by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. **Bacteriology Journal**, Washington, v.2, n.1, p.12-21, 2012.

AIKING, H., KOK, K., HEERIKHUIZEN, H. V., VAN'T, R. J. Adaption to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.938-944, 1982

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p.1145-1154, Dec. 2002.

AKSU, Z.; SAG, Y.; KUTSAL, T. The biosorption of copper by *C. vulgaris* and *Z. ramigera*. **Environment Technology**. Washington, v.13, p.579-586, 1992.

BADAR, U., AHMED, N., BESWICK, A. J., PATTANAPIPITPAISAL, P., AND MACASKIE, L.E. , reduction of Chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. **Biotechnology Letters**, v.22, p 829-836,2000.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-hot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, 78-91, 2003.

BARROS JÚNIOR, L.M. **Biossorção de Metais Pesados presentes em águas de produção de campos de petróleo**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2001.

BEJI, A.; MERGAERT, J.; GAVINI, F.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; LECLERC, H.; DE LEY, J. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxo by genotypic and phenotypic data. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p. 77-88, 1988.

BEVERIDGE, T.J. Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial wall. **International Review Cytology**, v. 72, p. 229– 317, 1981.

BEVERIDGE, T.J. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.4725–33, 1999.

BEVERIDGE, T. J., FYFE, W. S. Metal fixation by bacterial cell walls. **Canada Journal of Earth Sciences**, Ottawa, v. 22, p. 1893-1898, 1985.

BIRD, C. **Química Ambiental**. São Paulo: Bookman, 2002. 622p.

BOURG, A. C. M.; LOCH, J. P. G. Mobilization of heavy metals as affected by pH and redox conditions. In: SALOMONS, W.; STIGLIANI, W. M. (Ed.). **Biogeodynamics of pollutants in soils and sediments: risk assessment of delayed and non-linear responses** Germany: Springer, p. 87-102, 1995.

BORDA, M.J.; SPARKS, D.L.; 2008. Kinetics and mechanisms of sorption-desorption in soils: a multiscale assessment. In: Violante, A., Huang, P.M., Gadd, G.M. (Eds.), **Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments**. Wiley, New Jersey, USA, pp. 97–124.

BRENNER, D.J., *et al.* Attempts to classify *Herbicola* group-*Enterobacter agglomerans* strains by deoxyribonucleic acid hybridization and phenotypic tests, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 34, n.1, p. 45–55, jan. 1984.

BRIERLEY, C.L. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwater. **Geomicrobiology Journal**, v.8, p. 201-223, 1990.

BROWER, J. B.; RYAN, R. L.; PAZIRANDEH, M. Comparison of Ion-Exchange Resins and Biosorbents for the Removal of Heavy Metals from Plating Factory Wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 2910-2914, 1997.

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

CERVANTES, C.; ESPINO-SALDAÑA, A.F.; ACEVEDO-AGUILAR, F.; LEÓN-RODRIGUEZ, I.L.; RIVERANO-CANO, M.F. et al. Microbial interactions with heavy metals. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, V.48, n.2, p. 203-10, Abr. 2006.

CESÁRIO SILVA, S. M.; FERNANDES, F.; SOCCOL, V. T.; MORITA, D. M. Principais contaminantes do lodo. In: VON SPERLING, M.; ANDREOLI, C. V.; FERNANDES, F. (Ed.) **Lodo de Esgotos: tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: DESA-UFG, 2001. p. 69-121. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 6).

CHOJNACKA, K. Biossorção e bioacumulação - as perspectivas de aplicações práticas. *Environment International*, Elmsford, v. 36, n. 3, 299-307, Apr, 2010.

CLOETE, T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Barking, v. 51, p. 277-282, Jun. 2003.

COHEN, I., BITON, R., YESHAGAHU, N. The effect of zinc and cadmium ions on *Escherchia coli*, B. *Microbios*. Cambridge, v. 68, 157-168, 1991.

COOK, W. J., KAR, S. R., TAYLOR, K. B., HALL, L. M. Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor *SmtB*: a model for metalloregulatory proteins. *Journal of Molecular Biology*, London, v.275, 337-346, 1998.

DE MAAYER, P.; CHAN, W,Y.; BLOM, J.; VENTER, S.N.; DUFFY, B.; SMITS, T.H.M.; COUTINHO, T.A. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. **BMC genomics**, London, v.13, p. 625, Nov. 2012.

DHANKHAR, R.; HOODA, A. Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, London, v.32, p. 467–491, 2011.

DIJKSTRA, A.; KECK, W. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 5555 –62, 1996.

DOYLE, R.J.; MATTHEWS, T.H.; STREIPS, U.N. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *Journal of Bacteriology*, v.143, p.471– 80, 1980.

DUGGELI, M. The mycological flora infection. *Zentr. Microbial Infection*, v. 12, p. 602 -614, 1904.

DYE, D.W. The taxonomic position of *Xanthomonas trifolli* James, 1955. *New Zeal Journal of Science*, p. 261-269, 1964.

ELLIS, K.V. Surface water pollution and its control” Macmillan press Ltd, Hound mill, Basingstoke, Hampshire RG 21 2xs and London, pp 3-18, 97, 100, 101 and 208, 1989.

EWING, W.H.; FIFE, M.A. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (the Herbicola-Lathyri Bacteria) **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 22, p. 4-11, 1972.

EZZOUHRI, L.; CASTRO, E.; MOYA, M.; ESPINOLA, F.; LAIRINI, K. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco, **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 3, n. 2, p. 35-48, Feb. 2009.

FOMINA, M.; GADD, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, **Bioresource Technology**, New York, Jan. 2014.

FOUST, A. S. **Princípios das operações unitárias**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 670, 1982.

FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; TOUSSAINT, A. Mobile Genetic Elements: the Agents of Open Source Evolution. **Natures Review Microbiology**, London, v. 3, p.722-732, 2005.

GADD, G.M. Metals and microorganisms: a problem of definition. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.100, n.3, p.197–203, Dec.1992.

GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals, **News Phytology**, v.124, p. 25-60, May. 1993.

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

GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, New York, v.156, p.609–643, 2010.

GADD, G.M.; FOMINA, M. Uranium and fungi. **Geomicrobiology Journal**, v. 28, p.471–482, Jul. 2011.

GADD, G.M.; GRIFFITHS, A.J. Microorganisms and Heavy Metals Toxicity. **Microbial Ecology**, Oslo, v. 4, p. 303-317. 1978.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, V.3, n.1, 1303-0868, 58-66, 2003.

GAVINI, F. *et al.* Taxonomic study of strains belonging or related to the genus *Erwinia*, *herbicola* group, and to the species *Enterobacter agglomerans*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 4, n. 2, p. 218–235, 1983.

GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJI, A.; MIELCAREK, C.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 39, n. 3, p. 337-345, Jul. 1989.

GOLAB, Z.; BREITENBACH, M. Sites of copper binding in *Streptomyces pilosus*. **Water Air Soil Pollut**, v. 82, p.713–21, 1995.

GRAHAM, D.C.; HODGKISS, W. Identidade de Gram amarelas pigmentadas negativas, fermentativas, isoladas de plantas e animais. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 30, p. 175-189, 1967.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F. Genus: *Pantoea*, in: D.J.Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, second ed., Springer, New York, 2005, pp. 713–720.

GUPTA, V.; SHRIVASTAVA, A.K.; JAIN, N. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species, **Water Research**, v. 25, p. 4075-4085, 2001.

HALIM, M.; CONTE, P.; PICCOLO, A. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, n.1, p.265–75, Jul. 2003.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Resistance of environmental bacteria to heavy metal. **Bioresource Technology**, New York, v. 64, p.7-15. Apr. 1998.

HAYASHI, A. M. **Remoção de Cromo hexavalente através de processos de bio sorção em algas marinhas.** Campinas, 2001, 209p. UNICAMP, Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

HEC DA SILVA, K. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011, 109p.

HILLERT, M. What is a metal and what is a heavy metal? (Disponível: <http://www.ICME.com>) **International Council on Metals and the Environment.** Newsletter, v.5, n.4, p. 7, 1997.

HOSEA, M.; GREENE, B.; MCPHERSON, R.; HENZEL, M.; ALEXANDER,, M.D.; DARNALL, D.W. Accumulation of elemental gold on the alga *Chlorella vulgaris*. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 123, p.161–165, 1986.

HOYLE, B., BEVERIDGE, T. S. Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, 749-752, Sep. 1983.

HUAMÁN PINO, G. A. **Bio sorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco Verde (*Cocos nucifera*).** Rio de Janeiro, 2005. 113p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

HUHES, M. N.; POOLE, R. K. Metal speciation and microbial growth- the hard (and soft) facts, **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, p. 725-734, 1991.

HUSSEIN, H.; FARAG, S.; KANDIL, K.; MOAWAD, H. Tolerance and uptake of heavy metals by pseudomonads. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 955-961, 2005.

IQBAL, M.; SAEED, A. Production of an immobilized hybrid biosorbent for the sorption of Ni(II) from aqueous solution. **Process Biochemistry**, v.42, p.148–57, 2007.

JI,G.; SILVER, S. Plasmid resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndsmills, v.14, p. 61–75, Feb. 1995.

JOHO, M., INOUE, M., TOHOYAMA, H., MURAYAMA, T. Nickel resistance in yeast and other fungi. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndmills, v. 14, 64-168, 1995.

KADO, C.I. Origin and evolution of plasmids. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 117– 126, Jan. 1998.

KANG, S-Y.; LEE, J-U.; KIM, K-W. Biosorption of Cr (III) and Cr (VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p.54 – 8, 2007.

KOBYA, M.; DEMIRBAS, E.; SENTURK, E.; INCE, M. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. **Bioresources & Technology**, v. 96, n. 13, 1518-1521, 2005.

KOLENBRANDER, P.E.; ENSIGN, J.C. Isolation and chemical structure of the peptidoglycan of *Spirillum serpens* cell walls. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p.201 – 10, 1968.

KOTRBA, P., Microbial biosorption of metals—general introduction. In: Kotrba, P., Mackova, M., Macek, T. (Eds.), **Microbial Biosorption of Metals**. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 1–6, 2011.

KOVACEVIC, F.Z.; SIPOS, L.; BRISKI, F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions, **Food Technology and Biotechnology**, Chicago, v. 38, n. 3, 211-216, 2000.

KUMAR, V.; SUDHAMANI, M.; MALLU, U.R. Heavy metal resistance and bioremediation activity of microorganisms from polluted water and soil environment. **International Journal of Science Innovations and Discoveries**, v.3,n.1, , p.49-57, January-February, 2013.

LADDAGA, R. A., SILVER, S. Cadmium uptake in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 162, p.1100-1105, Jun. 1985.

LAMROOD PRASAD Y.; RALEGANKAR SACHIN D. Biosorption of Cu, Zn, Fe, Cd, Pb and Ni by Non-Treated Biomass of Some Edible Mushrooms. **Asian Journal Experimental Biology Science**, v.4, n.2, 190-195, 2013.

LANG, X.X.; YANG, X.E.; NI, W.Z. Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.13, p.757–62, 2002.

LANG, F.; EGGER, H.; KAUPENJOHANN, M. Size and shape of lead-organic associations. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 265, n. 1, 95-103, Set. 2005.

LAWRENCE, J.G. Clustering of antibiotic resistance genes: Beyond the selfish operon. **ASM News**, Ann Arbor, v.66, p. 281-286, 2000.

LEEDJÄRV, A.; IVASK, A.; VIRTÄ, M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 8, p. 2680-2689, 2008.

LEONEL, L.V.; NASCIMENTO, E.G.; BERTOZZI, J.; VILLAS BÔAS, L.A.; VILLAS BÔAS, G.T. Biorremediação do Solo. **Terra e Cultura**, Londrina, n. 5, ano. 26, Jul-dez. 2010.

LI, X.Z.; NIKAIIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, New York, v. 64, n. 2, p.159-204, 2004.

LI, P.S., TAO, H.C. Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals. **Critical Reviews in Microbiology**, 2013, DOI: 10.3109/1040841X.2013.813898

LÓPEZ, A.; LÁZARO, N.; PRIEGO, J.M.; MARQUÈS, A.M. Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 146–51, 2000.

MAHMOOD, A.; MALIK, R.N. Human health risk assessment of heavy metals via consumption of contaminated vegetables collected from different irrigation sources in Lahore, Pakistan. **Arabian Journal of Chemistry**, v.7, n. 1, p.91–99, January 2014.

MANN, H. Biosorption of heavy metals by bacterial biomass. In: Volesky B (ed) **Biosorption of heavy metals**. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 93–137, 1990.

MARCHETTI, D.P. **Presença de bomba de efluxo em isolados clínicos e ambientais e *Acinetobacter* spp.** Porto Alegre, 2010. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

MATSUZAWA, T.; MORI, K.; KADOWAKI, T.; SHIMADA, M.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; INAGAWA, H.; SOMA, G.I.; TAKEGAWA, K. Genome Sequence of *Pantoea agglomerans* Strain IG1, **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 5, p. 1258-1259, Mar. 2012.

MCENTEE, J. D., WOODROW, J. R., QUIRK, A. V. Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, 515-520, 1986.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov., **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 43, p. 162–173, 1993.

MERGEAY, M. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 9, 17-24, 1991.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process—a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.170, p.1389–1416, 2013.

MINZ, D., ROSENBERG, E., RON, E. Z. Cadmium binding bacteria: Screening and characterization of new isolates and mutants. **FEMS Microbiology Lett**, Amsterdam, v. 135, p.191-194, 1996.

MISRA, T. K. Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. **Plasmid**, New York, v.27, p. 4-16, 1992.

MOREIRA, A. S. **Biossorção utilizando alga marinha (*Sargassum* sp.) aplicada em meio orgânico**. Natal, 2007. 103p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

MOROZZI, G., CENI, G., SCARDAZZA, F., PITZURRA, M. Cadmium uptake by growing of gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbios**, Cambridge, v. 48, p. 27-35, 1986.

MURALEEDHARAN, T.R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Biosorption: na attractive alternative for metal removal and recovery, **Current Science**, Bangalore, v.61, n.6, p.379-385, 1991.

MURATA, K., FUKUDA, Y., SHIMOSAKA, M., WANTANABE, K., SAIKUSA, T., KIMURA, A. Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p.1200-1207, 1985.

MURPHY, R. J., LEVY, J. F. Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.81, p.165-168, 1983.

NI'BHRIAIN, N. N., SILVER, S., FOSTER, T. J. Tn5 insertion mutation in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R100-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.55, p.690-703, 1983.

NIES, D. H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. **Plasmid**, New York, v. 27, 17-28, 1992.

NIES, D.H.; SILVER, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndsmills, v.14, 186-199, Feb. 1995.

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

NIES, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 27, p.313- 339, 2003.

NISHIZAWA, T.; INAGAWA, H.; OSHIMA, H.; OKUTOMI, T.; TSUKIOKA, D.; IGUCHI, M.; SOMA, G.; MIZUNO, D. Homeostasis as regulated by activated macrophage. I. Lipopolysaccharide (LPS) from wheat flour: isolation, purification and some biological activities. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.40, n. 2, p.479 – 483, 1992.

NOVICK, R. P., MURPHY, R. P., GRYCZAN, T. J., BARONE, E., EDELMAN, I. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: Restriction-deletion maps. **Plasmid**, New York, v. 2, p.1335-1342, 1979.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; VINAS, I. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. **International Journal Food Microbiology**, v. 70, p. 53-71, 2001.

O'HALLORAN, T. Transition metals in control of gene expression. **Science**, Washington, v. 261, p.715-725, 1993.

OLIVEIRA-BRETT, A.M.; PIEDADE, J.A.P.; SILVA, L.A.; DICULESCU, V.C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, p.321–329, 2004.

OZER A., PIRINCCI H. B. The Adsorption of Cd (II) ions on Sulphuric acid Treated Wheat Bran. **Journal of Hazardous Materials**, v.13, n.2, p.849-855, 2006.

OYETIBO, G.O.; ILORI, M.O.; OBAYORI, O.S.; AMUND, O.O. Chromium (VI) biosorption properties of multiple resistant bacteria isolated from industrial sewerage, **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 185, n. 8, p.6809-6818, Aug. 2013.

PARK, D.; YUN, Y.-S.; PARK, J.-M. The past, present, and future trends of biosorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, p.86–102, 2010.

Plano nacional de resíduos sólidos. Governo Federal, Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2011, 102p.

POKPAS, K.; ZBEDA, S.; JAHED, N.; MOHAMED, N.; BAKER, P.G.; IWUOHA, E.I. Electrochemically Reduced Graphene Oxide Pencil-Graphite in situ Plated Bismuth - film Electrode for the Determination of Trace Metals by Anodic Stripping Voltammetry. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 9, p.736 – 759, 2014.

THNAYAKE, V. N.; MEGHARAJ, M.; BOLAN, N.; NAIDU, R. Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. **Engineering and Technology**, London, v. 53, p. 1185-1189, 2009.

RAJKUMAR, M., AE, N.; FREITAS, H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. **Chemosphere**, v.77, p.153-160, 2009.

ROANE, T. M.; PEPPER, I. L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial Ecology**, Oslo, v. 38, p. 358-364, Nov. 1999.

ROGERS, H.J.; PERKINS, H.R.; WARD, J.B. **Microbial cell walls and membranes**. London: Chapman and Hall; 1980.

ROUCH, D. A., LEE, B. T. D., MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndsmills, v. 14, 132-141, Feb. 1995.

SAKAGUCHI, T.; NAKAJIMA, A.; HORIKOSHI, T. Studies on the accumulation of metal elements in biological systems XVIII. Accumulation of molybdenum by green microalgae. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p.84–89, 1981.

SALTON, M.R.J. **The bacterial cell wall**. Amsterdam: Elsevier; 1964.

SANNA, G.; PILO, M.L.; PIU, P.C.; ANDREA TAPPARO, A.; SEEGER, R. Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes. **Analytica Chimica Acta**. v 415, p.165–173, 2000.

SCHIEWER, S.; VOLESKY, B. Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption, **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 29, p. 3049-3058, Dec. 1995.

SCOTT, J. A., PALMER, S. J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, 221-225, 1990.

SELATNIA, A.; BOUKAZOULA, A.; KECHID, N.; BAKHTI, M.Z.; CHERGUI, A.; KERCHICH, Y. Biosorption of lead (II) from aqueous solution by a bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p.127 – 35, 2004.

SEVGİ, E.; CORAL, G.; GİZİR, A.M.; SANGÜN, M.K. Investigation of heavy metal resistance in some bacterial strains isolated from industrial soils. **Turk Journal of Biology**, v.34, p.423-431, 2010.

SHOBA, B.; THENMOZHI, R. Biosorption of heavy metal removal from aqueous solution using biomass- review. **International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences**, v. 3, n.6, p.2-7, November-December, 2013.

SHERBERT, G.V. **The biophysical characterization of the cell surface**. London: Academic press; 1978

SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review of Public Health*, Palo Alto, v. 29, p. 151-169, 2008.

SILVA, J.F. **Análise experimental e simulação do processo de bioadsorção de metais pesados (Pb, Zn e Ni) através da alga marinha *Sargassum* sp.** Campinas, 2006, 176p. UNICAMP, Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions: a review. **Gene**, Amsterdam, v. 179, n.1, p. 9-19, Nov. 1996.

SILVER, S., JI, G. Newer systems for bacterial resistance's to toxic heavy metals. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 102, 107-113, 1994.

SILVER, S., PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annu Review of Microbiology**, Paolo Alto, v.50, 753-789, 1996.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Houndmills, v. 32, p.587–605, Dec.2005.

SILVER, S.; SCHOTTEL, J.; WEISS, A. Bacterial resistance to toxic metals determined by extrachromosomal R-factors. In J. M. Shaqgley and A. M. Kaplan (Eds.): **Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium**. pp. 899-917. Applied Science Publishers, London (1976)

SILVER, S., WALDERHAUG, M. Gene regulation and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiological Review**, Washington, v.56, p.195-228, 1992.

SMITH, K., NOVICK, R. P. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*, **Journal of Bacteriology**, Washington, v.112, 761-772, 1972.

SMITS, T.H.M; REZZONICO, F.; KAMBER, T.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; ISHIMARU, C.A.; FREY, J.E.; STOCKWELL, V.O.; DUFFY, B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e22247, Jul. 2011

SOARES, M. R. **Coeficiente de distribuição (K_D) de metais pesados em solos do estado de São Paulo**. Piracicaba, 2004, 214p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

SOMA, G.I.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; YOSHIOKA, N.; TANIGUCHI, Y.; KOHCHI, C. Preventative and therapeutic potential of lipopolysaccharide derived from edible Gram-negative bacteria to various diseases. **Current Drug Therapy**, v. 3, n.1, p.26–32, Jan.2008.

SONOYAMA, T.; YAGI, S.; KAGEYAMA, B. Facultatively anaerobic bacteria showing high productivities of 2,5-dyket-D-gluconate from D-glucose. **Agricultura Biology and Chemistry**, v. 52, p. 667-674, 1988.

SOUZA, F.B. **Remoção de metais de efluentes petroquímicos por adsorção, biossorção e sistemas emulsionados**. Florianópolis, 2012, 195p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SPAIN, A.; ALM, E. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment, **Reviews in Undergraduate Research**, v. 2, p.1-6 , 2003

SUNDAR, K.; MUKHERJEE, A.; SADIQ, M.; CHANDRASEKARAN, N. Cr (III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. **Journal of Hazardous Materials**. 187, 553–561, 2011.

TAKAHASHI, Y.; KONDO, M.; ITAMI, T.; HONDA, T.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; SOMA, G.; YOKOMIZO, Y. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* , by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, n.6, p.555–558, Aug. 2000.

THELWELL, C., ROBINSON, N.J., TURNER-CAVET, J.S. An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 95, p.10728–10733, 1998.

TOBIN, J.M.; WHITE, C.; GADD, G.M. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology*, Houndsmills, v.13, p.126-130, 1994.

TOREM M. L.; CUNHA, F. O.; CASQUEIRA, R. G. Remoção de metais tóxicos e pesados por eletroflotação. **Saneamento Ambiental**, São Paulo, n. 82, Mar/Abr, p. 46-61, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TREVORS, J.T. Plasmid curing in bacteria. **FEMS: microbiology reviews**, v.321, p.149-157, Apr. 1986.

TRÜPER, H.G.; DE'CLARI, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets fromed as substantives (nouns) "in apposition" **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 908-909, 1997.

TSEZOS, M.; Remoudaki, E. Angelatau, A Systematic Study on Equilibrium and Kinetics of Biosorptive Accumulation: The Case of Ag and Ni, **International Biodeterioration and Biodegradation** , Vol. 35, No. 1-3, 1995, 129-153.

VALIX, M; LOON, L. O. Adaptative tolerance behavior of fungi in heavy metals, **Minerals Engineering**, v. 16, p. 193-198, Mar. 2003.

VAN DER WAL, A.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B.; LYKLEMA, J. Determination of the total charge in the cell walls of gram-positive bacteria. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 9, p.81–100, 1997.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 44, n.3, p. 301-316, 1997.

VENNER, M.; RÖDIGER, A.; LAEMMER M.; GIGUÈRE, S. Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rodococcus equi*. **Veterinary Journal**, London, v. 192, n. 3, p.293-298, 2012.

VERDONCK, L.et al. *Genus Erwinia*: Numerical analysis of phenotypic features, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 37, n. 1, p. 4–18, Jan. 1987. ISSN: 0020-7713, 1466-5034.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y.S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, New York, v.26, 266– 291, Feb. 2008.

VIVIAN, A.; MURILLO, J.; JACKSON, R.W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? **Microbiology**, New York, v. 147, n. 4, p. 763– 780, Apr. 2001.

VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. CRC Press, Montreal, 1990.

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

ZENG, E.Y.; CHENG, H. Assessing heavy metal pollution in the surface soils of a region that had undergone three decades of intense industrialization and urbanization **Environment Science Pollution Research**, v.20, p.6150–6159, April, 2013.

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

WASE, J., FORSTER, C. **Biosorbents for metal ions**. Grã Bretanha: Taylor & Francis Ltda, 1997. 238p.

WUERTZ, S.; MERGEAY, M. 1997. The impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities. In J. D. van Elsas, E. M. H. Wellington, & J. T. Trevors (Eds.), **Modern soil microbiology**, p. 1-20. NY: Marcel Decker.

YANG, X.; FENG, Y.; HE, Z.; STOFELLA, P.J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 18, 339-353, 2005.

YAO, Z.; LI, J.; XIE, H.; YU, C. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 722 – 729, 2012.

YEE, N.; FEIN, J. Cd adsorption onto bacterial surfaces: a universal adsorption edge? **Geochim Cosmochim Acta**, v. 65, p.2037– 42, 2001.

YILMAZ, S.; YAGMUR, S.; SAGLIKOGU, G.; SADIKOGLU, M. Direct Determination of Zn Heavy Metal in Tap Water of Canakkale (TURKEY) by Anodic Stripping Voltammetry Technique. **International Journal Electrochemistry Science**, v. 4, p.288 – 294, 2009

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL ENZIMÁTICO DE *Pantoea sp* ISOLADA DE EFLUENTE INDUSTRIAL E RESPOSTAS AO ESTRESSE ABIÓTICO

Isolamento, Identificação, Caracterização e Perfil Enzimático de *Pantoea* sp Isolada de Efluente Industrial de Lavandaria e Respostas ao Estresse Abiótico

Leonila M. L. Acioly^{1,4}, Fabíola C. Gomes de Almeida^{2,4}, Vilar, J. Carlos³, Aline E. Nascimento⁴ and Galba M. Campos-Takaki^{4*}

¹Doutorado em Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

² Doutorado em Engenharia Química de Sistemas, Universidade Estadual de Campinas, 13081-970 Campinas- SP, Brasil

³Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, 54400-160 Jaboatão-PE, Brasil.

⁴ Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brasil.

*Correspondencia do autor: G.M.C.T E.mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Resumo

Enterobacteriaceae do gênero *Pantoea* são caracterizadas como Gram-negativas e têm sido isoladas a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo, solo, água, poeira, produtos lácteos, carne, peixe, insetos, seres humanos e animais. Na maioria das vezes são encontrados associados a uma ampla variedade de plantas. Este trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização bioquímica, morfológica e atividade enzimática, além da influência de fatores abióticos em uma linhagem de *Pantoea* isolada de efluente industrial de lavanderia em Pernambuco. Os resultados mostraram que a bactéria apresenta características semelhantes às apresentadas pela espécie de *Pantoea agglomerans*, no entanto, os testes bioquímicos e morfológicos não foram suficientes para identificação precisa da espécie. Entretanto, a espécie isolada apresentou produção de enzimas como celulase, protease e polifenoloxidase, demonstrando potencial biotecnológico enzimático. Além de tolerância a altas concentrações de salinidade, apresentam-se como mesófila, crescendo em temperatura ótima de 30°C e bom crescimento em pHs 7.0 e 8.0.

Palavras-chaves *Pantoea*, efluente industrial, características bioquímicas; ácidos graxos.

1. Introdução

O gênero *Pantoea* pertence à família *Enterobacteriaceae* e foi proposto por Gavini *et al.* (1989) para pertencer à dois grupos de cepas, que na época, eram classificados como um grupo complexo chamado, *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans*. Esta complexidade deve-se aos muitos fenótipos (GAVINI, *et al.*, 1983; VERDONCK, 1987) e grupos genômicos (BRENNER, *et al.* 1984), alguns dos quais, foram posteriormente designados como novos gêneros (GRIMONT; GRIMONT, 2005).

Atualmente o gênero *Pantoea* compreende dezenove espécies de bactérias Gram-negativas, que apresenta pigmentação amarela ou bege e mobilidade. Constatou-se que as espécies *P. citrea*, *P. punctata* e *P. terrea*, isoladas no Japão e descritas por Kageyama *et al.* (1992) diferiam das demais espécies de *Pantoea* em várias características bioquímica e nutricionais. Grimont e Grimont (2005) determinaram a posição filogenética de todas as espécies de *Pantoea*, atualmente reconhecidas, em grupos de DNA hibridizados, determinados por Brenner *et al.* (1984) usando 16S rRNA. Usando comparações de sequência de *rpo-B*, descobriram que as espécies de origem japonesa constituem um grupo que se juntou ao grupo *Pantoea* a um menor nível. Eles concluíram que o trabalho taxonômico foi necessário para justificar a atribuição dessas espécies para ao gênero *Pantoea* (BRADY *et al.* 2008).

Os membros deste gênero têm sido isolados a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo solo, água, poeira, produtos lácteos, carne, peixe, insetos, seres humanos e animais. Na maioria das vezes eles são encontrados associados a uma ampla variedade de plantas hospedeiras, como endófitos não patogênicos ou epífitos, colonizando as folhas, caules e raízes. Neste contexto, algumas cepas de *Pantoea* podem ser benéficas para as plantas hospedeiras, contribuindo para o crescimento através de processos como a produção de hormônios de crescimento, ácido indol-acético (IAA), solubilização de fosfato ou fixação de nitrogênio (MISHRA *et al.*, 2011; De MAAYER *et al.*, 2012). Algumas cepas, também, proporcionam proteção às plantas contra várias bacterioses, bem como doenças fúngicas e podridão pós-colheta de frutas (SMITS *et al.*, 2011).

Várias espécies de *Pantoea* apresentam-se como patógenos de plantas. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* causa a murcha bacteriana de Stewart do milho, e *Pantoea agglomerans* como agente causador das galhas em *Gypsophila*, *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* e *Wisteria* (ROPER, 2011). *Pantoea* spp também são

frequentemente encontrados associados com insetos (SUE *et al.*, 2010). Por exemplo, a pulga do bisouro do milho *Chaetocnema pulicaria*, serve como o vetor de *P. stewartii* subsp. *stewartii* patógeno da *stewart* murcha do milho (ROPER, 2011). *Pantoea* têm sido implicados como patógenos humanos oportunistas em casos de septicemia, seguintes a trauma penetrante com material vegetal. Há também, casos de infecções hospitalares, devido à exposição a materiais hospitalares contaminados e patógenos secundários complicadores de doenças pré-existentes (MISHRA *et al.*, 2011; De MAAYER *et al.*, 2012).

A identificação das espécies do gênero *Pantoea* é difícil, devido ao elevado grau de semelhanças fenotípicas entre as espécies das *Enterobacteriaceae*. As espécies de *Pantoea* são caracterizadas pela morfologia das colônia, testes fisiológicos e bioquímicos e, em alguns casos, a análise de ácidos graxos e composição quinona. Estes métodos são utilizados para subdividir grupos de organismos. No entanto, atualmente essa abordagem é adicional no processo de identificação (BRADY *et al.*, 2007). Pois, já está provado que a identificação baseada somente nas características fenotípicas, levou a classificações erradas de várias espécies do antigo complexo “*Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans*” (BRADY *et al.*, 2007).

O gênero apresenta bacilos curtos, Gram negativos, com 0,5-1,0 µm de diâmetro e 1,0-3,0 µm de comprimento, são móveis por flagelos peritríquios e muitas amostras produzem pigmento amarelo ou bege. São anaeróbicos facultativos, indol negativo, Voges-Proskauer e citrato de Simmons positivo, a reação de vermelho de metila é variável. Não descarboxilizam a lisina, não produzem H₂S e não hidrolisam a uréia (HOLT *et al.*, 1994).

O método mais preciso para classificar uma bactéria é pela análise do seu material genético. A hibridação do DNA foi usada inicialmente para determinar a relação entre isolados bacterianos. Mas recentemente, esta técnica tem sido explorada para rápida identificação de organismos pelo uso de sondas moleculares. Uma extensão do método de hibridização é a análise de sequências de ácidos nucleicos, como por exemplo, sequências de DNA ribossomal (MURRAY *et al.*, 2006).

Sequências parciais de genes codificadores de proteínas provaram serem úteis para a identificação de espécies e como marcadores filogenéticos da família *Enterobacteriaceae*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostra e Isolamento

As bactérias foram isoladas a partir de efluentes industriais de lavanderia de roupas. Uma quantidade de 1 ml de água de cada uma das amostras colhidas foi dissolvido em 9 ml de água destilada estéril e feitas diluições seriadas. Cada diluição foi semeada em Luria Bertani (LB) ágar pelo método padrão de espalhamento em placa. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 3 dias e as colônias foram transferidas das placas para tubos inclinados com o mesmo meio. Após o crescimento na placa, as colônias de bactérias foram recolhidas em função de suas características morfológicas e purificadas por estrias repetida em placas contendo ágar nutriente e identificado com coloração de Gram. A cultura pura foi então inoculada em caldo nutriente, incubadas e os estoques de glicerol foram feitas e congeladas a – 86°C. Para a caracterização foi utilizado à morfologia das colônias, os ensaios bioquímicos e fisiológicos. A estirpe foi rotineiramente cultivada em meio LB e mantida a 5°C.

2.2. Testes Bioquímicos e Morfologia

A bactéria foi identificada de acordo com a aparência macroscópica (aparência da colônia em meio sólido, forma, textura e pigmentação), coloração Gram, testes de mobilidade, oxidase, catalase e indol. Esses testes foram feitos de acordo com Cappuccino e Sherman (1992).

Para os testes bioquímicos foram usados várias fontes de carbono, como monossacarídeos (D-glicose, D- frutose, D-xilose, D-manose, D-manitol e D-gluconase), dissacarídeos (lactose, maltose, trealose e sacarose) (BROWN; DILWORTH, 1975). Proteína (gelatina) foi avaliado de acordo com o método padrão (CAPPUCINO; SHERMAN, 1992).

2.3 Fatores de Estresse Abiótico

Efeito do Sal: foi avaliado a tolerância do micro-organismo a uma concentração crescente de NaCl (0-100mM) em meio Caldo Nutriente. Ao meio, foi adicionado 100µl da cultura, crescida a um padrão de 0,5 na escala MacFarland. O crescimento foi avaliado ao final de 48h/30°C, usando o espectrofotômetro à 600nm. O método foi realizado em triplicata (SILINI-CHÉRIF *et al.* 2012).

Efeito do pH: o efeito do pH foi testado em Caldo Nutriente com valores de 4, 5, 6, 7, 8, e 10. O meio foi inoculado com 100µl da cultura, crescida a um padrão de 0,5 na escala MacFarland, e inoculado a 30°C/48h. O experimento foi realizado em triplicata. O crescimento foi avaliado usando o espectrofotômetro à 600nm (SILINI-CHÉRIF *et al.* 2012)..

Efeito da Temperatura: foi avaliado o efeito de diferentes temperaturas (4, 30, 37, 41 e 44°C) no crescimento da bactéria. Foi usado o meio Caldo Nutriente com inóculo de 100µl da cultura, crescida a um padrão de 0,5 na escala MacFarland. O tempo de crescimento foi de 48h e o experimento realizado em triplicata. O crescimento foi avaliado usando o espectrofotômetro à 600nm (SILINI-CHÉRIF *et al.* 2012).

2.4. Detecção da Atividade Enzimática

Detecção da amilase: Para a detecção da atividade aminolítica, foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1979), usando o meio Ágar Nutritivo, contendo 0,2 % de amido, posteriormente distribuído em placas de Petri. Após solidificação do meio, realizou-se um furo no centro da placa, por onde foi inoculada uma suspensão bacteriana previamente preparada de 100 µL com (10^7 /CFU). As placas foram incubadas a 35 °C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. A produção da enzima foi evidenciada após lavagem das placas com uma solução de lugol, por meio da formação de um halo opaco em volta da colônia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Detecção da Urease: Para a detecção da atividade ureásica, foi empregado o método de Hankin e Anagnostakis (1979), utilizando o meio Ágar Nutriente (camada inferior), com adição de 5 % de ureia. A camada superior foi feita com ágar tampão fosfato, acrescido de 5 % de solução de ureia e 5% de solução de azul de bromotimol. Após solidificação do meio de cultura, foi realizado um furo no centro da placa de Petri, com diâmetro de 0,8 cm, em que foram inoculados 100 µL da suspensão bacteriana, previamente preparada. As placas foram incubadas a 28 e 37 °C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. Após o período de crescimento microbiano, um halo amarelo claro em torno da colônia indicou a presença da urease. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Detecção da Tanase: Para detecção da atividade do ácido tânico utilizou-se um meio com a seguinte composição: 3 g de nitrato de sódio, 1 g de fosfato dibásico de potássio,

0,5 g de sulfato de magnésio, 0,5 g de cloreto de potássio, 20 g de ágar, 4 g de ácido tânico, 0,04 g de azul de bromofenol e 1.000 mL de água destilada (SHARMA *et al.*, 2000). Outro meio com a mesma composição foi também preparado, porém, removendo-se o azul de bromofenol e aumentando-se a concentração de ácido tânico para 20 g. Após esterilização em autoclave (121°C, 1 atm, 20 min.), esses meios foram vertidos em placas de Petri, solidificados e inoculados, utilizando-se triplicatas e o controle (não-inoculado).

Após solidificação do meio de cultura, foi realizado um furo no centro da placa de Petri, com diâmetro de 0,8 cm, em que foram inoculados 100 µL da suspensão bacteriana de (10^7 /CFU). As placas foram incubadas a 35 °C, durante 96 horas, com acompanhamento diário (escuro). A atividade degradadora foi avaliada pelo surgimento de zonas claras em torno do crescimento bacteriano (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Deteção de Polifenoloxidase: As colônias foram removidas assepticamente, sendo transferidas para o centro da placa de Petri contendo meio Ágar Nutriente modificado (5g de extrato de carne, 10g de peptona, 5g de cloreto de sódio, 750 mL água destilada, pH 6,0, Ácido tânico 5g para 125 ml água e ácido gálico 5g para 125mL água destilada) e incubadas por 24h/35°C. A atividade enzimática foi observada pela formação do halo marrom ao redor da colônia sobre o restante da placa (HARKIN; OBST, 1973).

Deteção da Lipase: Para detecção da atividade lipolítica utilizou-se um meio com a seguinte composição: 10 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio, 0,1 g de cloreto de cálcio bihidratado, 20 g de ágar, 20ml de tween 20 e tween 80 e 1.000 mL de água destilada. O tween foi autoclavado separadamente em vapor fluente e adicionado ao meio antes de distribuir nas placas de Petri. Após esterilização em autoclave (121°C, 1 atm, 20 min.), esses meios foram vertidos em placas de Petri, solidificados e inoculados, utilizando-se triplicatas e o controle (sem tween). Metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1979).

3.Resultados e Discussão

Isolamento e Caracterização da Bactéria

A bactéria isolada foi cultivada em ágar nutriente (AN) por 24h á 30°C. As colônias obtidas apresentaram as seguintes características macroscópicas: colônias

circular, lisa, bordas regulares e planas, com 1mm de diâmetro e pigmento amarelo. O exame microscópico revelou ser um bacilo, Gram-negativo com extremidades arredondadas. Foram apresentadas isoladas ou em pares. É móvel, catalase positiva, anaeróbia facultativa, não fermenta glicose (Tabela 1).

Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Silini-Cherif e colaboradores (2012) na identificação de uma linhagem de *Pantoea agglomerans* Ima2 isolada de rizosfera de trigo. Fujikawa e Akimoto (2011) também mostram resultados semelhantes para *Pantoea agglomerans*. As características bioquímicas apresentadas pela bactéria isolada de resíduo industrial de lavanderia também são semelhantes às cepas de *P. ananatis* e *P. stewartii* (Delétoile *et al*, 2009).

Gavini *et al* (1989) e Mergaert (1993) descrevem o gênero *Pantoea* como bacilos de $0,5-1,3 \times 1,0-3,0\mu\text{m}$. Não encapsulado e não formadores de esporos. A maioria das cepas são móveis por meio de flagelos peritricos, Gram-negativo e as colônias quando crescidas em ágar nutriente são lisas, translúcidas com margens covexas ou heterogênea em consistência inteiras e aderindo ao ágar. As colônias são amarelo, bege ou não pigmentada, anaeróbios facultativos. A temperatura ótima de crescimento fica em torno de 28 e 30 ° C. Oxidase negativa.

A glicose desidrogenase e gluconato desidrogenase são produzidas e são ativos sem um co-fator agregado. Lisina e ornitina não são descarboxilados, urease negativo, não degrada pectina, H₂S não é produzida a partir de tiosulfato. A maioria das cepas são Voges-Proskauer-positivas e indol-negativas. O ácido é produzido a partir da fermentação de L -arabinose, D -ribose, D -xilose, D -galactose, D -frutose, Lramnose, D -manitol, N acetilglucosamina, maltose e trealose. As fontes de carbono utilizadas, a 28°C (Biotipo-100) são D -glicose, D -frutose, D -galactose, trealose, D -manose, celobiose, 1- O -metil β - D -glucopiranosídeo, L -arabinose, glicerol, e L -serina. As fontes de carbono não utilizada a 28 ° C (Biotipo-100) são L -sorbose, palatinose, melezitose, maltitol, turanose, tricarbilato, 4-hidroxibenzoato, gentisato, 3-hidroxibenzoato de metilo, benzoato de metilo, 3-phenylpropionate, m -coumarato, histamina, caprato, caprilato, glutarato, 5-aminovalerate, etanolamina, triptamina, itaconato, 3-hidroxi-butirato, propionato e L -tirosina. As estirpes de referência foram isoladas a partir de plantas, sementes, frutos, dos solos e da água e de seres humanos (urina, sangue, feridas, órgãos internos) e outros animais. Cepas de

diversas espécies são fitopatogênicos em uma ampla gama de instalações e máquinas agrícolas. O teor G+ C do DNA varia 52,7-60,6 mol%.

Caracterização Bioquímica

Os resultados de vários testes bioquímicos foram listados na Tabela 1. A linhagem de *Pantoea* sp. degradou algumas fontes de carbono, tais como, D-manitol, D-manose, D-glicose, D-gluconase, D-frutose e sacarose. E também a proteína gelatina. Apresentou produção de H₂S e foi positivo para o teste de Voges-Proskauer, vermelho de metila e lactose. De acordo com Delétoile *et al* (2009) e Mergaert *et al* (1993) essas são características das linhagens de *Pantoea agglomerans*.

Tabela 1. Características da bactéria isolada de efluente industrial de lavanderia em Pernambuco.

Características Bioquímica	Linhagem Bacteriana	Produção de ácido	Linhagem Bacteriana
Motilidade	+	D-glicose	+
Pigmento Amarelo	+	D-frutose	+
Catalase	+	D-xilose	—
Citrato	—	D- manose	+
Lactose	+	D-manitol	+
Vermelho de Metila	+	D-gluconase	+
Glicose	—	Lactose	—
Produção de Indol	—	Maltose	—
Produção H ₂ S	+	Trealose	+
Reação Voges-Proskauer	+	Sacarose	+

+: Teste positivo; -: Teste negativo.

Respostas ao Estresse Abiótico

Pantoea sp. demonstrou grande habilidade de crescimento em uma ampla faixa de pH, variando de pH 4.0 à pH 8.0. Houve inibição de crescimento para os pHs alacinos (pH 9.0 e 10.0). A bactéria mostrou crescimento ótimo no pH 7.0 (Figura 1). Os resultados foram semelhantes com os demonstrados pela *Pantoea agglomerans* CPA-2 e *Pantoea agglomerans* Ima2 em trabalhos apresentados por Costa *et al* (2002) e

Silini-Chérif *et al*, (2012), respectivamente. Outros trabalhos relataram que o maior desenvolvimento de *Pantoea* ocorre em meio de cultura com valores de pH que oscilam entre 6,0 e 7,0 (COSTA *et al*. 2002).

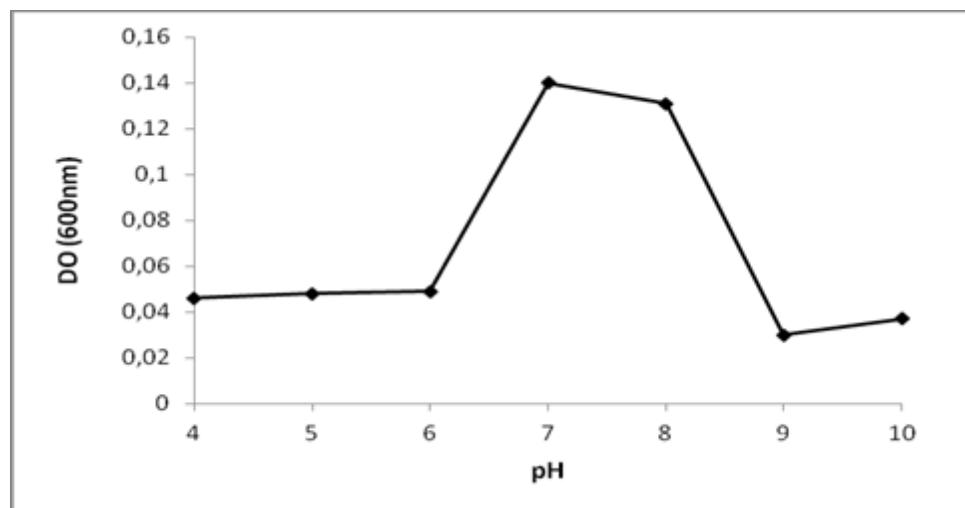


Figura 1. Efeito do pH no crescimento de *Pantoea* sp.após 48h, OD: densidade óptica de 600nm.

A medida da turbidez, quanto ao crescimento em diferentes temperaturas, demonstrou um resultado significativo na temperatura de 30°C, indicando que a linhagem de *Pantoea* testada é mesofílica (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Camatti-Sartori e colaboradores (2008) quando avaliaram a influencia da temperatura no crescimento de *Pantoea agglomerans* e obtiveram os melhores resultados nas temperaturas de 30°C.

O micro-organismo demonstrou boa viabilidade de crescimento em altas temperaturas de 40 e 44°C (Figura 2), o que poderia explicar a presença destes organismos em regiões áridas (SILINI-CHÉRIF *et al*, 2012). No entanto, Camatti-Sartori *et al*, (2008), apresentaram resultados discordantes quanto a temperatura de 40°C, pois houve um decréscimo, significativo, no desenvolvimento do micro-organismo. Son *et al*, (2006) trabalharam com solubilização de fosfato insolúveis por *Pantoea agglomerans* e obtiveram bons resultados de crescimento do micro-organismo em uma faixa de temperatura entre 5 a 45°C. Com melhores resultados em 25-35°C. A temperatura é um dos fatores mais importantes que regem a fisiologia e crescimento de micro-organismos, como relatado por Rahman *et al* (2006).

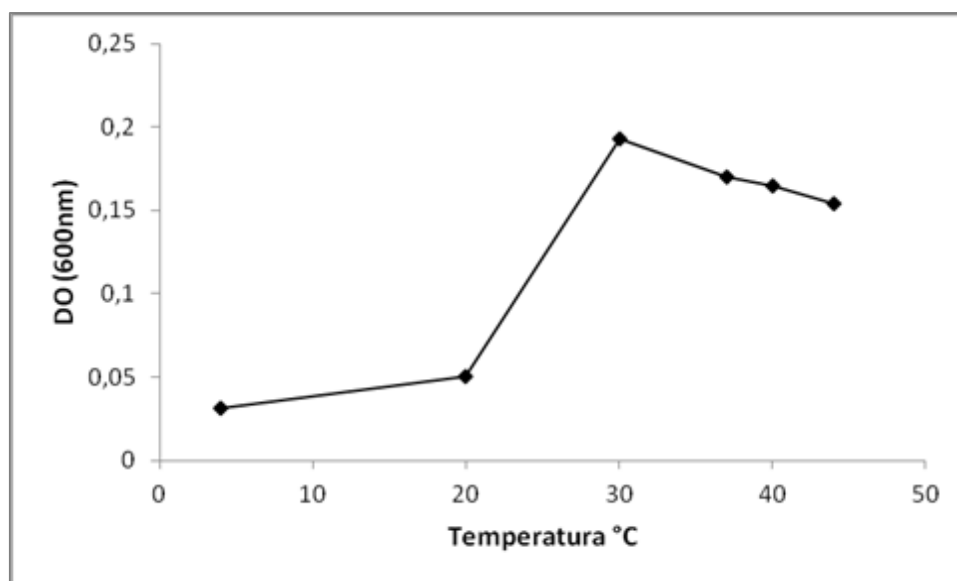


Figura 2 . Efeito da temperatura °C no crescimento da *Pantoea* sp. após 48h, OD: densidade óptica de 600nm.

O crescimento da linhagem em caldo nutriente com variações na concentração salina de 0 à 1000 mM, mostrou uma grande capacidade de tolerância a altas concentrações de sal. O ponto alto do crescimento foi com 100 mM. Mas, apresentou ótimos resultados em concentrações de 400, 800 e 1000 mM de NaCl (Figura 3). De acordo com Borneman *et al* (1996), a salinidade do solo desempenha um papel importante no processo de seleção microbiana. Diversos estudos indicam que bactérias isoladas de ambientes salinos são mais capazes de sobreviver à concentrações de inibição, em relação, à isolados de ambientes não salinos (SHARMA, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por Silini-Chérif *et al*, (2012) ao trabalhar com uma linhagem de *Pantoea agglomerans*.

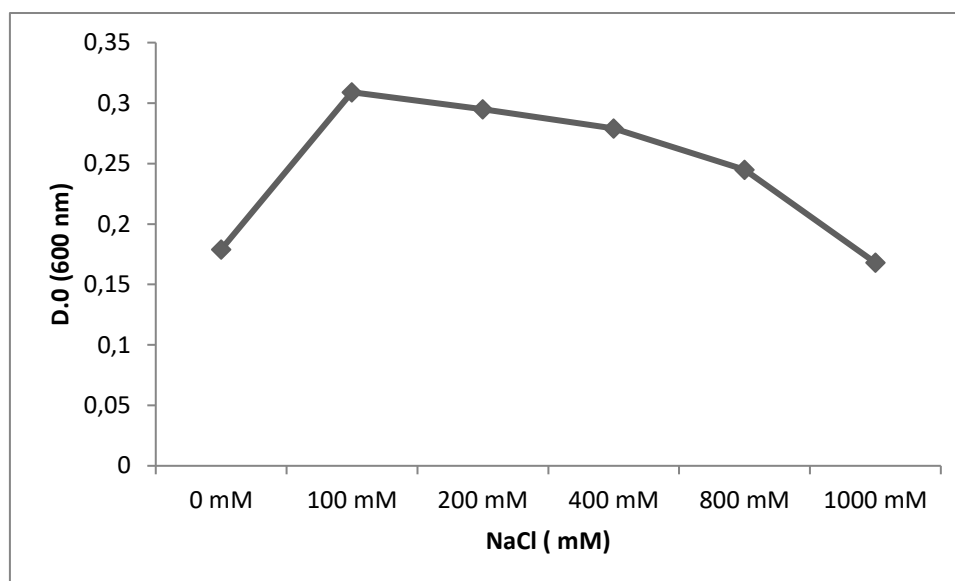


Figura 3. Efeito da salinidade (mM) no crescimento da *Pantoea* sp. após 48h, OD: densidade óptica de 600nm.

Detecção Enzimática

As enzimas microbianas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, uma vez que é por meio delas que os micro-organismos do solo degradam moléculas orgânicas complexas em simples e que podem ser assimiladas. Além de permitir que os micro-organismos tenham acesso à energia e nutrientes presentes em substratos complexos, as enzimas extracelulares são responsáveis pela decomposição e mineralização de nutrientes no solo, disponibilizando-os também para as plantas e promovendo a ciclagem de nutrientes no solo (MAKOL; NDAKIDEMI, 2008). A bactéria do gênero *Pantoea* sp foi submetida aos testes de detecção da atividade enzimática referente à amilase, urease, protease, tanase, celulase e polifenoloxidase. Apresentando resultados positivos para tanase, polifenoloxidase e celulase (Tabela 3.). A tanase é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico (BANERJJE *et al*, 2001). Ela é principalmente utilizada para produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, processo de tratamento de couro, detanificação de alimentos, produção de antioxidantes e para tratamento de efluentes na indústria de couros (BATTESTIN *et al*, 2004).

Tabela 2. Enzimas produzidas pela linhagem bacteriana isolada de efluente industrial de Pernambuco.

Carcaterísticas Enzimáticas	Linhagem Bacteriana
Urease	—
Protease	—
Amilase	—
Tanase	+
Polifenoloxidase	+
Celulase	+

Madhukar *et al*, (1996) detectou a atividade enzimática de amilase e celulase por *Pantoea agglomerans* isolada de manchas em folhas de Ervilha (*Lathyrus maritimus* L). As celulasas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil, essas enzimas são usadas para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento. As celulasas também são utilizadas na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. Também, exercem papel importante na nutrição animal, na fabricação de detergentes, e na indústria de polpa de papel, tornam o papel mais branco e liso. Entretanto, o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização no processo de produção de etanol (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Reações catalisadas por fenoloxidasas estão relacionadas com mudanças nas propriedades da parede celular (aumento da impermeabilidade e resistência hidrostática), interações intracelulares e remoção/detoxificação de certos metabólitos secundários (MAYER;HAREL, 1979).

4. Conclusões

- Conclui-se que os testes bioquímicos e morfológicos mostraram que o micro-organismo isolado é do Género *Pantoea* e que apresenta características semelhantes às apresentadas por *Pantoea agglomerans*;
- Os testes bioquímicos e enzimáticos foram insuficientes para identificação da espécie bacteriana;
- A cepa de *Pantoea* estudada apresenta tolerância a altas concentrações salinas, crescimento ótimo em condições mesófilas de temperatura, 30, 37°C, e pHs alcalinos, 7 e 8;
- *Pantoea* sp. apresentou potencial biotecnológico enzimático para celulase, tanase e polifenoloxidase.

5. Referências Bibliográficas

BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF9. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.41, p. 313-318, 2001.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BRADY, C. et al. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, p. 447 – 460, May 2008.

BRADY, C. et al. A FAFLP system for the improved identification of plant-pathogenic and plant-associated species of the genus *Pantoea*, **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, n. 5, p. 413-417, Jul. 2007.

BRENNER, D.J., et al. Attempts to classify *Herbicola* group-*Enterobacter agglomerans* strains by deoxyribonucleic acid hybridization and phenotypic tests, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 34, n.1, p. 45–55, jan. 1984.

BROWN, C.M; DILWORTH. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacterioids. **Journal of General Microbiology**, London, v. 86, p. 39-48, 1975.

CAMATTI-SARTORI, V.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; RIBEIRO, R.T.S. Desenvolvimento de *Pantoea agglomerans* em diversas temperaturas, pH e concentrações de carboxi-metil-celulose e o seu impacto no controle de *Rosellinia necatrix*, **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n.1, Jan./Feb. 2008.

CAPPUCCINO, J.C.; SHERMAN, N, 1992. **Microbiology: a laboratory manual**. 3rd Edn, Benjamin/cummings Pub. Co., New York, USA, pp: 125-179.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

COELHO, R.S.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; MELO, I.S.; PARMA, M.M; VIEIRA, E.M. Identificação de bactérias degradadoras de fluidos de corte por análise dos ácidos graxos. **Revista ACTA Tecnológica**, v. 6, n. 2, jul-dez. 2011.

COSTA, E. *et al.* Water activity, temperature and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 1082-1088, 2002.

DELÉTOILE, A. *et al.* Phylogeny and Identification of *Pantoea* species and Typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 2, p. 300-310, Feb – 2009.

DE MAAYER, P.; CHAN, W.Y.; BLOM, J.; VENTER, S.N.; DUFFY, B.; SMITS, T.H.M.; COUTINHO, T.A. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. **BMC Genomics**, London, 13: 625,1471-2164, 2012.

FUJIKAWA, H.; AKIMOTO, R. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 172-178, Jan. 2011.

GAVINI, F. *et al.* Taxonomic study of strains belonging or related to the genus *Erwinia*, *herbicola* group, and to the species *Enterobacter agglomerans*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 4, n. 2, p. 218–235, 1983.

GAVINI, F., *et al.* Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 39, n. 3, p. 337-345, Jul. 1989.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F. Genus: *Pantoea*, in: D.J.Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, second ed., Springer, New York, 2005, pp. 713–720.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v.38, n.11,p.199-1616, Jan. 2003,

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, p. 597-607, 1979.

HARKIN, J.M., OBST, J.R. Syringaldazine an affective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**, Basel, v. 29, p. 381-387, 1973.

HOLT, J.G. *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994. .

Indole Reagent Droppers< <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=19394>> Acessado em: 11 de abril de 2012.

KAGEYAMA, B. et al. *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples, **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 42, n. 2, p.203–210, Apr. 1992.

MADHUKAR, B. K.; ARYA K. B.; LISA D. N.; JOHN, A. G. *Pantoea agglomerans* is the etiological agent for black spot necrosis on beach peas. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, n.12, p. 1252-1257, 1996.

MAKOL, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 3, n. 7, p. 181-191, 2008.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov., **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 43, p. 162–173, 1993.

MISHRA, A.; CHAUHAN, P.S.; CHAUDRY, V.; TRIPATHI, M.; NAUTIYAL, C.S. Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, 100, 405– 413, 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*, 5th ed., Elsevier editora, Rio de Janeiro, 2006.

Programa Nacional de Controle de Infecção. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge. Orientações para Elaboração de Um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia, 2004. <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf> Acessado em: 11 de abril de 2012.

RAHMAN, M. et al. Effect of some environmental factors on the growth of *Azospirillum* species isolated from saline soils of Satkhira district, Bangladesh. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 23, p. 145-148, 2006.

ROPER, C.M. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, 12:628–637, 2011.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 279, n. 1, p. 85-89, 2000.

SILINI-CHÉRIF, H.; SILINI, A.; GHOUL, M.; YADAV, S. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 15, n. 6, p. 267-276, 2012.

SMITS, T.H.M.; REZZONICO, F.; KAMBER, T.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; ISHIMARU, C.A.; FREY, J.E.; STOCKWELL V.O.; DUFFY, B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1. **PLoS One**, San Francisco, 6: e22-247, 2011.

SON, H.J.; PARK, G.T.; CHA, M.S.; HEO, M.S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. **Bioresource Technology**, New York, V. 97, n. 2, p. 204–210, Jan. 2006.

SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial α -amylase in industry – a review, **Brazilian Journal of Microbiology**, v 41, p. 850-861, 2010.

SUEN, G. *et al.* An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genet**, San Francisco, 6: e1001129, 2010.

VERDONCK, L. *et al.* Genus *Erwinia*: Numerical analysis of phenotypic features, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 37, n. 1, p. 4–18, Jan. 1987.

CAPÍTULO III

ASSOCIAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAL PESADO COM A MULTI-RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Pantoea* sp. ISOLADA DE EFLUENTE INDUSTRIAL DE LAVANDERIA

Int. J. Environ. Res. Public Health **2014**, *11*, 1-x manuscripts;

doi:10.3390/ijerph110x0000x

Article

Associação da Tolerância a Metal Pesado com a Multi-resistência a Antibióticos em *Pantoea* sp. Isolada de Efluente Industrial de Lavanderia

Leonila Acioly ^{1,*}, Carlos Vilar ^{2,†}, Marcela Leite ^{2,†}, Aline Barbosa da Silveira ^{2,3†}, Aline Nascimento⁴ and Galba Campos-Takaki⁴

¹Doctorate in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco- UFPE, Brazil

²Doctorate Biotechnology, Northeast Biotechnology Network – RENORBIO, Brazil.

³Doctor in Biotechnology, Faculdade Guararapes, Brazil.

⁴Nucleus of Research in Environmental Science (NPCIAMB), 50050590, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:

Leonila.acioly@gmail.com;

Tel.: +1-111-111-111 (ext. 123); Fax: +1-111-111-112.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Bacterial resistance to antibiotics is an emerging public health concern due to the wide availability of antibiotics and their use without proper prescription. The introduction of heavy metals in various forms in the environment may cause considerable changes in the structure and function of microbial communities. In the last decade, several studies reported that bacterial resistance to antibiotics can occur in the environment through multidrug resistance or cross-resistance to metals and co-regulation of antibiotic resistance. The aim of this study was to determine the antimicrobial resistance profile patterns to 15 antibiotics and heavy metals (Zn, Cu and Cd) by bacteria, *Pantoea* sp. The (MIC) of heavy metals was varied 200 µg /mL to 2200 µg /mL. The results showed that bacteria was resistant to metals, considering the MIC values was higher to strain *Escherichia coli* K-12 used as control. The antibiotic sensitivity to *Pantoea* sp demonstrated to fifteen antibiotics and five antibiotics Cefepime, Cefotaxime, Cefpodoxime, Clindamycin, and Amikacin were resistant, and *Pantoea* sp showed sensitivity to other antibiotics, suggesting genetically-determined systems for resistances to toxic heavy metals was observed in *Pantoea* sp. **Keywords:** heavy metal; antibiotics; *Pantoea* sp.

1. Introdução

As bactérias presentes no meio ambiente, tanto aquático quanto em solos, podem ser indígenas ou resultantes da contaminação hospitalar e de esgotos, como fezes humanas e de animais, geralmente introduzidos no ambiente aquático. Água de esgoto

poluído contém grandes quantidades de bactérias patogênicas. Estas bactérias, apresentam várias maneiras de infectar os seres humanos, podendo ser ingeridos, inalados ou em contato com ferimentos [1; 2]. Existe também, diversos antibióticos utilizados em rações animais para promover ganho de peso. Muitos países têm implementado programas de vigilância da resistência e uso dos antimicrobianos, afim de monitorar esses fatores em animais produtores de alimentos [3]. O potencial para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos tem levantado preocupações sociais que levam a intensa investigação da influência dos antibióticos sobre a saúde humana e dos ecossistemas [1;4] Na última década, vários estudos têm relatado que os padrões de resistência a antibióticos estão se tornando um problema global [1; 5].

Estudos têm demonstrado um mecanismo adicional para manter as bactérias resistentes aos antibióticos no meio ambiente através de uma co – resistência ou resistência cruzada a metais ou co-regulação de vias de resistência [6] Portanto, parece provável que a exposição ao metal pode selecionar diretamente as bactérias resistentes aos metais, enquanto co-seleção para as bactérias resistentes aos antibióticos.

Os metais, tais como cobre e zinco e os seus derivados químicos, também têm atividade antimicrobiana [7]. Rações de animais são frequentemente suplementadas com cobre e / ou sais de zinco para a sua atividade de promoção de crescimento. Existe uma preocupação de que a contaminação de metal funciona como um agente selectivo, na proliferação de resistência a antibióticos [8]. Os metais pesados podem ser retornados pelos alimentos, em particular peixe e crustáceos, e esses contaminantes podem ser introduzidos no sistema de aquacultura através da utilização de base de farinha para peixe que pode trazer contaminantes solúveis, tais como metais pesados e bifenilos policlorados [9].

Há três principais estratégias pelas quais os micro-organismos podem desenvolver resistência às drogas: produzindo enzimas que são capazes de inativar o antimicrobiano; evita a chegada da droga ao seu alvo, através de bombas de efluxo ou permeabilidade de membrana e; alteração do alvo molecular ao antimicrobiano [10]. De forma geral, após o micro-organismo desenvolver uma melhor estratégia de resistência, os novos genes que conferem resistência são disseminados entre organismos da mesma espécie ou espécies diferentes através de diferentes estratégias de transferência gênica [11]. As mutações podem se espalhar horizontalmente entre as bactérias por processos como a conjugação ou a transdução. A resistência a drogas frequentemente é carregada

por plasmídeos ou por pequenos segmentos de DNA denominados transposons, os quais podem saltar de um pedaço de DNA para outro. Alguns plasmídeos de resistência, podem ser transferidos entre células bacterianas em uma mesma população e entre populações bacterianas diferentes, porém proximadamente relacionadas [12].

A resistência aos agentes antimicrobianos, incluindo metais pesados, é importante para a sobrevivência das bactérias em ambientes contaminados. Os genes de resistência são trocadas entre as bactérias que vivem em áreas contaminadas por metais pesados. Portanto, pode concluir-se que a pressão selectiva natural imposto por metais pesados pode, indiretamente, desenvolver a resistência aos antibióticos [13].

Este trabalho, tem como objetivo determinar o perfil de resistência de *Pantoea* sp. a antibióticos e metais pesados a fim de investigar a relação de resistência a antimicrobianos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Identificação do Micro-organismo

A bactéria isolada foi caracterizada pelas características fenotípicas, bioquímicas e coloração Gram, oxidase e catalase, motilidade, reações de glicose e testes de liquefação de gelatina [14].

2.2 Teste de Susceptibilidade Antibacteriana

Os testes de susceptibilidade antibacteriana foi realizado por difusão em ágar [15] utilizando meio Müeller-Hinton (Difco). Durante a realização dos testes, o isolado bacteriano foi inoculado em meio LB (Tryptona, 10g; Extrato de Levedura, 5g; NaCl, 19g; 1000mL água destilada) a 30°C por 24h, respeitando a turbidez da escala 0,5 de MacFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Suabe estéril foi embebido na cultura, retirando-se o excesso de Líquido, e semeados uniformemente em placas contendo ágar Müeller-Hinton. Os discos antimicrobianos foram depositados de forma equidistante sobre a superfície do meio inoculado. Um total de 15 discos de antibióticos, pertencentes a 9 classes diferentes, foram utilizados neste estudo, incluindo Ertapenem (ETP, 10µg), Oxacilina (OXA, 1µg), Cefotaxime (CFX, 5µg), Cefepime (CPM, 30µg), Cefpodoxime (CPD, 10µg), Vacomicina (VA, 30µg), Cloranfenicol (CLO, 30µg),

Tobramicina (TOB, 10µg), Gentamicina (GEN, 10µg), Amicacina (AMI, 30µg), Eritromicina (ERI, 15µg), Ácido Nalidixico (NAL, 30µg), Ciproflaxina (CIP, 5µg), Tigeciclina (TGC, 15µg) e Clindamicina (CLI, 2µg). As placas foram incubadas a 37°C por 24h e, após este período, os halos de inibição foram medidos pelo diâmetro da zona de inibição em torno dos discos, os quais foram medidos em milímetros (mm) e caracterizados como sensíveis (S), intermediário (I) e de resistência (R) de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute/2007*. As cepas controles foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.3 Teste de Concentração Mínima Inibitória de Metais (MIC)

Os testes de concentração mínima inibitória em metais pesados (MIC) foram conduzidos utilizando a metodologia de Akinbowale [3]. O inóculo foi preparado como acima descrito e utilizados para os teste de diluição em Ágar Müller-Hinton contendo diferentes concentrações de Cd^{2+} , Cu^{2+} , e Zn^{2+} na forma dos sais de Cloreto de Cadmio, Sulfato de Cobre e Sulfato de Zinco, respectivamente. As soluções estoques dos metais foram feitos em água destilada e esterelizadas por filtro de seringa de 0,22 µm para frascos de vidro estéreis e armazenadas à temperatura ambiente. As diluições em meio Ágar Müller-Hinton seguiram as concentrações de 200 µg /mL a 2200 µg /mL de cada metal. As placas foram incubadas com 10 µL do inóculo a 30°C por 24h. As amostras foram consideradas resistentes quando os valores de MIC excederam as do organismo de controle, *Escherichia coli* K-12, descrito por Akinbowale *et al.* [3] e Ansari e Malik [16].

3. Resultados e Discussão

O gênero *Pantoea* pertence à família *Enterobacteriaceae* e atualmente compreende dezenove espécies de bactérias Gram-negativas, que apresenta pigmentação amarela ou bege e mobilidade. Os membros deste gênero têm sido isolados a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo solo, água, poeira, produtos lácteos, carne, peixe, insetos, seres humanos e animais. Na maioria das vezes eles são encontrados associados a uma ampla variedade de plantas

hospedeiras, como endófitos não patogênicos ou epífitos, colonizando as folhas, caules e raízes [12].

A bactéria cresceu em ágar nutriente (AN) por 24h á 30°C. As colônias obtidas apresentaram as seguintes características macroscópicas: colônias circular, lisa, bordas irregulares e planas, com 1mm de diâmetro e pigmento amarelo. O exame microscópico revelou ser um bacilo, Gram-negativo com extremidades arredondadas. Foram apresentadas isoladas ou em pares. É móvel, catalase+, anaeróbia facultativa, não fermenta glicose. Resultados estes, que corroboram com os encontrados por Silini-Cherif e colaboradores [17] na identificação de uma linhagem de *Pantoea agglomerans* Ima2 isolada de rizosfera de trigo. Fujikawa e Akimoto [18] também mostram resultados semelhantes para *Pantoea agglomerans*. Ambos os trabalhos apresentam produção de pigmento amarelo pelos micro-organismos. Característica comum também às linhagens de *P. ananatis*, *P. dispersa* e *P. stewartii* [19].

Os resultados de susceptibilidade a antibióticos mostrou que a *Pantoea sp* foi sensível a maioria dos antibióticos, e intermediário a ertapenem e eritromicina e foi resistente aos três antibióticos testados da classe das cefalosporinas (cefotaxima, cefepime, cefpodoxime), um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos (amicacina) e uma lincosamida (clindamicina) (Tabela 1). Nos testes de tolerância a metais pesados, *Pantoea sp.* mostrou resistência aos três metais testados Cu>Zn>Cd (Tabela 2). Nath e colaboradores [20], apresentaram resultados, onde antibióticos dos grupos de cefalosporinas e aminoglicosídeos, foram ineficientes no controle de isolados bacterianos dos gêneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Bacillus*, resistentes a zinco, cobre e chumbo. Akimbowale *et al.* [3] ao isolarem cepas de *Pseudomonas* e *Aeromonas* verificaram que estes, também eram resistentes a fármacos do grupo das cefalosporinas, apresentando, também, semelhanças na resistência a metais. Sharma *et al.*[21] ao analisarem um caso de artrite séptica causada por *Pantoea agglomerans* observaram que essa espécie não respondia ao tratamento com amicacina, gentamicina, cotrimoxazol, ciprofloxacina, tobramicina, ampicilina e ceftamizine.

Tabela 1. Suscetibilidade de *Pantoea* sp. a antibióticos.

Classes	Antibióticos	Con. disco	R	I	S	(Halos)
Penicilinas	Penicilina	10µl	≤ 28	-	≥ 29	30 mm (S)
	Ertapenem	10µl	≤ 15	16-18	≥ 19	17 mm (I)
	Oxacilina	1µl	≤ 10	11-12	≥ 13	18 mm (S)
Quinolonas	Ác. Nalidixco	30µl	≤ 13	14-18	≥ 19	24 mm (S)
	Ciproflaxina	5µl	≤ 15	16-20	≥ 17	30 mm (S)
Cefalosporinas	Cefotaxima	5µl	≤ 14	15-17	≥ 18	(R)
	Cefepime	30µl	≤ 14	15-17	≥ 18	(R)
	Cefpodoxime	10µl	≤ 17	18-20	≥ 21	(R)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10µl	≤ 12	13-14	≥ 15	24 mm (S)
	Tobramicina	10µl	≤ 12	13-14	≥ 15	20 mm (S)
	Amicacina	30µl	≤ 12	15-16	≥ 17	(R)
Glicopeptídeos	Vacomina	30µl	≤ 14	15-16	≥ 17	20 mm (S)
Glicilciclina	Tigeciclina	15µl	≤ 19	20-27	≥ 28	30 mm (S)
Macrolidos	Eritromicina	15µl	≤ 13	14-22	≥ 23	15 mm (I)
Anfenicol	Cloranfenicol	30µl	≤ 12	13-17	≥ 18	24 mm (S)
Lincosamidas	Clindamicina	2µl	≤ 14	15-20	≥ 21	(R)

Referencia: (CLSI, 2006). R- resistente; I- intermediário; S- sensível

Tabela 2. Resistência de *Pantoea sp* a metais

Metal Pesado	MIC (µg/mL) <i>Pantoea sp</i> .							
	100	200	400	600	800	1200	1600	2200
Cádmio	a		MIC					
Zinco		a			MIC			
Cobre		a						MIC

Referências: MIC, Concentração Mínima Inibitória. (a) MIC da linhagem *Escherichia coli* K12 [3].

A resistência de espécies de *Enterobactérias* a uma largo espectro de cefalosporinas já é conhecida, e por ser mediada por uma hiperprodução cromossômica de *AmpC* β -lactamases [22]. Essas enzima são normalmente codificados no cromossomo de bactérias Gram-negativas, incluindo *Citrobacter*, *Serratia* e espécies de *Enterobactérias* em que a sua expressão é indutível normalmente, mas também podem ocorrer em *Escherichia coli*. No entanto, *AmpC* β -lactamases podem também ser transportados em plasmídeos [23]. A seleção de determinantes de resistência no ambiente poderia ocorrer mesmo na ausência do antimicrobiano. Muitos determinantes de múltipla resistência são capazes de conferir simultaneamente resistência a compostos pertencentes a várias classes de compostos químicos, como detergentes e antissépticos [24]. Outros estudos demonstram que a seleção de determinantes de resistência aos antimicrobianos poderia ocorrer por meio de poluição por metais pesados e químicos [25]. Logo, a seleção de bactérias resistentes poderia ocorrer através da seleção de resistência a compostos que não sejam antimicrobianos, mas que selecionam com o mesmo mecanismo de resistência [24].

Os vários nichos ecológicos ocupados por espécies de *Pantoea*, incluindo hospedeiros vegetais e animais, e seus estilos de vida distintos como epífitos e endófitos, são indicativos da diversificação dentro do gênero *Pantoea* e mesmo entre cepas individuais pertencentes às diversas espécies do gênero. Um meio pelo qual esta diversificação acontece é exatamente através da aquisição de plasmídios entre bactérias. Estes plasmídeos carregam genes que conferem vários fenótipos na bactéria, incluindo produção de toxina, a produção de hormônios e fatores de virulência que contribuem para a patogênese e especificidade de hospedeiro, a resistência aos antibióticos e metais pesados e sobrevivência em condições adversas, o catabolismo de aminoácidos e ácidos

orgânicos, carboidratos e íons inorgânicos, a colonização e disseminação dessas espécies [12].

4. Conclusões

- A linhagem de *Pantoea* sp. apresentou resistência aos antibióticos cefotaxima, cefepime e cefpodoxime do grupo das cefalosporinas. Do grupo dos aminoglicosídeos apresentou resistência para amicacina e clidaicina do grupo das lincosamidas;
- Nos testes de tolerância a metais pesados, *Pantoea* sp. mostrou resistência aos três metais testados Cu>Zn>Cd.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Facepe (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

5. Referências

1. MATYAR, F. Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria Isolated from the Eastern Mediterranean Sea Coast. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 2012, 89, 551–556.
2. SCHLUSENER, M.P.; BESTER, K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*, 2006, 143, 565–571.
3. AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 3, 177-182.
4. KIM, K.R.; OWENS, G.; KWON, S.I. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, air & soil pollution*, 2011, 214, 163–174.
5. STACHOWIAK, M.; CLARK, S.E.; TEMPLIN, R.E.; BAKER, K.H. Tetracycline-resistant *Escherichia coli* in a small stream receiving fish hatchery effluent. *Water, air & soil pollution*, 2010, 211, 251–259.
6. STEPANAUSKAS, R.; GLENN, T.C.; JAGOE, C.H.; TUCKFIELD, R.C.; LINDELL, A.H.; MCARTHUR, J.V. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environmental science & technology*, 2005, 39, 3671–3678.

7. ANTUNES, W.M., LUNA, A.S., HENRIQUES, C.A., DA COSTA, A.C.A. An evaluation of copper biosorption by a brown seaweed under optimized conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2003, 6, 6174–184.
8. BAKER-AUSTIN C, WRIGHT MS, STEPANAUSKAS R, MCARTHUR JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 2006, 14, 176-182.
9. ERICKSON, B.E. More than just dioxins in food. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36, 267A–8A.
10. DE OLIVEIRA, D.V. (2011). *Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas de arroio Dilúvio*. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS. Porto Alegre.
11. SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G.S.; HALDORSEN, B.C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S. LITTAUER, P.; DAHL, K.H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS: Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica*, 2004, 112, 815-837.
12. DE MAAYER, P.; CHAN, W.Y.; BLOM, J.; VENTER, S.N.; DUFFY, B.; SMITS, T.H.M.; COUTINHO, T.A. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. *BMC Genomics*, London, v.13, n. 625, p.1471-2164, 2012.
13. FARD, R.M.N.; HEUZENROEDER, M.W.; BARTON, M.D. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal *enterococci* isolated from pigs. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148, 276-282.
14. LEMOS, J. B., RODRIGUES, M.A E., LOPES, J. P., diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia – *Veterinária Brasileira Engenharia de Pesca*, v. 1, n.1 ago. 2006
15. BAUER, W.A.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 1996, 45, 493-496.
16. ANSARI, M.I.; MALIK, A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource technology*, 2007, 98, 3149–3153.
17. SILINI-CHÉRIF, H.; SILINI, A.; GHOU, M.; YADAV, S. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2012, 15, 267-276.

18. FUJIKAWA, H.; AKIMOTO, R. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77, 172-178.
19. DELÉTOILE, A. *et al.* Phylogeny and Identification of *Pantoea* species and Typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47, 300-310.
20. NATH, S; DEB, B.; SHARMA, I.; PANDEY, P. Isolation and characterization of heavy metal resistant bacteria and its effect on shoot growth of *Oryza sativa* inoculated in industrial soil. *Annals of Plants Sciences*, v.2, n.6, 2013.
21. SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 279, n. 1, p. 85-89, 2000.
22. AIBINU, I.; PFEIFER, Y.; PETERS, F.; OGUNSOLA, F.; ADENIPEKUN, E.; ODUGBEMI, T.; KOENIG, W. Emergence of blaCTX-M-15, qnrB1 and aac(69)-Ib-cr resistance genes in *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cloacae* from Nigeria (sub-Saharan Africa). *JMM Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61, 165-167.
23. PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A. Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46, 1-11.
24. ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 2001, 3, 1-9.
25. CANAL, N. (2009). **Caracterização de resistencia a antimicrobianos e diversidade genética de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água de lagoa de Patos, RS.** Dissertação de mestrado no Programa de Pós-graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS. Porto Alegre.

Reference list: We recommend the use of reference management software to prepare the references list (e.g., Endnote, <http://www.mdpi.com/files/word-templates/MDPI.ens>).

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

CAPÍTULO IV

BIORREMOÇÃO DE CÁDMIO POR BIOMASSA DE *Pantoea sp.*

Biorremocão de Cádmio por Biomassa de *Pantoea sp*.

Leonila M. L. Acioly^{1,3}, Grayce K. Barbosa^{1,3}; Marcus A. Luna^{2,3}; Patrícia M. de Souza³; Aline E. Nascimento³, Camilo E. La Rotta Hernandez³, and Galba M. Campos-Takaki^{3*}

¹Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

² Doutorate Biotecnologia, Rede Nordeste de Bioecnologia-RENORBIO, UNICAP-UFRPR, Recife- PE, Brazil

³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Unversidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Resumo

Neste estudo foi utilizado uma linhagem de *Pantoea sp.*, isolada do resíduo de indústria de lavanderia de Pernambuco. A bactéria foi usada para remoção do metal pesado Cádmio em solução. Foi utilizada a biomassa viva e inativada por autoclavação. Para o processo de remoção de cádmio as biomassa foram submetidas a diferentes condições de temperatura (25 e 35°C), pHs (3.0, 5.0 e 7.0), tempo (1, 6 e 24 horas) e concentrações do metal cádmio (1, 10 e 100ppm), a concentração de biomassa foi mantida constante em 100mg, assim como a agitação de 150rpm, para todos os experimentos. Os resultados demosntrarm que a temperatura não influenciou na absorção do metal pela biomassa bacteriana viva e inativa. No entanto, o pH alcalino apresentou resultados positivos para remoção do metal em baixas concentrações de cádmio (10ppm). As baixas concentrações de cádmio (1 e 10ppm) foram removidas completamnte pelas biomassas vivas e inativas de *Pantoea sp*. A bactéria estudada, apresentou ótimo desempenho biotecnológico na remoção de cádmio em solução.

Keywords: *Pantoea agglomerans*; pollution, cadmium, metal resistance; biosorption bioaccumulation;.

*Corresponding author: G.M.C.T E. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Unversidade Católica de Pernambuco 50050-590 Recife, PE, Brazil. E. mail: galba_takaki@yahoo.com.br

1. Introdução

Diversas atividades antrópicas, têm levado ao aumento dos teores de metais pesados no ambiente. O enigma para os cientistas é como enfrentar estes contaminantes que põem em risco a saúde ambiental. O avanço paralelo da ciência e tecnologia à revolução industrial permitiu a exploração dos recursos naturais na tentativa de minimizar os efeitos degradadores dos poluentes ao meio ambiente. Em outras palavras, a biorremediação é uma alternativa que oferece a possibilidade de destruir ou tornar inofensivos vários contaminantes, incluindo metais pesados que utilizam a atividade biológica natural. Como tal, ela utiliza técnicas de custo relativamente baixo, que geralmente, têm uma alta aceitação do público e muitas vezes podem ser realizadas no local. Comparado a outros métodos, a biorremediação é uma maneira mais promissora e menos dispendiosa para limpar solos contaminados e água. Utilizando agentes biológicos, principalmente micro-organismos (KUMAR *et al.*, 2011; AHMED, 2012).

A presença de metais pesados, como o cádmio, cromo, chumbo, zinco, cobre e mercúrio no ambiente constitui uma ameaça, tendo em vista a sua tendência de bioacumulação e toxicidade nos organismos vivos. Assim, a remoção destes metais pesados do meio ambiente é sem dúvida, de primordial importância (BHATNAGAR *et al.*, 2010; MANASI *et al.*, 2014). O cádmio é um metal pesado perigoso e de difícil degradação, sendo conhecido devido a habilidade de se ligar às enzimas essenciais respiratórias que levam ao estresse oxidativo e câncer (KERMANI *et al.*, 2010; MANASI *et al.*, 2014). Também é amplamente utilizado para revestimento de materiais, em pigmento de tintas, na indústria de cigarros, e principalmente, na indústria plástica, podendo ser adicionado ao solo por meio do descarte urbano ou industrial, lodo de esgoto e fertilizantes fosfatados, onde a mobilidade do cádmio no solo é determinada pela intensidade de adsorção, e ainda, nos corpos d'água por meio de estações de tratamento de águas residuárias. Além disso, é facilmente absorvido e translocado nas plantas podendo entrar na cadeia alimentar em animais e humana, causando sérios problemas de saúde, como anemia, hipertensão, enfisema pulmonar, disfunções gástrica e intestinal (DIAS *et al.*, 2001).

O uso potencial de micro-organismos resistentes a metais no tratamento de águas residuais tornou-se importante. Diferentes tipos de biomassa, tais como bactérias,

fungos e algas, foram estudados por diversos autores, com o objetivo de identificar sistemas biológicos eficientes na remoção de metais pesados (KERMANI *et al.*, 2010; FOMINA; GADD, 2014). Os micro-organismos usam diferentes processos de transformação e de imobilização, onde um deles é o processo de bioacumulação, baseado na incorporação de metais no interior da biomassa viva. Outro processo é o de biossorção, em que os íons metálicos permanecem na superfície celular por diferentes mecanismos (CHOJNACKA, 2010). Esses métodos apresentam vantagens quanto aos custos de funcionamento, a minimização do volume de resíduo químico e / ou biológico a ser descartado, a alta eficiência na desintoxicação do efluente devido a diluição, não sendo necessário requisitos de nutrientes. O processo de remoção é rápido e eficiente, e realiza-se em condições normais de temperatura (KADUKOVÁ; VIRCÍKOVA, 2005).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de *Pantoea sp.* no processo de biossorção e bioacumulação de cádmio em meio aquoso, empregando o método de voltametria anódica para avaliar o conteúdo de cádmio por ser uma metodologia eficiente e menos onerosa.

2. Materiais e Métodos

2.1. Micro-organismo

No presente estudo foi utilizado a bactéria *Pantoea sp.* foi isolada de efluente de lavanderia industrial, sendo depositada na Coleção de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco). A “coleção está registrada no World Federation for Culture Collection – WFCC”. A linhagem foi mantida em meio Ágar Nutriente (AN), a temperatura de 5°C, sendo transferida para um novo meio a cada quatro meses.

2.2. Reagentes

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. O ácido clorídrico, o hidróxido de sódio, o cloreto de sódio e o cloreto de cádmio foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Vetec (São Paulo, Brasil). Todas as soluções usadas nos ensaios para remoção de

Cádmio com as biomassas inativas e viáveis foram preparadas com NaCl (0,9%) utilizando como diluente água Mili-Q.

2.3. Preparação da Biomassa Bacteriana

A linhagem bacteriana de *P. agglomerans* foi cultivada em placas de Petri contendo àgar Luria-Bertani (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 1% glicose, 1,7% de ágar) sem metais, durante a noite a 30°C. As colônias foram removidas e suspensas em solução salina 0,9 %, lavadas duas vezes com a mesma solução e obtidas por centrifugação a 10.000g por 20min, a 10°C, e em seguida, liofilizada (HERNANDEZ *et al.*, 1998). O procedimento para obtenção das células inativadas foi submeter a biomassa ao processo de autoclavagem (121°C) por 15 min. (CHANG *et al.*, 1997). Após resfriamento foi submetida ao processo de secagem por liofilização, permanecendo em seguida em dessecador até peso constante.

2.2. Experimentos de Biossorção e Bioacumulação

Os estudos de bioadsorção e bioacumulação, foram realizados utilizando frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de solução metálica de cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), em seguida foi adicionado de 100mg da biomassa autoclavada e liofilizada nas soluções de concentrações iniciais (C_0) de 1, 10 e 100ppm de Cd^{2+} , tendo como diluente uma solução 0,9% de NaCl. Para cada concentração foram determinados pH de 3,0, 5,0 e 7,0, usando soluções de HCl (0,1M) e NaOH (0,1M). Também foram utilizadas duas temperaturas diferentes, 25 e 35°C. Os ensaios foram realizados com agitação de 150rpm por 24h, foram retiradas amostras de 1, 6 e 24h. Cada amostra retirada foi centrifugada a 9.000 rpm por 20min, para determinação do teor de cádmio no sobrenadante. O mesmo protocolo foi utilizado para os experimentos de bioacumulação pela biomassa viva e após as 24horas de contato com as concentrações de metais foram verificados a viabilidade celular pela técnica de pour-plate. Todos os ensaios de biossorção foram realizados em duplicata.

A solução contendo Cd residual foi analisada por voltimetria de redissolução anódica (VRA) e voltimetria de onda quadrada (VOQ). A remoção percentual foi determinada através da equação 1:

$$\text{Remoção (\%)} = (C_o - C_f / C_o) * 100$$

Onde C_o corresponde à concentração inicial de Cd^{2+} e C_f a concentração final, após o processo de sorção.

3.Resultados e Discussão

3.1 Bio sorção de cádmio com células vivas de *Pantoea sp*.

Os resultados obtidos com o processo de bio sorção de cádmio no curso de tempo (1, 6 e 24h) para ocorrer o fenômeno de absorção pelas células vivas estão mostrados na figura 1- A, B e C e na Figura 2- A, B e C.

Observou-se que, a temperatura teve pouca influência na absorção de cádmio pela biomassa viva. Nas concentrações do metal de 10 ppm, em ambas as temperaturas (25 e 35°C) houve remoção de 100% dos íons de metal para todos os pHs testados (3.0, 5.0 e 7.0) (Figura 1- A, B e C). Ao aumentar a concentração do metal para 100ppm, com a mesma concentração de Bio sorvente (100mg), a temperatura, também, não determinou influência nos resultados. No entanto, houve dessorção em todas as condições à medida que o tempo de contato aumentava (Figura 2 – A, B e C).

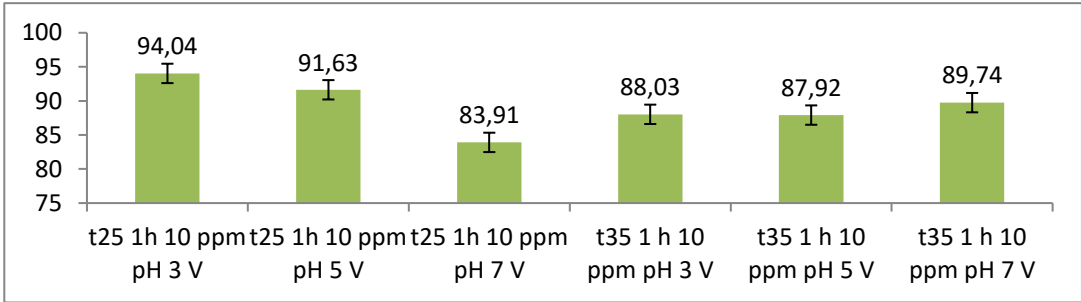
As células vivas de *Pantoea sp*. nas condições de concentrações de 10ppm de cadmio, à 25°C teve um aumento na absorção, sendo proporcional ao tempo de contato e ao aumento de alcalinidade do pH (Figura 1- A, B e C).. Já quando submetidas à temperatura de 35°C o percentual de absorção se manteve constante nos pHs de 3.0 e 5.0 e diminuiu 2% com o pH 7.0 (Figura 1- A, B e C).. Entretanto, aumentou a absorção com o tempo de contato chegando a absorver 100% dos íons de metais, igualmente à temperatura de 25°C.

Nas concentrações de metal de 100ppm (Figura 2 – A, B e C), em ambas temperaturas houve dessorção de íons metálicos com o aumento do tempo de contato e

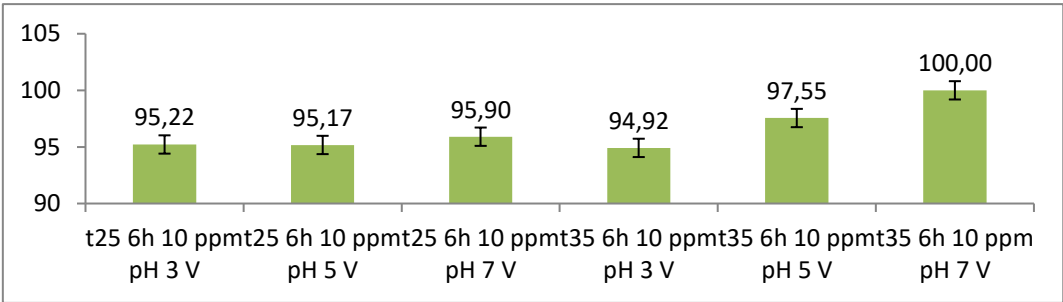
em todos os pHs testados e o poder de absorção não chegou a 50% de remoção dos íons de cádmio.

Figura 1. Histograma apresentando a bioabsorção do cádmio pela biomassa viva (10ppm) de *Pantoea* sp. nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C).

A- 10ppm, 1h de exposição, 25 e 35°C.



B-10ppm, 6h de exposição, 25 e 35°C.



C-10ppm, 24h de exposição, 25 e 35°C.

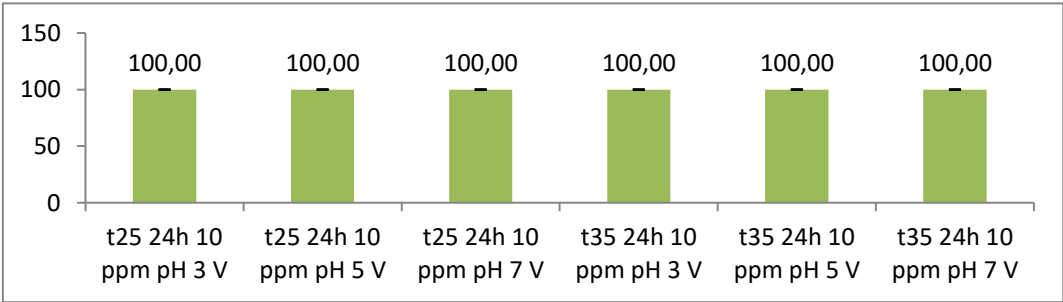
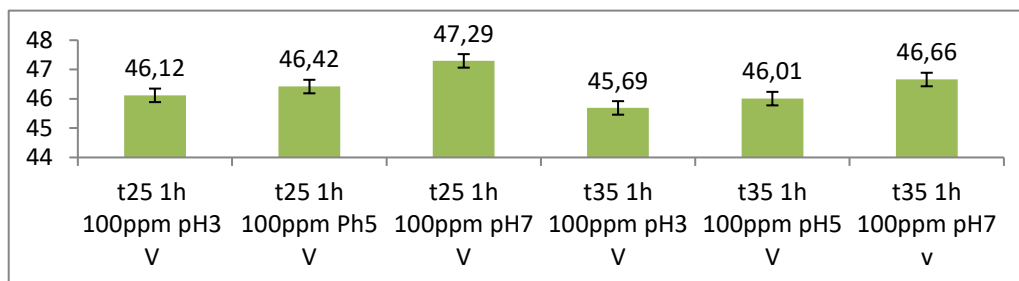
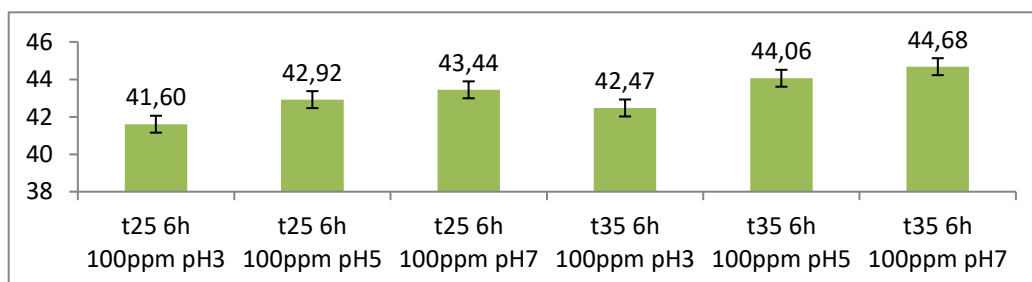


Figura 2. Histograma apresentando a bioissorção do cádmio pela biomassa viva (100ppm) de *Pantoea sp.* nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C).

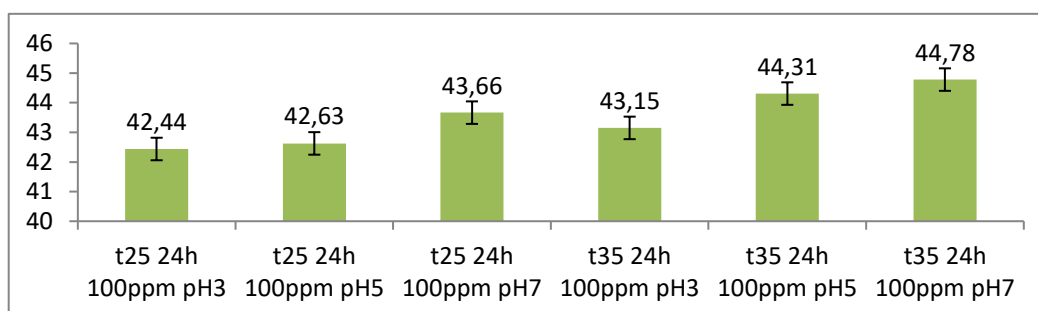
A- 100 ppm, 1hora de exposição, 25 e 35°C.



B- 100 ppm, 6horas de exposição, 25 e 35°C.



C- 100 ppm, 24horas de exposição, 25 e 35°C.



3.2 Bioadsorção do cádmio utilizando células de *Pantoea sp.* inativadas.

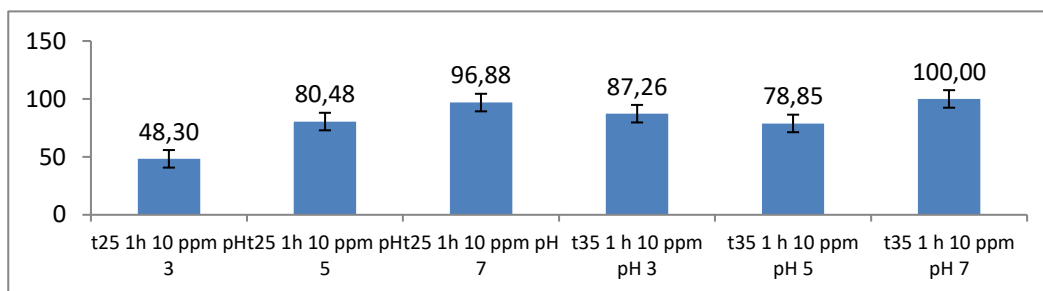
As células inativas na remoção de metal cádmio apresentaram melhores resultados, quando comparados com as células vivas. As células inativas, em contato com a solução de metal cádmio a 10ppm e 25°C com diferentes pHs (3.0, 5.0 e 7.0) apresentaram resultados interessantes. Quando em pH 3.0, na primeira hora de contato houve uma adsorção de 48,3%, seguindo uma dessorção de 41,26% depois de 6 horas de contato e voltando a adsorver o metal após 18 horas de contato, porém com um percentual de apenas 6% (Figura 3 – A, B e C). Mantendo as mesmas condições e aumentando o pH da solução pra 5.0, houve uma adsorção do metal pelo biosorvente de 80,48% na primeira hora para 98,48% até as 24 horas de contato total, sem ciclos de dessorção (Figura 3 – A, B e C). Entretanto, com o pH 7.0 o ciclo de dessorção volta a se repetir, com 96,88% de adsorção na primeira hora de contato, havendo uma dessorção de 8% desse metal, no período de 6 horas e voltando a adsorver 11% do metal restante na solução após 18 horas de contato, completando o ciclo de 24 horas do experimento com uma adsorção total de 100% (Figura 3 – A, B e C).

Mantendo as células inativas em contato com a solução de cádmio a 10ppm na temperatura de 35°C, nos tempos de 1, 6 e 24 horas, houve uma melhora nos resultados apresentados pelo experimento. Nos pH de 3.0 e 5.0 as células adsorveram completamente o metal depois 6 horas de contato, sem ciclos de dessorção até 24 horas (Figura 3 – A, B e C). Com o pH 7.0 a adsorção completa do metal já aconteceu na primeira hora de contato e manteve-se constante até o final das 24 horas de contato (Figura 3 – A, B e C)..

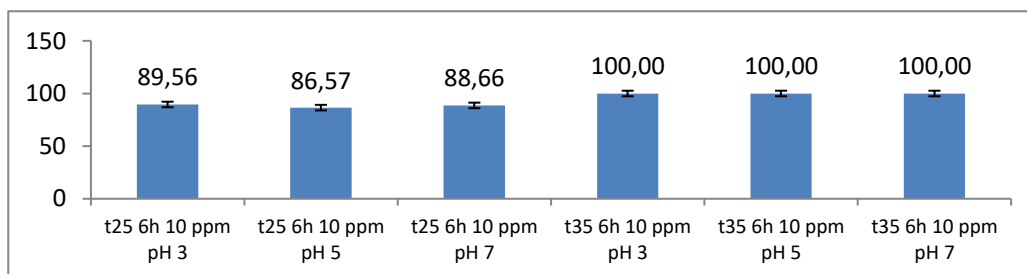
O tempo e o pH foram importantes na adsorção do metal pelas células inativas e a temperatura não parece ter influenciado tanto nos resultados, já que em ambas as condições de temperaturas, obtivemos resultados positivos de adsorção de 100% dos íons de cádmio da solução.

Figura3. Histograma apresentando a biossorção do cádmio (10ppm) pela biomassa inativada (100mg) de *Pantoea sp.* nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C) de contato.

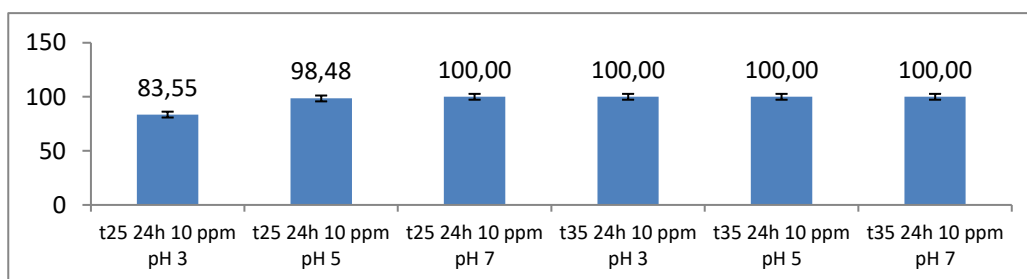
A-10ppm, 1h de exposição, 25 e 35°C.



B-10ppm, 6h de exposição, 25 e 35°C.



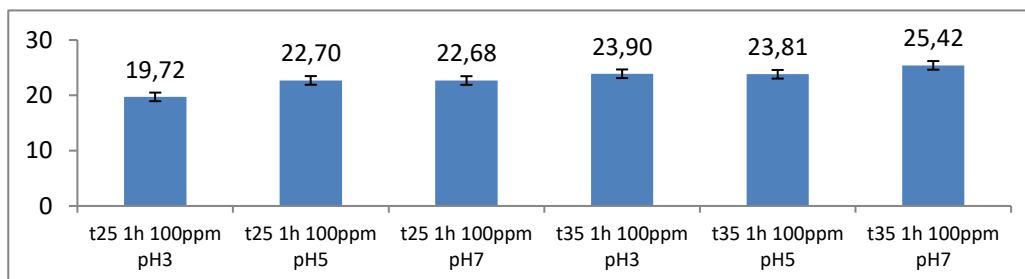
C-10ppm, 24h de exposição, 25 e 35°C.



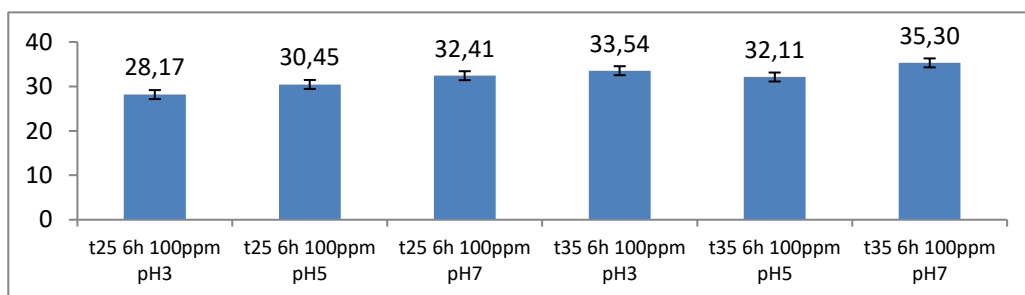
Quando submetidas às células inativas (100mg) a uma maior concentração de metal (100ppm) e temperatura de 25°C, houve uma maior adsorção de cádmio, 17% com o pH ácido, e esse percentual vai diminuindo a medida que o pH aumenta, 15% e 14% para 5.0 e 7.0 respectivamente (Figura 4 – A, B e C). Com a temperatura de 35°C, os resultados são semelhantes, há um aumento de adsorção com o pH de 3.0, de uma hora a 24 horas de contato, 15% de adsorção. A medida que o pH aumenta essa adsorção diminui ao longo do tempo de exposição de contato, 14 e 12% para os pHs 5.0 e 7.0, respectivamente (Figura 4 – A, B e C).

Figura 4. Histograma apresentando a bioabsorção do cádmio (100ppm) pela biomassa inativada (100mg) de *Pantoea* sp. nas temperaturas de 25 e 35°C, nos tempos de 1h(A) , 6h (B) e 24h(C) de contato.

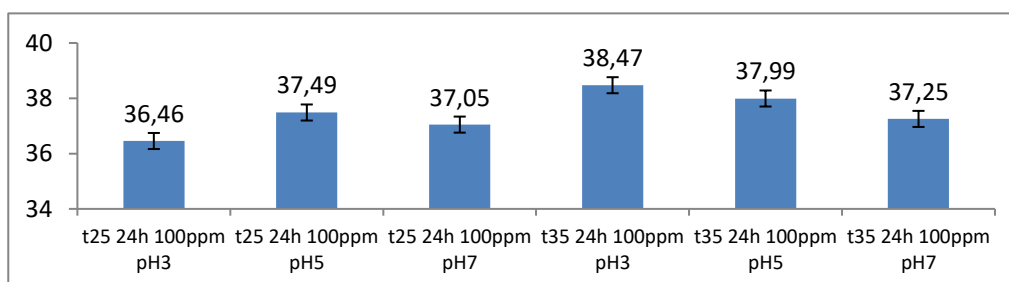
A-100ppm, 1h de exposição, 25 e 35°C.



B-100ppm, 6h de exposição, 25 e 35°C.



C-100ppm, 24h de exposição, 25 e 35°C.



As bactérias são conhecidas pela alta capacidade de acumulação de metais, devido a sua pequena dimensão, a sua ubiquidade, e capacidade de crescer em condições controladas, além da de sua resistência a uma vasta gama de condições ambientais (VIJAYARAGHAVAN; YUN, 2008).

A parede celular é o primeiro componente que entra em contato com os íons metálicos, onde os solutos podem ser depositados sobre a superfície ou no interior da estrutura da parede celular (CHEN, 2009). Uma vez que o modo de absorção de solutos

por células inativas é extracelular, os grupos químicos funcionais da parede celular desempenham um papel vital na bioadsorção. O aumento do pH, aumenta a carga negativa dos grupos funcionais da parede celular, desprotonando-os, e favorecendo a atração eletroquímica e adsorção de cátions (KANG *et al.*, 2007). Fato este, demonstrado pelos resultados pelas células inativas de *Pantoea sp.* na adsorção de cádmio, nas concentrações de 10 e 100ppm (Figuras 3 e 4).

A eficiência da bioacumulação de metal por organismos vivos depende das condições do meio de cultura, estado fisiológico ou idade do organismo. Por exemplo, Mapolelo e Torto (2004) relataram que o pré-tratamento da *S. cerevisiae*, utilizando 10-20 mmolL⁻¹ de glicose aumentou a remoção de 30 a 40% para o Cd²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺. Stoll e Duncan (1996) investigaram a absorção de Cu²⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ a partir de efluente de galvanoplastia por células vivas de *S. cerevisiae*. Os resultados mostraram que o pré-tratamento das células de levedura com glicose aumentou a quantidade de metal removido, enquanto que a adição direta de glicose na solução de efluente-levedura não teve nenhum efeito sobre a quantidade de metal retido. Talvez, o crescimento de *Pantoea sp* em LB+1% de glicose co-catabolizado a capacidade de remoção do Cd²⁺ pelas células vivas e mortas da bactéria (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de variância (ppm/h) na remoção de Cd²⁺ apresentado pelas biomassas inativas e vivas nas concentrações de 10 e 100ppm e temperaturas de 25 e 35°C nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tempo de contato e pH, 3,0, 5,0 e 7,0.

pH	Temp °C	Co = Cd[ppm]	VR (ppm/h) Células Mortas	VR (ppm/h) Células Vivas
3,0	25	10	1,667	5,2311
3,0	25	100	4,7525	1,4831
3,0	35	10	1,6092	5,9894
3,0	35	100	5,7016	6,215
5,0	25	10	1,3406	1,4639
5,0	25	100	5,0678	1,5469
5,0	35	10	1,3522	6,2762
5,0	35	100	5,3781	6,5509
7,0	25	10	1,5251	1,5357
7,0	25	100	5,5431	1,5917
7,0	35	10	1,5193	6,3245
7,0	35	100	6,0322	6,638

A tabela 1 apresenta o resultado da variância, quando submetidos a concentrações de metais de 10 e 100 ppm em diferentes pHs, temperatura e tempo de exposição no processo de bioadsorção pelas células viva e inativada de *Pantoea sp*.

Em baixas concentrações do metal (10ppm) a biomassa inativa apresentou melhores valores, com pH baixo, na temperatura de 35°C. Em concentrações mais elevadas do metal (100ppm) o poder de remoção das bactérias inativas é melhor nas condições de pH 7,0 e temperatura de 35°C. Há inconsistência na literatura sobre a influência do pH na bioadsorção parece indicar que o pH alteraria a adsorção de íons metálicos na biomassa e varia de acordo com pH ótimo de adsorventes (biomassa) e também o tipo de adsorbatos (íons metálicos) (PARK *et al.* 2010) .

Quando avaliada a melhor condição para remoção com a utilização da biomassa viva os resultados de variância mostraram que para baixas e altas concentrações do metal a biomassa apresentava melhor comportamento de bioadsorção nas condições de pH 7.0 a 35°C (Tabela 1).

O pH ótimo para a adsorção de Cd foi de 6,5 para *Saccharomyces cerevisiae* como o bioadsorvente (BRADY; DUNCAN, 1994). Para a bioadsorção de Cd por fungo filamentoso, a capacidade máxima ocorreu a pH 8,0 (KIFF; LITTLE, 1986). No presente estudo, utilizando a linhagem de *Pantoea sp*. o efeito do pH sobre a capacidade de adsorção de Cd, mostra que tanto as células vivas quanto as inativas foram capazes de remover o metal, com o pH baixo de pH 3,0, ao passo que, quando o valor de pH foi aumentado 3,0-7,0, a capacidade de adsorção foi melhorada em células inativas. Valores para células vivas foram quase que constantes em todos os pHs utilizados, porém com um leve aumento quando usado o pH 7.0. Portanto, a variação do pH não influenciou muito na remoção de Cd^{2+} , pela *Pantoea sp*.. O pH do meio pode afetar a solubilidade dos metais e o estado de ionização de grupos funcionais como os grupos carboxilato, fosfato e aminoácidos da parede celular. Os grupos carboxilato e fosfato transportam cargas negativas permitindo a parede celular tornarem-se potentes carreadores de cátions (OZDEMIR *et al.* 2004) .

Ozdemir e colaboradores (2004) usando biomassa inativa de uma linhagem de *Pantoea* na remoção de cádmio verificou que o pH ótimo de remoção foi de 6.0. Células inativas de *Ochrobactrum anthropi* apresentou pH de remoção de 8.0 e *Pseudomonas aeruginosa* PU21 apresentou capacidade máxima de remoção de 6.0 (OZDEMIR *et al.* 2003; CHANG *et al.*, 1997).

A linhagem de *Pantoea sp*, isolada de resíduo de lavanderia industrial, apresentou ótima capacidade de remoção de Cd^{2+} , tendo em vista que, em concentrações de 1ppm a bactéria conseguiu remover o metal totalmente da solução, tanto com a biomassa inativa quanto com as células vivas. Nas concentrações de 10ppm com a biomassa inativa, ela conseguiu remover com uma hora de crescimento mais de 50% do metal da solução chegando a 24h com 100% de remoção. Em concentrações mais elevadas de 100 ppm a biomassa inativa apresentou maior potencial de remoção (38,47%) com temperatura de 35°C com um pH 3.0 após 24 horas.

A cinética de remoção com os as células viáveis em concentrações de 10 ppm conseguiu em ambas temperaturas (25 e 35°C) com 1hora de contato valores acima de 80%, chegando a remoção total do metal após 24horas em todas as condições de pHs.

Nas concentrações de 100ppm houve semelhanças de resultados nas condições de pHs e temperaturas, porém com uma melhoria nas condições de 35°C e pH7.0. De acordo com Sa e Kutsal (2000), a temperatura afeta pouco a bio sorção, ficando no intervalo entre 20 e 35°C. As temperaturas mais elevadas geralmente melhoram a sorção devido ao aumento da atividade de superfície e energia cinética do soluto.

Portanto é válido dizer que *Pantoea sp*. tem grande potencial de remoção de Cd^{2+} em soluções entre 10 a 100ppm. Para células vivas em concentrações de 10ppm em temperatura de 35°C com pH entre 5.0-7.0. Em concentrações mais elevadas de 100ppm com temperatura de 35°C e pH de 7.0 . A biomassa inativa em 10ppm de Cd^{2+} com pH 7.0 a 35°C e com 100ppm, 35°C e pH 7.0.

Kinoshita *et al.* (2013) trabalharam com 103 de bactérias na remoção de cd (II), eles utilizaram células vivas e conseguiram uma diminuição de cádmio de um para 0,016 ppm com uma linhagem de *Weissella viridescens*, espécies de *Lactobacillus* conseguiram diminuir para 0,089 ppm. Quatro espécies de *L. mucosae/L. fermentum* reduziram 0,074 ppm, duas cepas de *Streptococcus lactolyticus* e duas cepas de *Enterococcus faecalis* mostraram bio sorção para 0,651 e 0,633 ppm, respectivamente, ao passo que quatro cepas de *Pediococcus pentosaceus* mostrou relativamente baixa bio sorção para 0.874ppm e 0,037 ppm. Estes dados especificam o potencial de *P. agglomerans* como bio sorvente bacteriano na redução de metais pesados de ambientes contaminados.

Ozdemir *et al.*, (2004) usando isoterma de remoção de cádmio com biomassa inativa de uma linhagem de *Pantoea* conseguiram uma redução de (5,8%) para Cd. Bhakta *et al.* (2012) relataram sete e quatro cepas bacterianas de LAB (probióticos)

isoladas de lama e lodo que exibiram eficiência na remoção de Cd em água contaminada. *Lactobacillus reuteri* Cd70-13 apresentou o mais alto valor de remoção de Cd (II) (25%) em meio de cultura MRS. Isto sugere que a cepa de *Pantoea sp* utilizada nesse trabalho, apresenta potencial capacidade de bio sorção de cádmio quando comparado ao valores de remoção encontrados na literatura.

4. Conclusões

- As células vivas de *Pantoea sp.* demonstraram capacidade de realizar bio sorção de cádmio em elevadas concentrações em curto espaço de tempo;
- Ao mesmo tempo, as células inativadas apresentaram um comportamento muito semelhante no processo de bio sorção, sugerindo influência do pH processo de remoção do cádmio;
- Neste estudo, *Pantoea sp.* mostrou habilidades de bio sorção do metal de cádmio em soluções com pH de ácido a alcalino;
- Não houve influência da temperatura no processo de bio sorção por *Pantoea sp.* na remoção do cádmio;
- *Pantoea sp.* poderá ser aplicada na descontaminação ambiental de águas contaminadas pelo metal cádmio.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do estado de Pernambuco-FACEPE, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior-CAPES e à Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, em especial, ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia-NPCIAMB, pelo uso das instalações.

5. Referências

- AHEMAD, M. Implications of bacterial resistance against heavy metal in biorremediação: a review. **The LLOAB Journal**, v.3, n.3, p. 39-46, 2012.
- BHAKTA, J.N., OHNISHI, K., MUNEKAGE, Y., IWASAKI, K., WEI, M.Q. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. **Journal Applied Microbiology**, v.112, p.1193-1206, 2012.

BHATNAGAR, A.; MINOCHA, A.K.; SILLANPAA, M. Adsorptive removal of cobalt from aqueous solution by utilizing lemon peel as biosorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n.2, p.181–186, Jan. 2010.

BRADY, D.; DUNCAN J.R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.41, p.149-154, 1994.

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

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

DIAS, N.M.P.; ALLEONI, L.R.F.; CASAGRANDE, J.C.; CAMARGO, O.A. Isotermas d adsorção de cádmio em solo ácrios. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.2, p. 229-234, 2001.

FOMINA, M.; GADD, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, **Bioresource Technology**, New York, Jan. 2014.

HERNANDEZ, A.; RAFAEL P. M.; MARTINEZ, J.L Metal Accumulation and Vanadium-Induced Multidrug Resistance by Environmental Isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4317–4320, Nov. 1998).

FOMINA, M.; GADD, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, **Bioresource Technology**, New York, Jan. 2014.

KADUKOVÁ, J.; VIRCÍKOVA, E. Comparasion of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environment International**, v. 31, p. 227 – 232, 2005.

KERMANI, J.N.; GHASEMI, M.F.; KHOSRAVAN, A.; FARHAMAND, A.; SHAKIBAIE, M.R. Cadmium bioremediation by metal-resistant mutated bacteria isolated from active sludge of industrial effluent. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 7, n.4, p. 279–286, 2010.

KIFF, R. J.; LITTLE, D. R. Biosorption of heavy metals by immobilized fungal biomass. In **Immobilization of Ions by Biosorption**. (Edited by Eccles H. and Hunt S.), pp. 71-80, 1986, Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, England.

KINOSHITA, H.; SOHMA, Y.; OHTAKE, F.; ISHIDA, M.; KAWAI, Y.; KITAZAWA, H.; SAITO, T.; KIMURA, K. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. **Research in Microbiology**, v. 164, p.701-709, 2013.

KUMAR, A.; BISHT, B.S.; JOSHI, V.D.; DHEWA, T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. **International Journal Environmental Science**, v. 1, p.1079–1093, 2011.

MANASI; RAJESH, V.; KUMAR, A.S.K.; RAJESH, N. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 176-185, Sep. 2012.

MAPOLELO,M.; TORTO,N. Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*. **Talanta**, v.64, p.39 –47, 2004.

MEHTA, S.K.; GAUR, J.P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, p.113 –52, 2005.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process—a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.170, p.1389–1416, 2013.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M. A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos. **Química Nova**, v.27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OZDEMIR, G.; OZTURK, T.; CEYHAN, N.; ISLER, R.; COSAR, T. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge, **Bioresource Technology**, v.90, p.71–74, 2003.

OZDEMIR, G.; CEYHAN, N.; OZTURK, T.; AKIRMAK, F.; COSAR, T. Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18. **Chemical Engineering Journal**, v.102, p.249–253, 2004.

POKPAS,K.; ZBEDA, S.; JAHED. N.; MOHAMED,N.; BAKER, P.G.; IWUOHA, E.I. Electrochemically Reduced Graphene Oxide Pencil-Graphite in situ Plated Bismuth - film Electrode for the Determination of Trace Metals by Anodic Stripping Voltammetry . **International Journal of Electrochemical Science**. v. 9, p.736 – 759, 2014.

SAĞ, Y.; KUTSAL, T. Determination of the biosorption heats of heavy metal ions on *Zoogloea ramigera* and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.145 –51, 2000.

SANNA, G.; PILO, M.; PIU, P. C.; TAPPARO, A.; SEEBER, R. Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes. **Analytic Chimica Acta**, v. 415, p. 165-173, 2000.

STOLL, A.; DUNCAN, J.R. Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechnology Letters**, v.18, p.1209 –12, 1996.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y.S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, New York, v.26, 266– 291, Feb. 2008.

ANEXOS

Tabela 1: Percentual de Remoção de Cd^{2+} apresentado pelas biomassas mortas nas concentrações de 10 e 100ppm e temperaturas de 25 e 35°C nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tempo de contato

T25°C (Cd^{2+} = 10ppm)	Remoção de Cd^{2+} (%) pH x Tempo de Contato (h)			
	Tempo de Contato (h)			
pH	0	1	6	24
3.0	0	48,30	89,55	83,54
5.0	0	80,50	86,57	98,48
7.0	0	88,66	98,87	100
T25°C(Cd^{2+} = 100ppm)				
3.0	0	19,72	28,16	36,45
5.0	0	22,70	30,44	37,48
7.0	0	22,68	32,41	37,04
T35°C (Cd^{2+} = 10ppm)				
3.0	0	87,26	100	100
5.0	0	78,85	100	100
7.0	0	100	100	100
T35°C(Cd^{2+} = 100ppm)				
3.0	0	23,90	33,53	38,47
5.0	0	23,81	32,11	37,99
7.0	0	25,42	35,3	37,25

Tabela 2: Percentual de Remoção de Cd^{2+} apresentado pelas biomassas morta e vivas nas concentrações de 10 e 100ppm e temperaturas de 25 e 35°C nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tempo de contato

T25°C (Cd^{2+} = 10ppm)	Remoção de Cd^{2+} (%) x Tempo de Contato (h)			
	Tempo de Contato (h)			
pH	0	1	6	24
3.0	0	94,03	95,20	100
5.0	0	91,62	95,17	100
7.0	0	83,90	95,90	100
T25°C(Cd^{2+} = 100ppm)				
3.0	0	46,11	41,60	42,43
5.0	0	46,41	42,91	42,62
7.0	0	47,29	43,44	43,66
T35°C (Cd^{2+} = 10ppm)				
3.0	0	88,02	94,91	100
5.0	0	87,92	97,55	100
7.0	0	89,74	100	100
T35°C(Cd^{2+} = 100ppm)				
3.0	0	45,59	42,47	43,14
5.0	0	46,00	44,05	44,03
7.0	0	46,65	44,64	44,78

Trabalhos em Congressos

L. M. L. ACIOLY; C. VILAR JÚNIOR; M. V. LEITE; A. A. BARBOSA DA SILVEIRA; A. E. NASCIMENTO; G. M. CAMPOS-TAKAKI. **Antimicrobial resistance profile of antibiotic and heavy metals for *Pantoea* sp.** BioMcroWorld – V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2013.

ACIOLY, L.M.L., ALMEIDA, F.C.G., NASCIMENTO, A.E., SARUBBO, L.A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Produção de biossurfactante por *Bacillus Subtilis* ucp 0999 usando caldo de farinha de arroz como substrato** Agroindustrial, XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012.

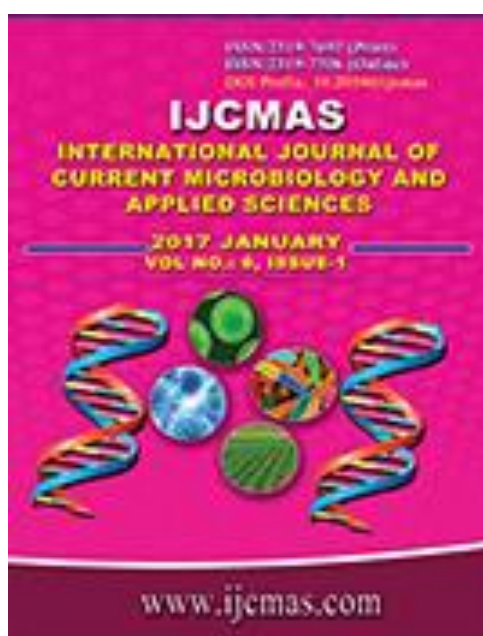
ACIOLY, L.M.L., ALMEIDA, F.C.G., MESSIA, G.P., NASCIMENTO, A.E., CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Caracterização de *pantoea* sp e sensibilidade ao metal pesado zinco**, XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012.

MESSIAS, G.P., ACIOLY, L.M.L., RIBEIRO, D.L., FONTENELE, R.A., LIMA, R.A., ARAÚJO, H.W.C., VASCONCELOS, CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Produção de biossurfactante por *Rhodotorula glutinis* utilizando rejeitos industriais e aplicação na Recuperação melhorada do petróleo**, XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

ACIOLY, L.M.L., ALMEIDA, F.C.G., NASCIMENTO, A.E.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* UCP 0999 usando caldo de farinha de arroz como substrato agroindustrial**. XIII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – ENAMA, 2012.

L. M. L. ACIOLY, A. A. BARBOSA DA SILVEIRA; M. N. ANJOS; G. K. B. SILVA, M. V. LEITE; K. OKADA; G. M. CAMPOS-TAKAKI. **Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel, vegetable oil and corn steep liquor as substrate**. BioMcroWorld – V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2011.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO



Original Article Research

Isolation, Identification, Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of *Pantoea agglomerans*

Leonila M. L. Acioly^{1,4}; Vilar, J. Carlos³; Aline Barbosa da Silveira; Fabíola C. Gomes de Almeida⁴; Thayse Alves de Lima e Silva⁴ and Galba M. Campos-Takaki^{4*}

¹Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E.mail: leonila.acioly@gmail.com

² Autarchy of Higher Education of Garanhuns (AESGA), 55295-380 Garanhuns, Pernambuco, Brazil. E.mail: carlos_vilar@hotmail.com

³Faculty of Guararapes, 54400-160 Jaboatão, PE, Brazil.E.mail: aline_barbosabr@yahoo.com.br

⁴ Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brasil. E-mail: biola.felicidade@yahoo.com.br ; italv@yahoo.com.br ; galba_takaki@yahoo.com.br

*Author to whom correspondence should be addressed:

E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Tel.: +55-81-21194050; Fax: +55-81-21194043.

Abstract

Enterobacteriaceae of the genus *Pantoea* are characterized as Gram-negative and have been isolated from a wide variety of environments including soil, water, dust, dairy products, meat, fish, insects, humans and animals. Most of the time they are found associated with a wide variety of plants. The objective of this work was to identify and characterize biochemical, morphological and enzymatic activity, as well as the influence of abiotic factors in a *Pantoea* isolated from industrial laundry effluent in Pernambuco. The results showed that the bacterium presents characteristics similar to those presented by the species of *Pantoea agglomerans*; however, the biochemical and morphological tests were not enough to accurately identify the species. However, the isolated species showed production of enzymes such as cellulase, protease and polyphenoloxidase, demonstrating enzymatic biotechnological potential. In addition to tolerance to high concentrations of salinity, they present as mesophyll, cerscendo in optimal temperature of 30 ° C and good growth in the pH 7.0 and 8.0.

Palavras-chave: *Pantoea*, Industrial effluent, biochemical characteristics; fatty acids.

Introduction

The genus *Pantoea* belongs within the family *Enterobacteriaceae* and was proposed by Gavini et al. (1983) for two groups of strains that were, at that time, assigned to the *Erwinia herbicola*–*Enterobacter agglomerans* complex (Verdonck, 1987). This complex covered many phenotypic and genomic groups (Brenner et al., 1984), some of which were later designated as new genera (Grimont; Grimont, 2005).

The enterobacterial genus *Pantoea* currently comprises nineteen species of Gram-negative, yellow or beige pigmented, motile rods (Kageyama et al., 1992). Grimont and Grimont (2005) stated that the genus *Pantoea* can be envisioned to include DNA groups I, II, IV and V as determined by Brenner et al. (1984). It was further observed that the species *P. citrea*, *P. punctata* and *P. terrea*, isolated in Japan and described by Kageyama et al. (1992) differed from the “core” *Pantoea* species in several biochemical or nutritional characteristics. Grimont and Grimont determined the phylogenetic position of all currently recognized *Pantoea* species and DNA groups of Brenner et al. (1984) using 16S rRNA- and rpoB-sequence comparisons and found that the “Japanese” species constituted a cluster that joined the *Pantoea* cluster at a lower level. They concluded that more taxonomic work was needed to justify the assignment of these species to the genus *Pantoea* (Braddy et al. 2008; Braddy et al., 2009; Braddy et al., 2010 a,b).

Identification of plant-pathogenic *Pantoea* species is difficult, due to the high degree of phenotypic similarity between species of this genus and related *Enterobacteriaceae*. *Pantoea* species are typically characterised based on colony morphology, physiological and biochemical tests, and in some cases, fatty acid analysis or quinone composition. This approach has proven to be unreliable though, as identification based solely on phenotypic characteristics has led to the misidentification of many strains belonging to the now obsolete “*Erwinia herbicola*–*Enterobacter agglomerans*” complex (Brady et al., 2007).

The genus presents short bacilli, Gram negative, 0.5-1.0 µm in diameter and 1.0-3.0 µm in length, are motile by peritrichal flagella and many samples produce yellow or beige pigment. They are facultative anaerobes, negative indole, Voges-Proskauer and Simmons citrate positive, the reaction of methyl red is variable. They do not

decarboxylate lysine, do not produce H₂S and do not hydrolyze urea (Holt et al., 1994; Camatti-Sartori et al., 2008; [Cabral](#), 2010; Roper, 2011; Nadaeasah; Stavrínides, 2014).

Members of this genus *Pantoea* have been isolated from a wide range of environments including soil, water, dust, dairy products, meat, fish, insects, humans and animals (Suen et al., 2010; Prakash et al., 2015; Büyükcamlar et al., 2017). However, *Pantoea agglomerans*, is not an obligate infectious agent in humans. However, it could be a cause of opportunistic human infections, mostly by wound infection with plant material, or as a hospital-acquired infection, mostly in immunocompromised individuals (Dutkiewicz et al., 2016).

Most frequently they are found associated with a broad range of plant hosts, as non-pathogenic endophytes or epiphytes, colonizing the leaves, stems and roots. In this context, some *Pantoea* strains can be beneficial to the plant host by contributing to growth promotion through processes such as the production of the plant-growth hormone indole-acetic acid (IAA), phosphate solubilization or nitrogen fixation (Mishra et al., 2011; De Maayer et al., 2012). Some *Pantoea* strains also provide effective protection to plants against various bacterioses as well as fungal diseases and postharvest fruit rots (Smits et al., 2011).

The objective of this study was to isolate from laundry effluent, identification, characterization and enzymatic profile.

Materials and methods

Sample and Isolation

Bacteria were isolated from industrial laundry effluents. A quantity of 1 ml of water from each of the samples collected was dissolved in 9 ml of sterile distilled water and serial dilutions were made. Each dilution was seeded in Luria Bertani (LB) agar by standard plate spreading method. The plates were incubated at 37 ° C for 3 days and the colonies were transferred from the plates to inclined tubes with the same medium. After plaque growth, bacterial colonies were collected according to their morphological characteristics and purified by striations repeated on plates containing nutrient agar and identified with Gram staining. For the characterization, the biochemical and

physiological tests were used for the morphology of the colonies. The strain was routinely cultured in LB medium and maintained at 5 ° C.

Biochemical Tests and Morphology

Bacteria were identified according to macroscopic appearance (colony appearance in solid medium, shape, texture and pigmentation), Gram staining, mobility tests, oxidase, catalase and indole. These tests were done according to Cappuccino and Sherman (1992) and (Grimont; Grimont, 2005).. The biochemical Tests were done with various sources of carbon, as monosaccharides (D-glucose, D-fructose, D-xylose, D-mannose, D-mannitol and D-gluconase), disaccharides (lactose, maltose, trehalose and sucrose) (Brown; Dilworth, 1975). Proteins (gelatin) were evaluated according to the standard method (Cappucino; Sherman, 1992).

Abiotic Stress Factors

pH Effect: the pH effect was tested on Nutrient Broth with values of 4, 5, 6, 7, 8, and 10. The medium was inoculated with 100 µl of the culture, grown to a 0.5 standard on the MacFarland scale, And inoculated at 30 ° C / 48h. The experiment was carried out in triplicate. Growth was evaluated using the spectrophotometer at 600nm (Sonet al., 2006; Silini-Chérif et al., 2012).

Temperature Effect: the effect of different temperatures (4, 30, 37, 41 and 44 ° C) on bacterial growth was evaluated. The nutrient broth medium was inoculated with 100µl of the culture, grown to a 0.5 standard on the MacFarland scale. The growth time was 48h and the experiment was performed in triplicate. Growth was evaluated using the spectrophotometer at 600nm (Silini-Chérif et al., 2012).

Saline Concentration Effect: the tolerance of the microorganism to an increasing concentration of NaCl (0-100 mM) in Nutrient Broth medium was evaluated. In the medium, 100 µl of the culture was added, grown to a pad of 0.5 on the MacFarland scale. The growth was evaluated at the end of 48h / 30 ° C, using the spectrophotometer at 600nm. The method was performed in triplicate (Son et al., 2006; Silini-Chérif et al., 2012).

Detection of Enzymatic Activity

Detection of amylase: For the detection of aminolytic activity, the methodology described by Hankin and Anagnostakis (1979) was used, using the Nutrient Agar

medium containing 0.2% starch, later distributed in Petri dishes. After solidification of the medium, a hole was made in the center of the plate, where a previously prepared bacterial suspension of 100 μL was inoculated with (10^7 / CFU). The plates were incubated at 35 ° C for 96 hours with daily monitoring. The enzyme production was evidenced after washing the plates with a lugol solution, by forming an opaque halo around the colony. All assays were performed in triplicate.

Detection of Urease: For the detection of urease activity, the method of Hankin and Anagnostakis (1979) was used, using the nutrient agar medium (lower layer), with addition of 5% urea. The top layer was made with phosphate buffer agar plus 5% urea solution and 5% bromothymol blue solution. After solidification of the culture medium, a hole was made in the center of the Petri dish, with a diameter of 0.8 cm, in which 100 μL of the previously prepared bacterial suspension was inoculated. Plates were incubated at 28 and 37 ° C for 96 hours with daily monitoring. After the period of microbial growth, a light yellow halo around the colony indicated the presence of urease. All assays were performed in triplicate.

Detection of Tanase: For the detection of tannic acid activity, a medium having the following composition was used: 3 g of sodium nitrate, 1 g of dibasic potassium phosphate, 0.5 g of magnesium sulfate, 0.5 g of Potassium chloride, 20 g of agar, 4 g of tannic acid, 0.04 g of bromophenol blue and 1000 ml of distilled water (Sharma et al., 2000). Another medium with the same composition was also prepared, however, by removing the bromophenol blue and increasing the tannic acid concentration to 20 g. After sterilization in autoclave (121 ° C, 1 atm, 20 min.), These media were poured into Petri dishes, solidified and inoculated using triplicates and control (uninoculated).

After solidification of the culture medium, a hole was made in the center of the 0.8 cm diameter Petri dish, where 100 μL of the bacterial suspension (10^7 / CFU) was inoculated. The plates were incubated at 35 °C for 96 hours, with daily monitoring (dark). The degrading activity was evaluated by the appearance of clear zones around the bacterial growth (Hankin; Anagnostakis, 1975).

Detection of Polyphenoloxidase: The colonies were aseptically removed and transferred to the center of the Petri dish containing modified nutrient agar medium (5g meat extract, 10g peptone, 5g sodium chloride, 750ml distilled water, pH 6.0, Tannic acid 5 g to 125 ml water and gallic acid 5 g to 125 ml distilled water) and incubated for

24 h / 35 °C. The enzymatic activity was observed by the brown halo formation around the colony on the rest of the plaque (Harkin; Obst, 1973).

Detection of Lipase: For the detection of lipolytic activity a medium was used with the following composition: 10 g peptone, 5 g sodium chloride, 0.1 g calcium chloride bihydrate, 20 g agar, 20 ml tween 20 And tween 80 and 1000 mL of distilled water. The tween was autoclaved separately in flowing steam and added to the medium before dispensing into Petri dishes. After sterilization in autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min.), These media were poured into Petri dishes, solidified and inoculated using triplicates and control (without tween). Methodology described by Hankin and Anagnostakis (1979).

Results and Discussion

Isolation and Characterization of Bacteria

The isolated bacteria were cultured in nutrient agar (AN) for 24h at 30 °C. The colonies obtained had the following macroscopic characteristics: circular, smooth colonies, regular and flat borders, 1 mm in diameter and yellow pigment. Microscopic examination revealed to be a Gram-negative bacillus with rounded ends. They were presented alone or in pairs. It is mobile, catalase positive, facultative anaerobic, non-fermenting glucose (Table 1).

The results obtained corroborate those found by Silini-Cherif and collaborators (2012) in the identification of a strain of *Pantoea agglomerans* IMA2 isolated from wheat rhizosphere. Fujikawa and Akimoto (2011) also show similar results for *Pantoea agglomerans*. The biochemical characteristics presented by the bacterium isolated from industrial laundry residue are also similar to the strains of *P. ananatis* and *P. stewartii* (Delétoile et al., 2009).

Gavini et al (1989) and Mergaert (1993) describe the genus *Pantoea* as bacilli of $0.5\text{-}1.3 \times 1.0\text{-}3.0\mu\text{m}$. Non-encapsulated and non-spore forming. Most of the strains are mobile by means of perimeter, Gram-negative flagella and colonies when grown on nutrient agar are smooth, translucent with convex or heterogeneous margins in whole consistency and adhering to agar. The colonies are yellow, beige or non-pigmented, facultative anaerobes. The optimum temperature of growth is around 28 and 30 °C. Oxidase negative.

Glucose dehydrogenase and gluconate dehydrogenase are produced and are active without an added cofactor. Lysine and ornithine are not decarboxylated, urease negative, does not degrade pectin, H₂S is not produced from thiosulfate. Most of the strains are Voges-Proskauer-positive and indol-negative. The acid is produced from the fermentation of L -arabinose, D -ribose, D -xylose, D-galactose, D-fructose, L-rhamnose, D-mannitol, N-acetylglucosamine, maltose and trehalose. The sources of carbon used at 28 °C (Biotype-100) are D-glucose, D-fructose, D-galactose, trehalose, D-mannose, cellobiose, 1-O-methyl β -D-glucopyranoside, L-arabinose, Glycerol, and L-serine. The sources of unused carbon at 28 °C (Biotype-100) are L-sorbose, palatinose, melezitose, maltitol, turanose, tricarballylate, 4-hydroxybenzoate, gentisate, methyl 3-hydroxybenzoate, methyl benzoate, 3-phenylpropionate, M -cammarate, histamine, caprate, caprylate, glutarate, 5-aminovalerate, ethanolamine, tryptamine, itaconate, 3-hydroxybutyrate, propionate and L-tyrosine. Reference strains were isolated from plants, seeds, fruits, soils and water, and from humans (urine, blood, wounds, internal organs) and other animals. Strains of various species are phytopathogenic in a wide range of facilities and agricultural machinery. The G + C content of the DNA varies from 52.7-60.6 mol% (Deletoile et al., 2009; Duron et al., 2016).

Biochemical Characterization

The results of several biochemical tests were listed in Table 1. The *Pantoea* sp. Degraded some carbon sources such as D-mannitol, D-mannose, D-glucose, D-gluconase, D-fructose and sucrose. And also the gelatin protein. He presented H₂S production and was positive for the Voges-Proskauer test, methyl red and lactose. According to Delétoile et al. (2009) and Mergaert et al. (1993) these are characteristics of the strains of *Pantoea agglomerans*.

PLEASE INSERT TABLE

3.3.Responses to Abiotic Stress

Pantoea sp. Demonstrated great growth ability over a broad pH range, ranging from pH 4.0 to pH 8.0. There was inhibition of growth for alkaline pHs (pH 9.0 and 10.0). The bacteria showed optimum growth at pH 7.0 (Figure 1). The results were similar to those reported by *Pantoea agglomerans* CPA-2 and *Pantoea agglomerans* IMA2 in works

presented by Costa et al (2002), Son et al. (2006) and Silini-Chérif et al. (2012), respectively. Other studies have reported that the highest development of *Pantoea* occurs in culture medium with pH values ranging from 6.0 to 7.0 (Costa et al., 2002).

PLEASE INSERT FIGURE 1

The turbidity measurement, for growth at different temperatures, showed a significant result at 30 ° C, indicating that the tested *Pantoea* lineage is mesophilic (Figure 2). Similar results were found by Camatti-Sartori et al. (2008) when evaluating the influence of temperature on the growth of *Pantoea agglomerans* and obtained the best results at temperatures of 30 ° C. The microorganism showed good viability of growth at high temperatures of 40 and 44 ° C (Figure 2), which could explain the presence of these organisms in arid regions (Silini-Chérif et al., 2012). However, Camatti-Sartori et al., (2008) presented discordant results regarding the temperature of 40 ° C, because there was a significant decrease in the development of the microorganism. Son et al. (2006) worked with insoluble phosphate solubilization by *Pantoea agglomerans* and obtained good microorganism growth results in a temperature range between 5 and 45 ° C. With best results at 25-35 ° C. Temperature is one of the most important factors governing the physiology and growth of microorganisms, as reported by Rahman et al (2006).

PLEASE INSERT FIGURE 2

Growth of the nutrient broth strain with variations in salt concentration from 0 to 1000 mM showed a high tolerance capacity at high salt concentrations. The high point of growth was with 100 mM. However, it presented excellent results at concentrations of 400, 800 and 1000 mM NaCl (Figure 3). According to Borneman et al. (1996), soil salinity plays an important role in the microbial selection process. Several studies indicate that bacteria isolated from saline environments are better able to survive inhibition concentrations compared to non-saline isolates (Sharma, 2006). Similar results were found by Silini-Chérif et al, (2012) when working with a strain of *Pantoea agglomerans*.

PLEASE INSERT FIGURE 3

Enzymatic Profile of *Pantoea agglomerans*

Microbial enzymes have an essential role in the processes related to soil quality, since it is through them that the soil microorganisms degrade complex organic molecules in simple and that can be assimilated. In addition to allowing microorganisms to have access to the energy and nutrients present in complex substrates, extracellular enzymes are responsible for the decomposition and mineralization of nutrients in the soil, also making them available to plants and promoting the cycling of nutrients in the soil (Makol; Ndakidemi, 2008). The bacterium of the genus *Pantoea* sp was submitted to enzyme activity detection tests for amylase, urease, protease, tannase, cellulase and polyphenoloxidase. *Pantoea agglomerans* isolated from laundry effluent showed positive results for enzymes tanase, polyphenoloxidase and cellulase (Table 3). Tannase is an enzyme that hydrolyzes esters and side bonds of hydrolysable tannins producing glucose and gallic acid (Banerjee et al, 2001). It is mainly used for the production of gallic acid, instant teas, wine color stabilization, leather treatment process, food detanification, antioxidant production and effluent treatment in the leather industry (Battestin et al, 2004;).

PLEASE INSERT TABLE 2

Madhukar et al. (1996) and Souza and Magalhães (2010) detected the enzymatic activity of amylase and cellulase by *Pantoea agglomerans* isolated from pea leaves (*Lathyrus maritimus* L). Cellulases are used in many biotechnological applications. In the textile industry, these enzymes are used to give better finishing to the fabrics, making them smoother, smoother and with better trim. Cellulases are also used in the beverage industry for the production of fruit juices and in winemaking processes. Also, they play an important role in animal nutrition, detergent manufacturing, and the paper pulp industry, making the paper whiter and smoother. However, interest in these enzymes has increased greatly due to their use in the ethanol production process (Castro; Pereira, 2010).

Phenol oxidase-catalyzed reactions are related to changes in cell wall properties (increased impermeability and hydrostatic resistance), intracellular interactions and removal / detoxification of certain secondary metabolites (Mayer; Harel, 1979; Mardaneh; Dallal, 2013; Dushyanthie to al., 2014).

Conclusion

The biochemical and morphological tests showed that the microorganism isolated is of the *Pantoea* genus and presents characteristics similar to those presented by *Pantoea agglomerans*. The *Pantoea* strain studied showed tolerance to high salt concentrations, optimum growth in mesophilic temperature codons, 30, 37 ° C, and alkaline pH 7 and 8 indicating an enzymatic biotechnological potential for cellulase, tannase and polyphenoloxidase.

Conflict of Interest

The authors confirms that this article content has no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian Research Council (CNPq), Brazil, the Coordination for Improvement of Higher Level Education (CAPES), Brazil and the Foundation for Support of Science and Technology of the State of Pernambuco - FACEPE, Brazil. Special thanks are given to Catholic University of Pernambuco for making facilities and infrastructure available for the conduct of this research.

References

- Banerjee, D., Mondal, K.C., Pati, B.R. 2001. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF9. J. Basic Microbiol., 41, 313-318.
- Battestin, V., Matsuda, L. K., Macedo, G. A. 2004. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em alimentos. Alimentos e Nutrição Araraquara, 15, 63-72.
- Brady, C.L.; Cleenwerck, I.; Venter, S.V.; Engelbeen, K.; De Vos, P.; Coutinho, T.A. 2010. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium*

cyripedii (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cyripedii* comb. Nov. Inter. J. Syst.Evol. Microbiol., 60, 2430–2440a.

Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P.; Coutinho, T. A. 2010. Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the genus *Tatumella* emend. As *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov. and *Tatumella terrea* comb. nov. and description of *Tatumella morbirosei* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 60, 484–494 b.

Brady, C. L.; Cleenwerck, I.; Venter, S. N.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Coutinho, T. A. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). Syst. Appl. Microbiol. 31, 447–460.

Brady, C., Venter, S.; Cleenwerck, I.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Coutinho, T. 2007. A FAFLP system for the improved identification of plant-pathogenic and plant-associated species of the genus *Pantoea*, Syst. Appl. Microbiol., 30, 413-417.

Brady, C. L.; Venter, S. N.; Cleenwerck, I.; Engelbeen, K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Coutinho, T. A. 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 59, 2339–2345.

Brenner, D.J., et al. 1984. Attempts to classify *Herbicola* group-*Enterobacter agglomerans* strains by deoxyribonucleic acid hybridization and phenotypic tests, International Journal of Systematic Bacteriology, Ames, 34, 45–55.

Brown, C.M, Dilworth. 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacterioids. J. Gen. Microbiol., 86 39-48.

Büyükcama, A.; Tuncer, Ö.; Gür, D.; Sancak, B.; Ceyhana, M. ; Cengiz, A.B.; Kara, A. 2017. Clinical and microbiological characteristics of *Pantoea agglomerans* infection in children. J. Infect Public Health, 783, 1-6.

[Cabral](#), J.P.S. 2010. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. Int J Environ Res Public Health. 7(10): 3657–3703.

Camatti-sartori, V., Valdebenito-Sanhueza, R.M., Ribeiro, R.T.S. 2008. Desenvolvimento de *Pantoea agglomerans* em diversas temperaturas, pH e concentrações de carboxi-metil-celulose e o seu impacto no controle de *Rosellinia necatrix*, Summa phytopathologica, , 34, 1, 22-28.

Cappuccino, J.C., Sherman, N, 1992. Microbiology: a laboratory manual. 3rd Edn, Benjamin/cummings Pub. Co., New York, USA, pp: 125-179.

- Castro, A. M., Pereira JR, N. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, 33, 181-188.
- Coelho, R.S., Amarante Junior, O.P., Melo, I.S., Parma, M.M, Vieira, E.M. Identificação de bactérias degradadoras de fluidos de corte por análise dos ácidos graxos. *Revista ACTA Tecnológica*, 6, n. 2, jul-dez. 2011.
- Costa, E. *et al.* 2002. Water activity, temperature and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 1082-1088.
- Delétoile, A. *et al.* 2009. Phylogeny and Identification of *Pantoea* species and Typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47,300-310.
- De Maayer, P., Chan, W.Y., Blom, J., Venter, S.N., Duffy, B., Smits, T.H.M., Coutinho, T.A. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. *BMC Genomics*, 625,1471-2164.
- Duron, O.; Noël, V. 2016. A wide diversity of *Pantoea* lineages are engaged in mutualistic symbiosis and cospeciation processes with stinkbugs. *Envir. Microbiol. Reports*, 8,5, 715–727.
- Dutkiewicz, J.; Mackiewicz, B.; Kinga Lemieszek, M.; Golec, M.; Milanowski, J. 2016. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 23,2, 197-205.
- Fujikawa, H., Akimoto, R. 2011. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 172-178.
- Gavini, F. *et al.* 1983. Taxonomic study of strains belonging or related to the genus *Erwinia*, *herbicola* group, and to the species *Enterobacter agglomerans*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 218–235.
- Gavini, F., *et al.* . 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 3, 337-345,
- Grimont, P.A.D.; Grimont, F. Genus: *Pantoea*, in: D.J.Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, second ed., Springer, New York, 2005, pp. 713–720.

- Gupta, R; Mohapatra, H; Goswami, V.K.; Chauhan, B. 2003. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. *Process Biochem.* ,38, 199-1616.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. 1979. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, 67, 597-607.
- Harkin, J.M., Obst, J.R. 1973. Syringaldazine an affective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, Basel, 29, 381-387.
- Holt, J.G. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994. .
- Kageyama, B. et al. 1992. *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples, *Inter. J. Syst. Bacteriology*, , 42, 203–210.
- Madhukar, B. K., Arya K. B., Lisa D. N., John, A. G. 1996. *Pantoea agglomerans* is the etiological agent for black spot necrosis on beach peas. *Can. J. Microbiol.*, 42, 1252-1257.
- Makol, J. H. J. R., Ndakidemi, P. A. 2008. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. *African J. Biotechnol.*, 3, 181-191.
- Mardaneh, J. and Dallal, M.M.S. 2013. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea* (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iran J Microbiol.*, 5, 263–267.
- Mergaert, J., Verdonck, L., Kersters, K. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov., *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 43,162–173.
- Mishra, A.; Chauhan, P.S.; Chaudry, V.; Tripathi, M.; Nautiyal, C.S. 2011. Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 405– 413.
- Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Microbiologia Médica*, 5th ed., Elsevier editora, Rio de Janeiro, 2006.
- Nadarasah, G.; Stavrinides, J. 2014. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiol.*, 160, 602–615.

- Prakash, O.; Nimonkar, Y.; Vaishampayan, A.; Mishra, M.; Kumbhare, S.; Josef, N.; Shouche, Y.S.; 2015. *Pantoea intestinalis* sp. nov., isolated from the human gut. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 65, 3352–3358.
- Rahman, M. et al. 2006. Effect of some environmental factors on the growth of *Azospirillum* species isolated from saline soils of Satkhira district, Bangladesh. Bangladesh J. Microbiol., 23, 145–148.
- Roper, C.M. 2011. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. Molecular Plant Pathol., 12, 628–637.
- Sharma, S.; Bhat, T. K.; Dawra, R. K. 2000. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. Analytical Biochem., 279, 85–89.
- Silini-Chérif, H., Silini, A., Ghoul, M.; Yadav, S. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. Pakistan J. Biol. Sci., 15, 267–276.
- Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Ishimaru, C.A., Frey, J.E., Stockwell V.O., Duffy, B. 2011. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1. PLoS One, 6, 22–247.
- Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S., Heo, M.S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. Biores. Technol., 97, 204–210.
- Souza, P.M., Magalhães, P.O. 2010. Application of microbial α -amylase in industry – a review, Braz. J. Microbiol., 41, 850–861.
- Suen, G. et al. 2010. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. PLoS Genet, 6, 1001–1029.
- Verdonck, L. et al. 1987. *Genus Erwinia*: Numerical analysis of phenotypic features, Inter. J. Syst. Bacteriol., 37 4–18.

TABLES LIST

Table 1. Biochemical tests and acid production to bacterial identification

Table 2. Enzyme production by bacterial strain isolated from laundry effluent

Table 1.

Biochemical Tests	Bacterial strain	Acid production	Bacterial strain
Motility	+	D-glucose	+
Yellow Pigment	+	D-fructose	+
Catalase	+	D-xylose	—
Citrate	—	D-mannose	+
Lactose	+	D-mannitol	+
Methyl red	+	D-gluconase	+
Glucose	—	Lactose	—
Indol production	—	Maltose	—
Production H ₂ S	+	Trehalose	+
Reaction Voges-Proskauer	+	Sucrose	+

+: Positive Test; -: Negative Test.

Table 2

Enzyme Activity	Bacterial strain
Urease	—
Protease	—
Amylase	—
Tanase	+
Polyphenoloxidase	+
Cellulase	+

FIGURES

Figure 1. Effect of different pH in nutrient broth medium on the growth of *Pantoea* sp. at 48h of incubation.

Figure 2. Evaluation of temperatures (°C) of incubation on the growth of *Pantoea* sp in the nutrient broth medium at 48h

Figure 3. Effect of different concentrations of NaCl (mM) in nutrient broth medium on the growth of *Pantoea* sp. at 48h of incubation

Figure 1

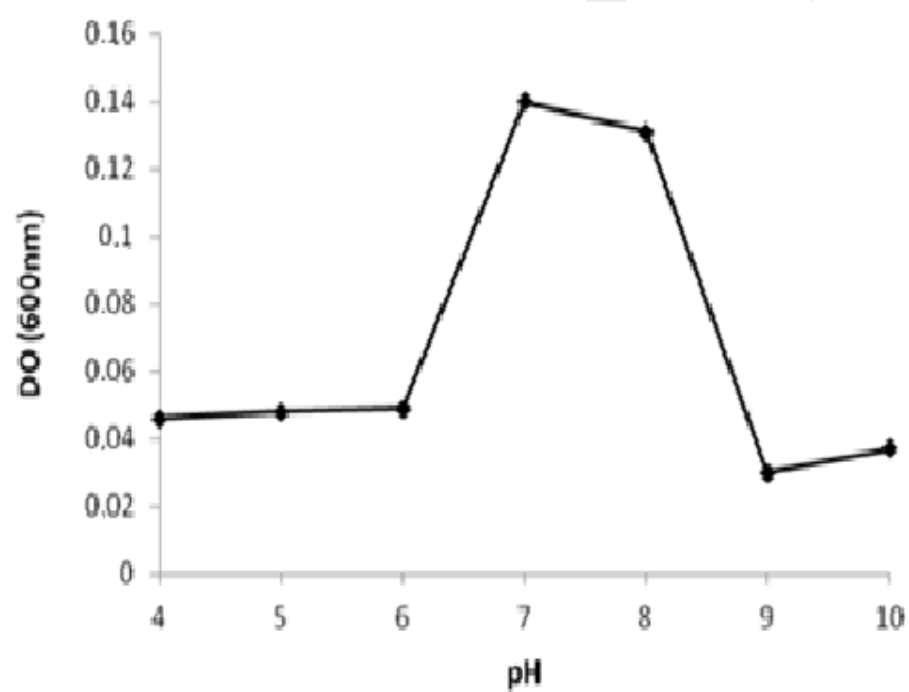


Figure 2

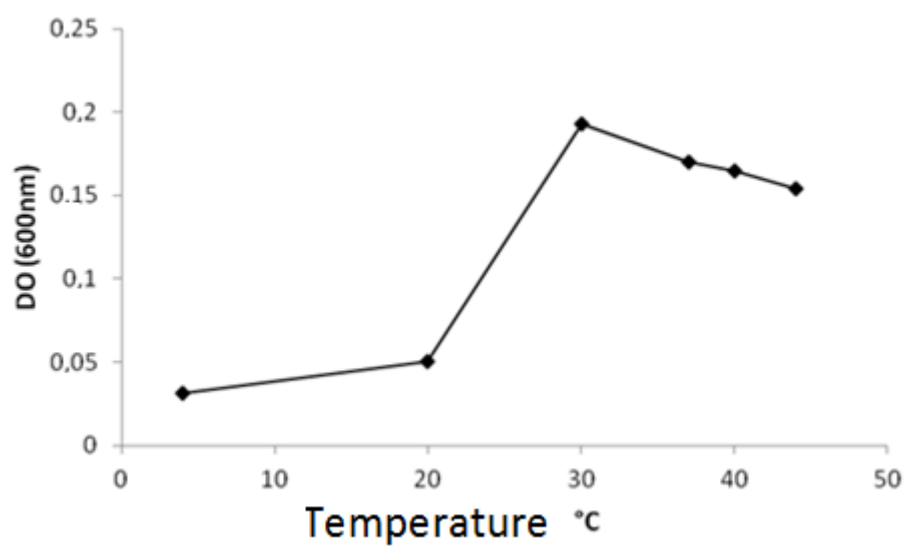
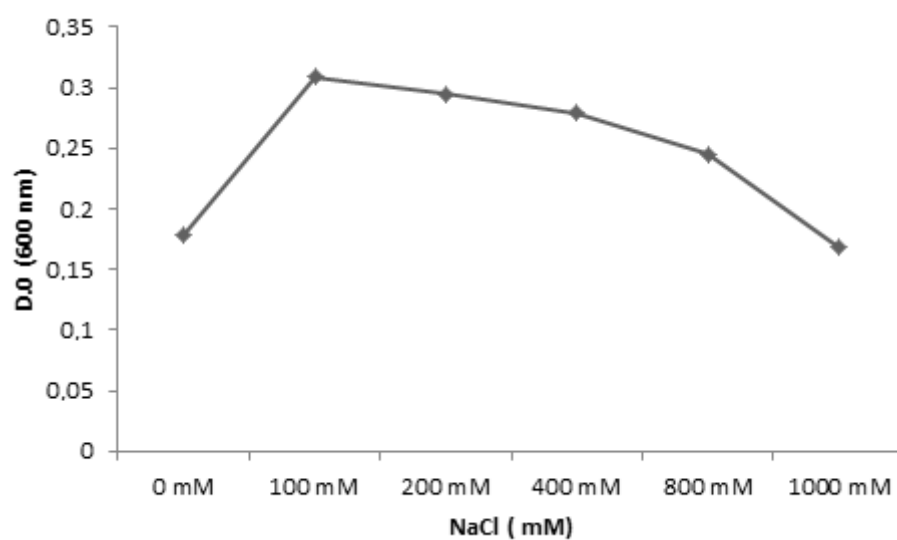


Figure 3



An investigation on the heavy metal tolerance and antibiotic profile of the *Pantoea agglomerans* UCP1320

Leonila Acioly¹, José Carlos Vilar², Aline Barbosa da Silveira³, Fabiola Carolina Gomes de Almeida⁴ and Galba Campos-Takaki^{4*}

¹ Post-Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brazil. E.mail: leonila.acioly@gmail.com

² Autarchy of Higher Education of Garanhuns (AESGA), 55295-380 Garanhuns, Pernambuco, Brazil. E.mail: carlos_vilar@hotmail.com

³ Faculty of Guararapes, 54400-160 Jaboatão, PE, Brazil. E.mail: aline_barbosabr@yahoo.com.br

⁴ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brazil. E.mail: biola.felicidade@yahoo.com.br ; galba_takaki@yahoo.com.br

* Corresponding author: E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Phone: +55-81 2119-4017; Fax: +55-81 2119-4043.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The resistance of bacteria to antibiotics is an emerging public health concern due to antibiotics being widely available and used without proper prescription. The introduction of heavy metals in various forms in the environment may cause considerable changes in the structure and function of microbial communities. In the last decade, several studies reported that the resistance of bacteria to antibiotics can occur in the environment because of multidrug resistance or cross-resistance to metals and co-regulation of airway resistance. The aim of this study is to determine the antimicrobial resistance profile patterns to 15 antibiotics and heavy metals (Zn^{+2} , Cu^{+2} and Cd^{+2}) by *Pantoea agglomerans* bacteria. The (MIC) of the heavy metals was varied from 200 μg /mL to 2200 μg /mL. The results showed that the bacteria were resistant to Zn^{+2} , Cu^{+2} and Cd^{+2} , considering the MIC values compared with the strain *Escherichia coli* K-12 used as control. *P. agglomerans* showed an antibiotic profile of resistance to Cefepime, Cefotaxime, Cefpodoxime, Clindamycin, and Amikacin, and sensitivity to Penicillin, and other antibiotics, thus suggesting that genetically-determined systems for resistance to toxic heavy metals was observed.

Keywords: heavy metal resistance; antibiotic susceptibility; *Pantoea agglomerans*

1. Introduction

Bacteria present in the environment, both aquatic and in the soil, may be indigenous or result from hospital and sewage contamination, such as human and animal feces, which is usually discharged into the aquatic environment. Polluted sewage contains large amounts of pathogenic bacteria. These bacteria present various ways of infecting humans, and can be ingested, inhaled or come into contact with wounds ((Schlusener and Bester , 2006; Matyar , 2012).

There are also several antibiotics used in animal feed to promote weight gain. Many countries have implemented antimicrobial resistance and antimicrobial surveillance programs to monitor these factors in animals raised for meat (Akinbowale et al., 2007).

The potential for antibiotic-resistant bacteria developing has raised social concerns that has led to the intensive investigation of the influence of antibiotics on human health and ecosystems (Kim et al., 2011; Matyar, 2012). In the last decade, several studies have reported that patterns of antibiotic resistance are becoming a global problem (Stachowiak et al., 2011; Matyar , 2012).

Studies have demonstrated an additional mechanism that keeps bacteria resistant to antibiotics in the environment due to multi-drug or cross-resistance to metals or co-regulation of resistance pathways (Stepanauskas et al., 2005).

Therefore, it seems likely that exposure to metal may directly select the bacteria resistant to metals, as a co-selection for antibiotic resistant bacteria. Metals, such as copper and zinc and their chemical derivatives, also have antimicrobial activity (Antunes et al., 2003). Animal feed is often supplemented with copper and/or zinc salts because they promote growth. There is concern that metal contamination functions as a selective agent in the proliferation of antibiotic resistance (Baker-Austin et al., 2006). Heavy metals can enter the food chain; in particular fish and crustaceans, and these contaminants can be introduced into the aquaculture system when fish meal bases are used as these can produce soluble contaminants such as heavy metals and polychlorinated biphenyls (Erickson, 2002).

There are three main strategies by which microorganisms can develop resistance to drugs: they produce enzymes that are capable of rendering the antimicrobial unfeasible; they prevent the drug reaching its target, through efflux pumps or membrane permeability and; they alter the molecular target of the antimicrobial (Freitas et al., 2017). In general, after the microorganism develops a better resistance strategy, the new genes that confer resistance are disseminated between organisms of the same species or different species by means of different gene transfer strategies (March-Rosselló, 2017).

Mutations can spread horizontally among bacteria by processes such as conjugation or transduction. Drug resistance is often carried by plasmids or by small segments of DNA called transposons, which can jump from one piece of DNA to another. Some resistance plasmids can be transferred between bacterial cells in the same population and between different but closely related bacterial populations (De Maayer et al., 2012).

Being resistant to antimicrobial agents, including heavy metals, is important for the survival of bacteria in contaminated environments. Resistance genes are exchanged between bacteria living in areas contaminated by heavy metals. Therefore, it can be concluded that the natural selective pressure imposed by heavy metals can, indirectly, develop bacterial resistance to antibiotics (Fard et al., 2011). This study sets out to determine the resistance profile of *Pantoea* sp. to antibiotics and heavy metals in order to investigate the resistance relationship to antimicrobials.

2. Materials and Methods

2.1 Identification of Microorganism

The isolate of a bacterium was characterized by phenotypic, biochemical and Gram staining, oxidase and catalase, motility, glucose reactions and gelatin liquefaction tests (Mardaneh and Dallal, 2013).

2.2 Antibacterial Susceptibility Test

Antibacterial susceptibility testing was performed by agar diffusion (Bauer et al., 1996) using Müller-Hinton medium (Difco). During the tests, the bacterial isolate was inoculated in LB medium (Tryptone, 10g, Yeast Extract, 5g, NaCl, 19g, 1000mL distilled water) at 30°C for 24h, respecting the turbidity of the MacFarland 0.5 scale

(approximately 1.5×10^8 CFU.mL⁻¹). A sterile swab was soaked in the culture, removing excess liquid, and seeded uniformly on plates containing Müller-Hinton agar. The antimicrobial discs were deposited equidistantly on the surface of the inoculated medium. A total of 15 antibiotic disks belonging to 9 different classes were used in this study, including Ertapenem (ETP, 10µg), Oxacillin (OXA, 1µg), Cefotaxime (CFX, 5µg), Cefepime (CPM, 30µg), Cefpodoxime (ERI, 15 µg), Nalidixic Acid (10 µg), Gentamicin (GEN, 10 µg), Amicacin (AMI, 30 µg), Erythromycin (ERI, 15 µg) NAL, 30µg), Ciproflaxin (CIP, 5µg), Tigecycline (TGC, 15µg) and Clindamycin (CLI, 2µg). The plates were incubated at 37°C for 24 h and after that period the inhibition halos were measured, in millimetres (mm), by the diameter of the zone of inhibition around the disks, and characterized as sensitive (S) , intermediate (I) and resistant (R) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute/ 2007. Control strains were *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.3 Minimal Inhibitory Metal Concentration Test (MIC)

Minimal inhibitory concentration (MIC) tests on the heavy metals were conducted using the Akinbowale methodology (2007). The inoculum was prepared as described above and used for dilution tests on Müller-Hinton Agar containing different concentrations of Cd²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ in the form of the salts of Cadmium Chloride, Copper Sulphate and Zinc Sulfate, respectively. The stock solutions of the metals were made in distilled water and sterilized using a 0.22 µm syringe to filter them into sterile glass vials which were then stored at room temperature. Dilutions in Müller-Hinton Agar media followed the concentrations of 200 µg/ ml to 2200 µg/ ml of each metal. The plates were incubated with 10 µL of the inoculum at 30°C for 24h. Samples were considered resistant when MIC values exceeded those of the control organism, *Escherichia coli* K-12, described by Akinbowale et al. (2007) and Ansari and Malik (2007).

3. Results and Discussion

The genus *Pantoea* belongs to the family Enterobacteriaceae and currently comprises nineteen species of Gram-negative bacteria, with yellow or beige pigmentation and mobility. Members of this genus have been isolated from a wide

variety of environments including soil, water, dust, dairy products, meat, fish, insects, humans and animals. Most often they are found associated with a wide variety of host plants, such as nonpathogenic endophytes or epiphytes, the leaves, stems and roots of which they colonize (De Maayer et al., 2012).

The bacteria were grown on nutrient agar (AN) for 24 hours at 30°C. The colonies obtained had the following macroscopic characteristics: circular, smooth colonies, irregular and flat borders, 1 mm in diameter and had a yellow pigment. Microscopic examination revealed there to be a Gram-negative bacillus with rounded ends. They were seen to be alone or in pairs. It is mobile, catalase +, facultative anaerobic, non-fermenting glucose. These results corroborate those found by Silini-Cherif et al. (2012) in the identification of a lineage of *Pantoea agglomerans* Ima2 isolated from wheat rhizosphere.

Fujikawa and Akimoto (2011) also show similar results for *Pantoea agglomerans*. Both studies present yellow pigment production by microorganisms. These results are also common to the strains of *P. ananatis*, *P. dispersa* and *P. stewartii* (Delétoile et al., 2009) .

The results of antibiotic susceptibility showed that *Pantoea* sp was sensitive to most antibiotics and intermediate to ertapenem and erythromycin and resistant to the three antibiotics tested in the class of cephalosporins (cefotaxime, cefepime, cefpodoxime), an aminoglycoside antibiotic (Amikacin) and a lincosamide (clindamycin) (Table 1). In heavy metal tolerance tests, *Pantoea* sp. showed resistance to the three Cu>Zn>Cd tested metals (Table 2).

Nath et al. (2013) presented results, where antibiotics of the cell-phosporins and aminoglycyses groups were inefficient at controlling bacterial isolates of the genera *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *Bacillus*, resistant to zinc, copper and lead. Akimbowale et al. (2007) on isolating strains of *Pseudomonas* and *Aeromonas* found that these were also resistant to drugs in the cephalosporin group, and also showed similarities in resistance to metals.

Sharma et al.(2012), when analyzing a case of septic arthritis caused by *Pantoea agglomerans*, found that this species did not respond to treatment with amikacine, gentamicin, cotrimoxazole, ciprofloxacin, tobramycin, ampicillin and ceftamizine.

Table 1. Susceptibility of *Pantoea agglomerans* isolated from laundry effluent to antibiotics.

Antibiotic Class	Antibiotic	Disk [C]				Results (Halo)
		$\mu\text{g/mL}$	R	I	S	
Penicillins	Penicillin	10	≤ 28	-	≥ 29	30 mm (S)
	Ertapenem	10	≤ 15	16-18	≥ 19	17 mm (I)
	Oxacillin	1	≤ 10	11-12	≥ 13	18 mm (S)
Quinolones	Nalidixic Acid	30	≤ 13	14-18	≥ 19	24 mm (S)
	Ciproflaxin	5	≤ 15	16-20	≥ 17	30 mm (S)
Cephalosporins	Cefotaxime	5	≤ 14	15-17	≥ 18	(R)
	Cefepime	30	≤ 14	15-17	≥ 18	(R)
	Cefodoxime	10	≤ 17	18-20	≥ 21	(R)
Aminoglycosides	Gentamicin	10	≤ 12	13-14	≥ 15	24 mm (S)
	Tobramycin	10	≤ 12	13-14	≥ 15	20 mm (S)
	Amikacin	30	≤ 12	15-16	≥ 17	(R)
Glycopeptides	Vacomycin	30	≤ 14	15-16	≥ 17	20 mm (S)
Glycylcycline	Tigecycline	15	≤ 19	20-27	≥ 28	30 mm (S)
Macrolides	Erythromycin	15	≤ 13	14-22	≥ 23	15 mm (I)
Amphenicol	Chloramphenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	24 mm (S)
Lincosamides	Clindamycin	2	≤ 14	15-20	≥ 21	(R)

Reference: (CLSI, 2006). R- resistant; I- Intermediate ; S- sensitive

Table 2. Resistance of *Pantoea agglomerans* to different concentrations of heavy metals

Heavy metal	MIC ($\mu\text{g/mL}$) <i>Pantoea</i>							
	100	200	400	600	800	1200	1600	2200
Cadmium	a		MIC					
Zinc		a			MIC			
Copper		a						MIC

MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

(a) MIC of the strain *Escherichia coli* K12 (Akinbowale et al., 2007)

The resistance of *Enterobacterium* species to a broad spectrum of cephalosporins is already known, and because it is mediated by a chromosomal overproduction of AmpC [beta] -lactamases (Aibinu et al., 2012).

Such enzymes are normally encoded on the chromosome of Gram-negative bacteria, including *Citrobacter*, *Serratia*, and *Enterobacteria* species in which their expression is usually inducible, but may also occur in *Escherichia coli*. However, AmpC [beta] -lactamases can also be transported in plasmids (Philippon et al., 2002). The selection of resistance determinants in the environment could occur even in the absence of the antimicrobial. Many multiple-resistance determinants are capable of simultaneously conferring resistance to compounds belonging to various classes of chemical compounds, such as detergents and antiseptics (Chadha, 2012).

Other studies have shown that selection of antimicrobial resistance determinants could occur due to heavy metal pollution and chemicals (Getanda et al., 2017). Therefore, the selection of resistant bacteria could occur by selecting resistance to compounds that are not antimicrobial, but that make this selection with the same mechanism of resistance (Chadha, 2012).

The various ecological niches occupied by species of *Pantoea*, including plant and animal hosts, and their distinct lifestyles such as epiphytes and endophytes, are indicative of the diversification within the genus *Pantoea* and even among individual strains belonging to the various species of the genus. One means by which this diversification takes place is exactly because plasmids between bacteria are acquired. These plasmids carry genes that confer various phenotypes on the bacterium, including toxin production; hormone production; and virulence factors that contribute to host pathogenesis and specificity; antibiotic and heavy metal resistance and survival under adverse conditions; catabolism of Amino acids and organic acids, carbohydrates and inorganic ions; and the colonization and dissemination of these species (De Maayer et al., 2012).

4. Conclusions

The strain of *Pantoea agglomerans* presented resistance to the antibiotics cefotaxime, cefepime and cefpodoxime of the cephalosporin group. The group of aminoglycosides presented resistance to amikacin and clidamycin from the

licosamides group. In heavy metal tolerance tests, *P. agglomerans* showed crossing resistance to the three metals tested at the higher levels for Cu, followed by Zn and by Cd.

Acknowledgements

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES), and the fellowship by Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). We thank to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil,

Conflict of Interest

The authors confirms that this article content has no conflict of interest.

5. References

- Aibinu, I.; Pfeifer, Y.; Peters, F.; Ogunsola, F.; Adenipekun, E.; Odugbemi, T.; Koenig, W. 2012. Emergence of blaCTX-M-15, qnrB1 and aac(69)-Ib-cr resistance genes in *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cloacae* from Nigeria (sub-Saharan Africa). *J. Medical Microbiol.*, 61, 165-167.
- Akinbowale, O.L.; Peng, H.; Grant, P.; Barton, M.D. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Inter. J. Antimicrobial Agents*, 3, 177-182.
- Antunes, W.M., Luna, A.S., Henriques, C.A., DA Costa, A.C.A. 2003. An evaluation of copper biosorption by a brown seaweed under optimized conditions. *Electronic J. Biotechnol.*, 6, 6174-184.
- Ansari, M.I.; Malik, A. 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Biores. Technol.*, 98, 3149-3153.
- Baker-Austin, C., Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiol.*, 14, 176-182.
- Bauer, W.A.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American J. Clinical Pathol.*, 45, 493-496
- Chadha,T.2012.Antibiotic Resistant Genes in Natural Environment.Chadha, Agrotechnol., ,1-3.

De Maayer, P.; Chan, W.Y.; Blom, J.; Venter, S.N.; Duffy, B.; Smits, T.H.M.; Coutinho, T.A. 2012. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. BMC Genomics, 13, 625, 1471-2164.

Delétoile, A. Decré, D.; Courant, S.; Passet, V.; Audo, J.; Grimont, P.; Arlet, G.; Brisse, S. 2009. Phylogeny and Identification of *Pantoea* species and Typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. J. Clinical Microbiol., 47, 300-310.

Erickson, B.E. (2002). More than just dioxins in food. Environmental Sci. Technol., 2002, 36, 267A-8A.

Fard, R.M.N.; Heuzenroeder, M.W.; Barton, M.D. 2011. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal *enterococci* isolated from pigs. Veterinary Microbiol., 148, 276-282.

Freitas, D.G.; Silva, R.D.R.; Bataus, L.A.M.; Barbosa, M.S.; Braga, C.A.S.B.; Carneiro, L.C. 2017. Bacteriological water quality in school's drinking fountains and detection antibiotic resistance genes. Ann Clin Microbiol Antimicrob., 16, 1-5.

Fujikawa, H.; Akimoto, R. 2011. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. Appl. Environ. Microbiol., 77, 172-178.

Getanda, P.; Kariuki, F.; Gitahi, N.; Onkoba, N.; Juma, G.; Kinyanjui, P.; Nyachio, A.; Kamau, J. 2017. Genetic characterization and evaluation of antimicrobial resistance patterns of human *Salmonella typhi* isolates in kenyatta national hospital in Nairobi, Kenya. Pathogen Infect. Dis., 3, 1-8.

Kim, K.R.; Owens, G.; Kwon, S.I. 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water, air and soil pollution, 214, 163-174.

March-Rosselló, GA. 2017. Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. Enferm Infecc Microbiol Clin., 35, 3, 182-188.

Mardaneh, J. and Dalla, M.M.S. 2013. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea* (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. Iran J Microbiol., 5(3), 263-267.

Matyar, F. 2012. Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria Isolated from the Eastern Mediterranean Sea Coast. **Bulletin Envir. Contamination Toxicol.**, 89, .551-556.

Nath, S; Deb, B.; Sharma, I.; Pandey, P. 2013. Isolation and characterization of heavy metal resistant bacteria and its effect on shoot growth of *Oryza sativa* inoculated in industrial soil. Annals Plants Sci., 2, 6, 2013.

Philippon, A.; Arlet, G.; Jacoby, G.A. 2002. Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. Antimicrobial Agents Chemo., 46, 1-11.

Schlusener, M.P., Bester, K. 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*, 143, 565-571.

Sharma, M.; Dogra B.B.; Misra, R.; Gandham, N.; Sardar, M.; Jadhav, S. 2012. Multidrug Resistant *Pantoea agglomerans* in a patient with septic arthritis- a rare report from India. *Inter. J. Microbiol. Res.*, 4, 6, 263-265.

Silini-Chérif, H.; Silini, A.; Ghoul, M.; Yadav, S. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans*. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 15, 267-276.

Stachowiak, M.; Clark, S.E.; Templin, R.E.; Baker, K.H. 2010. Tetracycline-resistant *Escherichia coli* in a small stream receiving fish hatchery effluent. *Water, air soil and pollution*, 211, 251–259.

Stepanauskas, R.; Glenn, T.C.; Jagoe, C.H.; Tuckfield, R.C.; Lindell, A.H.; McArthur, J.V. 2005. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. **Environ. Sci. Technol.**, 39, 3671-3678.



Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Cadmium Removal from Aqueous Solution by Batch Studies Using A New Strain of *Pantoea agglomerans* UCP1320

Leonila M. L. Acioly^{1,5}, Davi Cavalcanti^{1,5}, Marcos C. Luna^{2,5}, José C. Vilar Júnior^{3,5}, Rosileide F. S. Andrade^{4,5}, Thayse A. de Lima e Silva^{4,5}, Paulo H. da Silva⁵, Carlos Alberto Alves da Silva⁵; Camilo E. La Rotta⁵ and Galba M. Campos-Takaki^{5*}

¹Program of Post-Graduation of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brazil. E.mail: leonila.acioly@gmail.com (L.M.L.A.); davicavalcanti25@gmail.com (D.C.)

²Northeast Network for Biotechnology-RENORBIO, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife-PE, Brazil. E.mail: marcos.cluna@gmail.com (M.C.L.)

³Autarchy of Higher Education of the Garanhuns (AESGA), 55295-380 Garanhuns, Pernambuco, Brazil. E.mail: carlos_vilar@hotmail.com (J.C.V.J.)

⁴National Post-Doctorate Program (PNPD)-CAPES, Catholic University of Pernambuco, 50050-900, Recife, Pernambuco, Brazil. E.mail: rosileide_fontenele@yahoo.com.br (R.F.S.A.); ithalv@yahoo.com.br (T.A.L.S.)

⁵Nucleous of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brazil. E. Mail: paulo_byly@hotmail.com (P.H.S.); calves@unicap.br (C.A.A.S.); camilo.larotta@pq.cnpq.br (C.LaR.); galba_takaki@yahoo.com.br (G.M.C.T.)

* Correspondence: galba_takaki@yahoo.com.br; Tel.: +55 81 21194017

Academic Editor: name

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract

Cadmium (Cd) which is a deadly heavy metal of work-related and environmental worry has been recognized as a substance that is teratogenic and carcinogenic to human. Therefore, the need to develop low-cost adsorbents for heavy metals removal from aqueous solution has greatly increased. We investigated the biotechnological potential of *Pantoea agglomerans* UCP 1320 to biosorption cadmium from water solution. *P. agglomerans* isolated from a laundry industry effluente was used to remove cadmium from aqueous solutions. Two approaches were compared using active or thermally inactivated biomass. Removals were performed using three different cadmium concentrations of 1, 10 and 100 ppm under constant stirring at temperatures of 25 and 35°C and pH of 3.0, 5.0 and 7.0; also variable incubation times at 1, 6, and 24 h were studied. The results demonstrated that the temperature did not influence the metal uptake by living cells nor by inactive bacterial biomass. However, the increase in pH showed a positive effect on the removal at intermediate concentrations of cadmium. Low concentrations of cadmium were completely removed by both live and inactive biomass. The studied with *Pantoea agglomerans* biomass showed a promising performance for the biotechnological removal of cadmium dissolved in aqueous solution.

Keywords: *Pantoea agglomerans*; pollution; heavy metal; biosorption; absorption isotherms.

1. Introduction

The constant discharge of different pollutants such as organic compounds and heavy metals into the environment is causing growing concern to the entire world. Several human activities have driven the increase in heavy metals in the environment. The question now is how to combat rising concentrations that jeopardize human and animal health. In parallel, scientific advances have dealt with how to exploit natural resources without provoking the detrimental effects caused by many old pollutants [1-3]. In this context, the use of bioremediation as a tool offers the possibility of removing or transforming these old pollutants into harmless compounds, based on the natural activity of several microorganisms. In addition, bioremediation has been gaining public attention and acceptance when it can be shown that this can be done at low cost, is effective, and it is feasible to apply it in locus. Compared to other non-biological technologies, bioremediation is one of the most promising and least costly alternatives for removing pollutants from soil, air and water [4-6].

The presence of heavy metals such as cadmium, chromium, lead, zinc, copper and mercury constitutes a constant threat to the environment since these metals tend to accumulate, thereby affecting several biological niches and biotas [7,8].

Cadmium is a hard degrading heavy metal, being known for its high binding capacity to biomolecules and especially to the enzymes present in the respiratory chain thus leading to oxidative stress and physiological problems including cancer [8,9]. Most cadmium is obtained as a by-product when smelting zinc, lead, or copper ores. Cadmium by-products are mostly used in metal plating and to make pigments, batteries, and plastics. This metal can be discharged into the soil in the form of urban and industrial sludge and wastewaters, phosphonated fertilizers, where its mobility is also determined by the intensity of the absorption and the reuse of contaminated streams in waste-water treatment stations. This metal can also be easily absorbed by and translocated in plants which are how it enters the food chain of humans and cattle. The results of some animal studies show that animals given cadmium-contaminated food and water develop high blood pressure, iron-poor blood, liver disease, nerve damage or brain damage [10,11].

Conventional methods of removing metals such as precipitation, oxidation or reduction have been commonly used to remove heavy metal from industrial wastewater. They are ineffective or expensive, however. Substitute methods of metal removal and revival based on biological resources have been considered. Certain types of microbial biomass can keep comparatively high quantities of metal by means of passive processes known as biosorption [12,13]. Such processes are of industrial interest, since the removal of potentially hazardous concentrations of cadmium can be achieved [14,15].

Microorganisms use mainly two different processes for transforming and immobilizing heavy metals. One is called bioaccumulation, which is based on incorporating the metal pollutant inside the living biomass. In the other main process called biosorption the metallic ions remain on the cellular surface by different mechanisms [16]. Both methods show variable advantages related to operational costs, volume of the residue to be treated and the biological waste to be disposed of detoxification and removal efficiencies, nutritional requirements and dilutions. However the biological removal process is quite efficient, fast and is performed under mild operational conditions [17].

In the aquaculture industry is currently controlled with copper as a biocide paints problem. The development of these activities has resulted in marine and freshwater sediments next to the culture centers high levels of copper. In this sense, *Pantoea agglomerans* showed a high

resistance for copper, as well as hability to copper removal. The authors suggest that marine bacteria could be a biologic model system for use in processes for removal this toxic metal [18]. This article describes the characterization of the biotechnological potential of the new strain of *Pantoea agglomerans* on the cadmium in aqueous solutions biosorption and bioaccumulation bioprocesses.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganism, culture media and conditions

Pantoea agglomerans is a Gram-negative bacterium that belongs to the family Enterobacteriaceae. The new bacterium was isolated from laundry effluent, identified as *Pantoea agglomerans* (UCP 1320), deposited at the Culture Collection UCP from the Catholic University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil, and registered in WFCC (World Federation for Culture Collection). The strain was cultivated in nutrient agar at 30°C, transferred to new medium every 4 months and kept under refrigeration at 5°C until it was used.

The biomass from *P. agglomerans* was obtained following the methodology described by Hernandez et al. (1998)[19]. The bacterium was cultivated overnight in free metal Luria-Bertani agar solid media [20] at 30°C. Then colonies were harvested and suspended in normal saline solution, centrifuged at 10.000g for 20 min at 10°C, and washed twice with the same solution and finally lyophilized. To obtain the inactivated biomass, the cell suspensions were submitted to autoclaving at 121°C for 15 min [21]. After cooling, cells were lyophilized and kept in a desiccator until constant weight.

2.2 Experiments of biosorption and bioaccumulation

These experiments were performed using 100 mg of active or inactivated biomass per each 250 ml flask filled with 100 mL cadmium chloride solutions of 1.0, 10.0 and 100.0 ppm of (Cd²⁺) in normal saline solution. The effect of pH was evaluated by adjusting the pH with HCl or NaOH (1 mol L⁻¹) to final values of 3.0, 5.0 and 7.0. Finally the effect of different temperatures was evaluated at 25 and 35°C. All assays were incubated for 24 h under continuous stirring at 150 rpm. Samples of (5mL) at T0, T1, T6 and T24 h were taken. All assays were performed in duplicate and also two samples were taken at each time.

2.3 Electrochemical method for Quantification of Cadmium

Each sample was centrifuged at 9.000 rpm for 20 min, and the cell free supernatants were used to quantify cadmium. Residual Cd (II) was analyzed by Anodic Stripping Voltammetry (ASV) and Square wave Voltammetry (SWV). Stripping analysis is an analytical technique that involves pre-concentration of a metal phase onto a solid electrode surface or into Hg (liquid) at negative potentials and the selective oxidation of each metal phase species during an anodic potential sweep [22,23]. Electrochemical analyses were performed using a 15 mL electrochemical cell. A glassy carbon electrode (0.5 cm in diameter) was used as a working electrode; a Platinum wire as a counter electrode and an electrode of Ag|AgCl in saturated KCl as a reference electrode. As support electrolytes, 100 mmol L⁻¹ solutions of H₃PO₄ or KCl were used. Quantification was performed from calibration curves of variable concentrations of Cd(II) as CdCl₂ in 20 mmol L⁻¹ HCl ranging from 1.0 to 20 ppm. Electrochemical parameters for ASV include: E_c = 0.6 V, T_c = 60 s, E_d = - 1.4 V and t_d = 60 s. And for SWV of: F = 25Hz; E₀ = -1.4 V, E_f = 0,0, E_{step} = 0.005 and wave width = 0.025 mV.

2.4 Determining removal and calculating absorption isotherms

Removal percentages were determined as per Equation 1:

$$\text{Removal, \%} = (\text{Co} - \text{Cf} / \text{Co}) * 100 \quad \text{Eq.1}$$

where Co corresponds to the initial concentration of Cd(II) and Cf, the final concentration after the sorption processes caused by the chitosan membrane. The metal uptake capacity, q_t for a Cd(II) ion was calculated as:

$$q_t = V/m (C_0 - C_f) \quad \text{Eq. 2}$$

where q_t , C_0 , C_f , V and m are the amount of solute adsorbed per unit weight of adsorbent (mg g⁻¹) at t (min), the initial metal ion concentration, the final metal ion concentration (mg L⁻¹), the volume (L) of the solution and the dry weight of adsorbent (g), respectively. The amount of cadmium adsorbed by adsorbents, q , was determined by:

$$q_e = V/m (C_0 - C_e) \quad \text{Eq. 3}$$

In this Equation, q_e and C_e are the amount of solute adsorbed per unit weight of adsorbent (mg/g) at equilibrium and the equilibrium concentration of cadmium (mg/L), respectively. The three most widely used adsorption isotherms are the Langmuir, Freundlich and Dubinin-Radushkevich (D-R) isotherms. In this study, experimental data were analyzed in terms of the Langmuir adsorption isotherm equation in linear form which is:

$$1/q_e = (1/q_{\text{max}} \cdot K_L) \cdot 1/C_e + 1/q_{\text{max}} \quad \text{Eq. 4}$$

Where q_{max} is the maximum adsorption capacity of adsorbent (mg/g) and K_L is the Langmuir constant related to the energy of adsorption (L mg⁻¹). K_L and q_{max} can be calculated from the slope and intercept of the linear plot of $1/q_e$ versus $1/C_e$.

3. Results

3.1 Effect of pH, temperature and incubation time over cadmium biosorption by biomass of *P. agglomerans*

As a control experiment, we used thermal inactivated cells of *P. agglomerans* in an attempt to determine if the removal was caused by the biomass itself (sorption processes) or by any other metabolic process involved (bioremediation processes). When the inactivated cells were put in contact with low concentrations of cadmium, very high to almost complete removal was achieved, with some interesting exceptions. Figure 1 shows the results in terms of the Cd (II) removal achieved with the inactivated cells of *P. agglomerans*, when incubated at temperatures of 25°C (A) or 35°C (B), respectively. As can be seen, noticeable increases were observed at 25°C, when the biomasses were incubated at higher pH values. This observation was even more evident when pH changed from 3.0 to 5.0, while between 5.0 and 7.0 the increase was almost insignificant. On the other hand, when the incubation period was extended up to 24 h, the highest removal of Cd (II) was achieved in pH values between 5.0 and 7.0. This amounted to the removal of 100% at 24 h. Conversely, at a higher temperature of 35°C maxima removals of 100% were achieved after 6 h of incubation. Numbered lists can be added as follows:

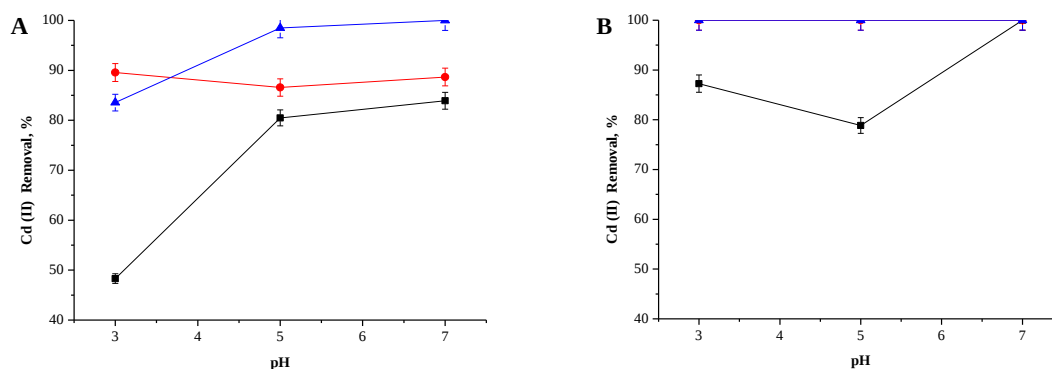


Figure 1. Cadmium adsorption (10 ppm) by inactivated cells of *P. agglomerans* at temperature of 25°C (A) and 35°C (B), respectively on pH 3 to 7. Incubation times of 1 h (square), 6 h (circle) and 24 h (triangle).

Figure 2 shows the effect of pH on the maxima cadmium removals achieved using living cells of *P. agglomerans*, incubated at 25 or 35°C in aqueous solutions containing 10 ppm of Cd(II). As can be observed, higher removal was achieved at lower temperatures and lower pH values. As such, the best overall results were obtained when *P. agglomerans* cells were incubated at pH 3.0 and 25°C. Interestingly, at the same incubation temperature, but with a pH of 7.0, a decrease of almost 20% in Cd (II) removal was observed, while at 35°C slight increases were observed at the same pH value. As we expected, the best results were achieved in all cases at higher incubation times. Thus, 100% of Cd (II) was removed from the aqueous solutions by the living cells after 24 h, no matter the pH value or incubation temperature.

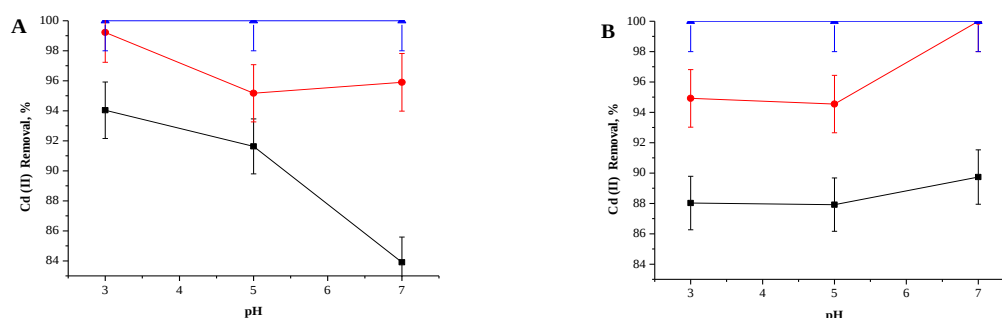


Figure 2. Cadmium adsorption (10 ppm) by living cells of *P. agglomerans* at 25 °C (A) and 35 °C (B), respectively on pH 3 to 7. Incubation times of 1 h (square), 6 h (circle) and 24 h (triangle).

Table 1, summarizes the results obtained for the maxima removals achieved using 10 ppm of Cd (II) and both active and inactivated cells of *P. agglomerans*. When living cells of *P. agglomerans* were used both removal processes are expected to happen simultaneously, one related to the cell metabolism and the other to physical interactions between the heavy metals and the biological structures existing in the cells.

The global removal was slightly higher than the one observed for the sorption process due only to physic-chemical interactions, especially when the processes were performed at the higher temperature of 35 °C. The best overall results were obtained at pH 6.0 and 35°C. Since these conditions are closely related to the physiological conditions where the bacterium grows, the increase in the removal can be expected to be related to the biological activity.

When the maxima removals observed by the inactivated cells were subtracted from the ones obtained for the living cells, real removal values were obtained corresponding only to the cellular metabolism. Therefore, a maximum removal of 15% was observed for bacterial metabolism at pH 5.0 and 35°C. Since the values for removal observed for all pH values tested at 25°C were close to each

other, this clearly indicates that the removal was mostly driven by the increase in the temperature rather than being due to pH at low concentrations of Cd (II).

Table 1. Comparison between Cd (II) maxima removals (10 ppm) due to biosorption or biotransformation using inactivated biomass and living cells of *P. agglomerans* incubated for 6 h.

Temperature/ pH	Both sorption and metabolic removal (%)		Sorption removal (%)		Real removal (%) due to bacterial metabolism	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
pH 3.0	99.22	94.92	89.56	87.26	9.66	7.66
pH 5.0	95.17	94.55	86.57	78.85	8.60	15.70
pH 6.0	95.90	100.0	88.66	100.0	7.24	0

3.2 Effect of Cd(II) concentration over biosorption

The effect of Cd (II) concentration was tested only up to 100 ppm since higher concentrations of these heavy metals are rarely found above this limit in waste-waters. As can be seen in Figure 3, the increase in Cd (II) removal followed when the incubation period was extended, and also when both the temperature and pH were increased when inactivated cells were used as sorbent material. No significant variations were observed between pH values at 25 or 35°C. However, 10% increases in variation were observed between 1h and 6 h of incubation and as was a 10% increase in removal when inactivated cells were incubated for up to 24 h at 25°C. Lower increases in removal of a maximum 10% were observed when cells were incubated at 35°C for up to 6 h and only 4% when incubated under the same conditions for up to 24 h.

In general, best results were achieved at pH 7.0 and 35°C after 24 h. In contrast, Figure 4 shows the results obtained for the removal of the same concentration of Cd (II) by active cells of *P. agglomerans*. As can be observed, when we increase the concentration of Cd(II) by one log, removal decreases to the half of the value observed at lower concentrations of this metal. In both Figures 4A and 4B, it can be observed that the best results were achieved at the lower incubation time of 1 h, and a slight increase in removal accompanied the increase in pH in all cases. For higher concentrations of Cd (II) no relationship can be established between temperature changes since no significant variations were observed at 25 or 35 °C. However, what remains obvious is the fact that at longer incubation times, the probability of desorption can be expected between 6 h and 24 h, since lower concentrations of Cd (II) were removed from the solutions. This can imply that the metal exerts toxicity on the cells, when they are able to remove up to 70 ppm of Cadmium, during the first hour, but then the metal caused cellular death and consequently for cellular lysis and fosters releasing the metal releasing back to the solution.

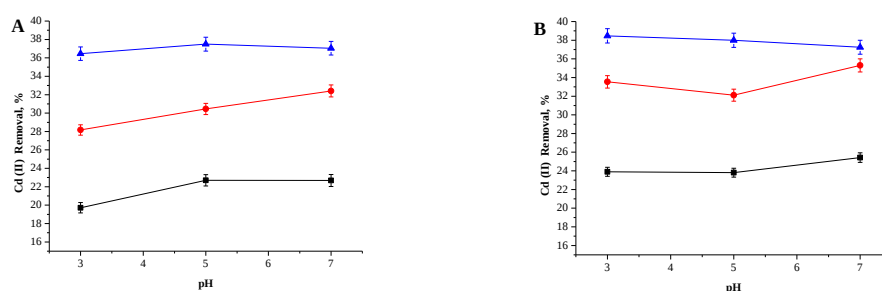


Figure 3. Adsorption of Cadmium (100 ppm) by inactivated cells of *P. agglomerans* at 25 °C (A)

and 35 °C (B), respectively on pH 3 to 7. Incubation times of 1 h (square), 6 h (circle) and 24 h (triangle).

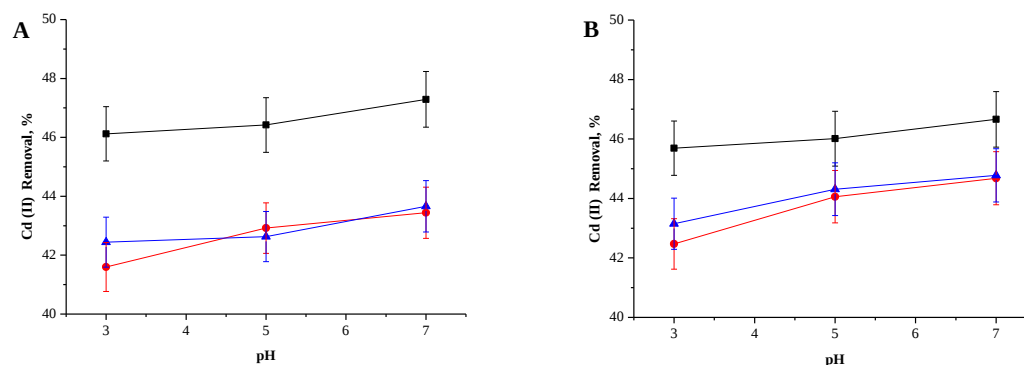


Figure 4. Cadmium adsorption (100 ppm) by living cells of *P. agglomerans* at 25 °C (A) and 35 °C (B), respectively on pH 3 to 7. Incubation times of 1 h (square), 6 h (circle) and 24 h (triangle)

Conversely, to the observations made at low Cd (II) concentrations, the best results were achieved only at longer incubation times. Table 2, shows the summarized results obtained at these times for the incubation conditions used for both inactivated and active cells of *P. agglomerans*. As can be seen, no significant differences were observed between maxima Cd (II) removal values when both sorption and metabolic removals corresponding to the living cells were evaluated. However, lower results were obtained for the sorptive processes due to only the inactivated biomass. As such, the average value of removal caused only by the metabolism of the living cells was close to 6.00 %.

Table 2. Comparison between Cd(II) maxima removals (at 100 ppm), due to biosorption or biotransformation using inactivated biomass and living cells of *P. agglomerans* incubated for 24 h.

Temperature/ pH	Both sorptive and metabolic removal (%)		Sorptive removal (%)		Real removal (%) due to bacterial metabolism	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
pH 3.0	42.44	43.15	36.46	38.47	5.98	4.68
pH 5.0	42.63	44.31	37.49	37.99	5.14	6.32
pH 6.0	43.66	44.78	37.05	37.25	6.61	7.35

Table 3 shows the removal rates calculated for each experiment during 24 h of incubation. It was observed that the overall highest rates of 6.032 and 6.638 ppm h⁻¹ were achieved at pH 7.0, 35°C and 100 ppm of Cd (II) for inactivated biomass and living cells, respectively. It must be noted that living cells of *P. agglomerans* also demonstrated good removal rates at pH 5.0 and 3.0 from low Cd (II) concentrations of 10 ppm.

Table 3. Cd (II) Removal rates (ppm h⁻¹) observed for active and inactivated cells of *P. agglomerans* under the conditions studied.

pH	Temperature °C	Cd (II) (ppm)	Inactivated Cells (ppm h ⁻¹)			Living Cells (ppm h ⁻¹)		
3.0	25	10	1.667	±	0.033	5.231	±	0.104
3.0	25	100	4.752	±	0.095	1.483	±	0.029
3.0	35	10	1.609	±	0.032	5.989	±	0.119
3.0	35	100	5.701	±	0.114	6.215	±	0.124
5.0	25	10	1.340	±	0.026	1.463	±	0.029
5.0	25	100	5.067	±	0.101	1.546	±	0.030

5.0	35	10	1.352	±	0.027	<u>6.276</u>	±	0.125
5.0	35	100	5.378	±	0.107	6.550	±	0.131
7.0	25	10	1.525	±	0.030	1.535	±	0.030
7.0	25	100	5.543	±	0.110	1.591	±	0.031
7.0	35	10	1.519	±	0.030	6.324	±	0.126
7.0	35	100	<u>6.032</u>	±	0.120	<u>6.638</u>	±	0.132

4. Discussion

Abbas et al. [13] described the data of bacteria (*Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa*, *Micrococcus* sp., *Thiobacillus thiooxidans*, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Actinomyces* sp, and *Micrococcus* sp) are well known for their high capacity to biosorption of biosorbent bacteria with metal sorbent at operating conditions. Those properties of cell wall constituents, such as peptidoglycan, and the role of functional groups, such as carboxyl, amine and phosphonate are related to their biosorption potential [17].

The cell wall is the first component of the bacterial physiology that comes into contact with the metallic ions, and this is where the solutes can be deposited over its surface or inside it [22, 23]. Since the absorption of solutes by inactive cells is mostly extracellular, the chemical moieties present on the cell call perform a key role during biosorption. In addition, the increase in pH promotes the formation of negative charged functional groups, by deprotonation which favors the electrostatic attraction and adsorption of cations [24].

This fact was clearly demonstrated when both active and inactivated cells of *P. agglomerans* were incubated at variable pH values. The efficiency of bioaccumulation by living cells depends on the conditions under which they grow their physiological state and age. For example, [25] mentioned that a pretreatment of *S. cerevisiae* cells with glucose 10 to 20 mmolL⁻¹ enhanced removal from 30 to 40% for Cd²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺. This observation was also related by Stoll [26] who studied the absorption of Cu²⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ by the same microorganism from galvanoplastic industrial effluents.

The results were surprising since the pre-treatment of yeast cell with glucose was more efficient than directly adding glucose to the effluent. Perhaps, the growth achieved with *P. agglomerans* in LB culture medium supplemented with glucose 1% caused the active or inactivated cells of this bacterium to increase their capacity to remove Cd (II).

The data obtained from the literature on the influence of pH on the biosorption of cadmium are inconsistent and some studies affirm that the pH could alter the adsorption of metallic ions by biomass, but other studies state that this also varies with the optimal pH values for the adsorbents (biomass), and the type of adsorbents [27–30].

Hou et al. [31], showed that the cadmium biosorption was most affected by pH and incubation temperature, being maximized at pH 5.0 and 30°C, and this strain of *Klebsiella* has approximately ten times the absorption capacity reported for other strains and is promising for the removal of heavy metals from waste water. Similar results were obtained to *Pantoea agglomerans* cadmium removal increased the absorption capacity by pH 5.0 and 6.0, and temperature of 25°C.

The optimal pH for Cd (II) adsorption for *Saccharomyces cerevisiae* is 6.5 described by Brady et al. [32] and maximum biosorption of cadmium(II) were also observed at pH 6 for filamentous fungi [33]. Also, Ozdemir et al. [34] using inactivated biomass from *Pantoea* sp. proved the optimal pH for Cd removal is at pH 6.0. Other studies using inactivated cells from different bacterial species such as *Ochrobactrum anthropi* showed optimal removal at pH 8.0 and for *Pseudomonas aeruginosa* PU21 pH 6.0 was also observed as the optimal condition [17,35].

In this study the effect of pH over the capacity of Cd absorption shows that living cells as well as inactivated biomass are also able to remove this metal efficiently at low pH values of 3.0. But it was also confirmed that on increasing pH up to 7.0, the sorption availability was even better in the case of the inactivated cells. As mentioned before, the medium pH could also affect the solubility of some ions, and their ionization state will determine their capacity to bind to the carboxylate and phosphohate groups present on the bacterial surface, these being powerful carriers of cations [34]. This strain of *P. agglomerans*, showed excellent removal capacity for Cd (II) at low concentrations of 1 ppm, in which both active and inactivated biomass were successful (data not shown).

The remaining concentrations of Cd (II) were of 0.016 ppm when *Weissella viridescens* and 0.089 ppm for *Lactobacillus* sp were used [39]. Also, four species of *L. mucosae* and *L. fermentum* reduced the initial Cd concentration to 0.074 ppm, while two strains of *Streptococcus lactolyticus* and two of *Enterococcus faecalis* showed residual concentrations of 0.651 and 0.633 ppm, respectively and strains of *Pediococcus pentosaceus* showed relatively low biosorption of 0.037 ppm [36]. These data justify once more the biotechnological potential use of *Pantoea agglomerans* as a biosorbent for environments polluted with heavy metals such as Cadmium (II).

5. Conclusions

In the present study, the complete Cadmium Cd (II) removal by *Pantoea agglomerans* from water by an electrochemical process has been investigated. According to the results from this study, we can affirm that the new strain *Pantoea agglomerans* UCP1320 is an efficient biosorbent for Cd (II) in concentrations ranging from 1 to 100 ppm. Living cells or inactivated cells showed optimal removal conditions at 35°C and pH ranging 5.0 to 6.0. The electrochemical processing as an efficient technology for heavy metals removal from water and that methodology has gained increasing interest. In the present study, the complete Cadmium Cd (II) removal by *Pantoea agglomerans* UCP1320 from water by an electrochemical process has been investigated. According to the results from this study, we can affirm that the new strain *P. agglomerans* UCP1320 is an efficient biosorbent for Cd (II) in concentrations ranging from 1 to 100 ppm. Living cells or inactivated cells showed optimal removal conditions at 35°C and pH ranging 5.0 to 6.0. The electrochemical processing as an efficient technology for heavy metals removal from water and that methodology has gained increasing interest.

Acknowledgments: The authors wish to thank the Brazilian Research Council - CNPq, Brazil, the Coordination for Improvement of Higher Level Education - CAPES, Brazil and the Foundation for Support of Science and Technology of the State of Pernambuco - FACEPE, Brazil, for fellowship to L.M.L.A. Special thanks are given to the Laboratory of Bioelectrochemistry at the NPCIAMB, Catholic University of Pernambuco for making facilities and infrastructure available for the conduct of this research.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "L.M.L.A., C.E.La R. and G.M.C.T. conceived and designed the experiments; L.M.L.A., D.C. and J.C.V.J. performed the experiments; L.M.L.A., M.C.L., P.H.S, R.F.S.A. and. analyzed the data; G.M.C.T. and C.E.La R. contributed reagents/materials/analysis tools; L.M.L.A., T.A.L.S., C.E.La R. and G.M.C.T. wrote the paper."

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Chong, M.N.; Jin, B.; Chow, C.W.K.; Saint, C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Res.* **2010**, *44*, 2997–3027, Doi: 10.1016/j.watres.2010.02.039.
2. Zeng, G.-M.; Li, X.; Huang, J.-H.; Zhang, C.; Zhou, C.-F.; Niu, J.; Li, Fei. Micellar-enhanced ultrafiltration of cadmium and methylene blue in synthetic wastewater using SDS. *J. Haz. Mat.*, **2011**, *185*, 1304–1310. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.10.046.
3. Lesmana, S.O.; Febriana, N.; Soetaredjo, F.E.; Sunarso, J.; Ismadji, S. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *44*, 19–41. Doi: 10.1016/j.bej.2008.12.009.
4. Kumar, A.; Bisht, B.S.; Joshi, V.D.; Dhewa, T. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *Int. J. Environ. Sci.*, (2011), *1*, 1079-1093. <http://www.ipublishing.co.in/jesvol1no12010/EIJES2061.pdf>
5. Ahemad, M. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. *Iioab J.* **2012**, *3*, 3, 2012: 39–46. <http://www.iioab.org/Vol3%283%292012/3%283%2939-48.pdf>
6. Seiler, C.; Berendonk, T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.*, **2012**, *3*, 1-10. Doi: org/10.3389/fmicb.2012.00399
7. Bhatnagar, A.; Minocha, A.K.; Sillanpaa, M. Adsorptive removal of cobalt from aqueous solution by utilizing lemon peel as biosorbent. *Bioch. Eng. J.*, **2012**, *48*, 181-186. Doi.org/10.1016/j.bej.2009.10.005
8. Manasi, V.R.; Kumar, A.S.K.; Rajesh, N. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent. *Chem. Eng. J.*, **2014**, *235*, 176-185. Doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.016
9. Kermani, J.N.; Ghasemi, M.F.; Khosravan, A.; Farhamand, A.; Shakibaie, M.R. Cadmium bioremediation by metal-resistant mutated bacteria isolated from active sludge of industrial effluent. *J. Environ. Health Sci. Eng.* **2010**, *7*, 279-286. <http://www.bioline.org.br/pdf?se10032>
10. Zhang, M.J.; Huang, F.K.; Wang, G.Y.; Liu, X.Y.; Wen, J. K.; Zhang, M X.S.; Huang, Y.S.; Xia, Y. Geographic distribution of cadmium and its interaction with the microbial community in the Longjiang River: risk evaluation after a shocking pollution accident. *Sci. Rep.* **2017**, *7*:227, 1-12. Doi: 10.1038/s41598-017-00280-y
11. Nogueira, P.F.M.; Nogueira, M.M.; Lombardi, A.T. Influence of the microbial loop on trophodynamics and toxicity of cadmium complexed by cyanobacterium exudates. *Envir. Sci.: Processes Impacts*, **2014**, *16*, 1029-1034. Doi:10.1039/C3EM00550J
12. Raras, A.G. Biological and biotechnological waste management in material processing, *J. Minerals, Metals & Mat. Soc.*, **1995**, *47*, 56-63. Doi.org/10.1007/BF03221411
13. Krishna, M.P.; Varghese, R.; Babu, A.V.; Mohamed Hatha, A.A. Bioaccumulation of Cadmium by *Pseudomonas* Sp. Isolated from Metal Polluted Industrial Region. *Envir. Res. Engineering Management*, **2012**, *61*, 58-64. <https://www.researchgate.net/publication/235792305>
14. Fomina, M.; Gadd, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Biores.Technol.*, **2014**, *160*, 3-14. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.102
15. Abbas, S.H.; Ismail, I.M.; Mostafa, M.T.; Sulaymon, A.H. Biosorption of Heavy Metals: A Review. *J. Chem. Sci. Tech.*, **2014**, *3*, 74-102.
16. Chojnacka, K. Biosorption and bioaccumulation--the prospects for practical applications. *Environ. Int.*, **2010**, *36*, 299-307. Doi: 10.1016/j.envint.2009.12.001
17. Kaduková, J.; Vircíkova, E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environ. Int.*, **2005**, *31*, 227-232. Doi: 10.1016/j.envint.2004.09.020
18. Corsini, G.; Vald , N.; Pradel, P.; Tello, M.; Cottet, L.; Mui o, L.; Karahanian, E.; Castillo, A.; Gonzalez, A. Draft Genome Sequence of a Copper-Resistant Marine Bacterium, *Pantoea agglomerans* Strain LMAE-2, a Bacterial Strain with Potential Use in Bioremediation. *Genome Announc.* **2016**, *4*, e00525-16. Doi: 10.1128/genomeA.00525-16
19. Sezonov, G.; Joseleau-Petit, D.; D'Ari, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.*, **2007**, *189*, 8746-8749. Doi: 10.1128/JB.01368-07

20. Chang, J.S.; Law, R.; Chang, C.C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*, **1997**, *31*, 1651-1658. doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00008-0
21. Sanna, G.; Pilo, M.; Piu, P.C.; Tapparo, A.; Seeber, R. Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, *415*, 165-173. doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00864-3
22. Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V.; Correa, M.A.; Cera, L.F.R.; Formariz, T.P. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos. *Quím.Nova*, **2004**, *27*, 131-138. http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol27No1_131_22-DV02192.pdf
23. Vijayaraghavan, K. ; Yun, Y.S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.*, **2008**, *26*, 266-291.
24. Chen, P.; Ting, Y.P. *Biotechnol. Lett.*, **1995**, *17*, 107-112. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.02.002.
25. Choi, S.B.; Yun, Y.S. J. Biosorption of Cadmium by Various Types of Dried Sludge: An Equilibrium Study and Investigation of Mechanisms. *Hazard. Mater.*, **2006**, *138*, 378-383. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.05.059
26. Kang, O.L.; Ramli, N.; Ahmad, M. Cadmium (II) Biosorption onto Seaweed (*Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma dendiculatum*). *Middle-East J. Scientific Res.*, **2012**, *11*, 867-872. <https://www.researchgate.net/.../55875eff08ae7bc2f44d36df.pdf?>
27. Mapolelo, M. ; Torto, N. Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Talanta*, **2004**, *64*, 39-47. doi.org/10.1016/j.talanta.2003.10.058
28. Stoll, A.; Duncan, J.R. Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.*, **1996**, *18*, 1209-1212. link.springer.com/article/10.1007/BF00128594
29. Sağ, Y.; Kutsal, T. Determination of the biosorption heats of heavy metal ions on *Zoogloea ramigera* and *Rhizopus arrhizus*. *Bioch. Eng. J.*, **2000**, *6*, 145-151. doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00083-8
30. Park, D. ; Yun, Y. ; Jo, J.H. ; Park, J.K. Comment on the Removal Mechanism of Hexavalent Chromium by Biomaterials or Biomaterial-Based Activated Carbons. *Eng. Chem. Res.*, **2006**, *45*, 5059-5065. Doi: 10.1021/ie0509387
31. Bhakta, J.N., Ohnishi, K. ; Munekage, Y. ; Iwasaki, K.; Wei, M.Q. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J. Appl. Microbiol.*, **2012**, *112*, 1193-1206. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2012
32. Michalak, I. ; Chojnacka, K.; Witek-Krowiak, A. State of the Art for the Biosorption Process—a Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2013**, *170*, 1389-1416.
33. Hou, Y. ; Cheng, K. ; Li, Z. ; Ma, Z. ; Wei, Y. ; Zhang, L. ; Wang, Y. *PLOS ONE*, **2010**, *10*, 1-23.
34. Brady, D. ; Glaum, D. ; Duncan, J.R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1994**, *18*, 245-250. Doi:10.1007/s12010-013-0269-0
35. Kiff, R. J. and Little, D. R., (1986). Biosorption of heavy metals by immobilized fungal biomass. In: Immobilization of Ions by Biosorption. Ed., Hunt EH. 1st. Ed., Ellis Horwood, Chichester, UK, 219.
36. Ozdemir, G.; Ceyhan, N.; Ozturk, T.; Akirmak, F.; Cosar, T. Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18 Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18. *Chem. Eng. J.*, **2004**, *102*, 249-253. doi.org/10.1016/j.cej.2004.01.032
37. Chang, J.S. ; Law, R.; Chang, C.C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 *Water Research*, **1997**, *31*, 1651-1658. doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00008-0
38. Ozdemir, G.; Ozturk, T.; Ceyhan, N.; Isler, R.; Cosar, T. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge *Bioresour. Technol.*, **2003**, *90*, 71-74.
39. Kinoshita, H.; Ohtake, F.; Ariga, Y.; Kimura, K. *Animal Sci. J.*, **2016**, *87*, 271-271. doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00088-9
40. Kinoshita, H.; Sohma, Y.; Ohtake, F.; Ishida, M.; Kawai, Y.; Kitazawa, H.; Saito, T. ; Kimura, K. Biosorption of Heavy Metals by Lactic Acid Bacteria and Identification of Mercury Binding Protein. *Res. Microbiol.*, **2013**, *164*, 701-709. Doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.004