AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**BIOSSORÇÃO DE CHUMBO E MERCÚRIO PELAS LINHAGENS SELVAGEM E
RECOMBINANTE DE *C. metallidurans* EM MEIO AQUOSO**

BIANCA PIRILO CONICELLI

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis**

**São Paulo
2017**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**BIOSSORÇÃO DE CHUMBO E MERCÚRIO PELAS LINHAGENS SELVAGEM E
RECOMBINANTE DE *C. metallidurans* EM MEIO AQUOSO**

BIANCA PIRILO CONICELLI

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis**

Versão Corrigida

**São Paulo
2017**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais **Vânia e Roberto** (in memorian) e ao meu irmão **Bruno Conicelli**. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Essa conquista não é só minha, mas nossa. Agradeço pela paciência, compreensão e carinho.*

*Estendo esta dedicatória ao meu namorado **Bruno Moda**, pelo amor, amizade, carinho e companheirismo de sempre. Por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional.*

AGRADECIMENTOS

- Ao IPEN, pela oportunidade deste trabalho;
- Dr. Jorge Sarkis, pela orientação e apoio na execução do trabalho;
- Ao Marcos Hortellani por todas as análises realizadas por meio da técnica de Absorção atômica, além da colaboração em discussões teóricas e praticas ao longo do projeto.
- Ao João Ulrich por toda colaboração e manutenção do sistema de qualidade no laboratório.
- A Dra. Ana Schemberg pela oportunidade de parceria e pelo apoio e incentivo ao projeto.
- Ao Dr. Goro pelo auxílio e paciência ao longo da execução e interpretação das isotermas.
- Aos grandes amigos do IPEN: Mariana, Cristina, Mauricio, Marcelo, Bianca, Ana, Gustavo, Isabela e Luciana pelo apoio ao longo do trabalho.
- Aos professores que passaram na minha vida ao longo das disciplinas do mestrado.
- A Dona Marta, pelo sagrado café diário.
- Aos funcionários da limpeza, fundamentais para a qualidade de vida e do trabalho.
- Aos amigos e funcionários do ICB: Felipe, Thais, Halph, Tadeu, Iris, Letícia e Raquel que me acolheram e me ensinaram da melhor forma possível.
- Ao apoio financeiro CAPES.
- A minha cunhada querida Nataly Aranda por todo carinho e apoio.
- Aos amigos e familiares que sempre me incentivaram e me apoiaram.

BIOSSORÇÃO DE CHUMBO E MERCÚRIO PELAS LINHAGENS *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3) EM MEIO AQUOSO

Bianca Pirilo Conicelli

RESUMO

Nas ultimas décadas o processo de bioissorção tem alcançado grande relevância no tratamento de efluentes contendo metais potencialmente tóxicos. O uso de bactérias nesse processo tem obtido destaque, uma vez que possuem inúmeras vantagens. O presente estudo pretendeu avaliar o mecanismo envolvido no processo de bioissorção dos íons Pb(II) e Hg(II) por meio das linhagens *Cupriavidus metallidurans* (CH34) e *Cupriavidus metallidurans* (CH34/pCM3). Dentre os modelos estudados a isoterma de Langmuir foi a que melhor se ajusta ao processo de adsorção, apresentando uma capacidade máxima de adsorção (q_{max}) de 0,98 mg.g⁻¹ para o Hg(II) e 86,2 mg.g⁻¹ para o Pb(II), para a linhagem selvagem. Já para a linhagem recombinante o q_{max} obtido foi 3,4 mg.g⁻¹ para o mercúrio e 172,4mg g⁻¹ para o chumbo. Baseado nos valores referentes à energia livre de Gibbs (ΔG) o processo de retenção ocorreu de forma química e espontânea. A influencia do pH foi avaliada por meio de estudo competitivo entre os íons metálicos, em níveis equimolares. O valor que melhor contemplou a adsorção para ambos os íons foi o pH 7,0, tendo o Pb(II) demonstrado maior capacidade de retenção. Em pH 2,0 houve maior retenção do Hg (II), já em pH 10,0 o Pb(II) obteve maior retenção. Indicando que o meio influencia diretamente na competição dos íons metálicos pelos sítios ativos. Constatou-se que a retenção do metal é robusta e estável ao longo de 6 meses. Os resultados indicam que a *Cupriavidus metallidurans* (CH34/pCM3) pode ser uma boa opção para bioissorção de íons metálicos por meio de biorreator.

Palavras-Chave: Biorremediação; Bioissorção; Bactéria; Metais; Contaminação; *Cupriavidus metallidurans*.

**BIOSORPTION OF LEAD AND MERCURY BY STRAINS *C. metallidurans* (CH34)
AND *C. metallidurans* (CH34 / pCM3) IN AQUEOUS.**

Bianca Pirilo Conicelli

ABSTRACT

In the last decades the biosorption process, has achieved great relevance treatment of effluents containing toxic metals. The use of bacteria in the process has several advantages. This study aimed to evaluate the mechanism involved in the biosorption process of Pb (II) and Hg (II) ions by *C. metallidurans* (CH34) and *C. metallidurans* (CH34/pCM3) genetically modified strain. The Langmuir isotherm was the best adjusts to the adsorption process. The maximum adsorption capacity (q_{max}) of 0.98 mg.g⁻¹ for Hg (II) and 86.2 mg.g⁻¹ to Pb (II), for a wild strain (pH 7,0). However, for a recombinant strain, the q_{max} was 3.4 mg.g⁻¹ for mercury and 172.4 mg.g⁻¹ for the lead (pH 7,0). Based on the Gibbs free energy (ΔG) values on the adsorption process, it occurred chemically and spontaneously. The Hg(II) presented high adsorption capacity at pH=2 in comparing with Pb(II). While Pb(II) presented high adsorption capacity at pH=10. The studies of binding process was robust and stable for 6 months. The results indicate that *Cupriavidus metallidurans* (CH34/pCM3) can be a good option for biosorption of metal in a bioreactor.

Keywords: Bioremediation; Biosorption; Bacteria; Metals; Contamination; *Cupriavidus metallidurans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	4
3	FUNDAMENTOS TEORICOS	5
3.1	Biorremediação	5
3.2	Biossorção	6
3.2.1	Mecanismos de Biossorção	6
3.2.2	Bactérias no processo de biossorção	9
3.3	Biотecnologia em processos biorremediadores	12
3.4	Bactéria <i>Cupriavidus metallidurans</i> (CH34)	12
3.5	Contaminação ambiental por metais	15
4	METODOLOGIA	17
4.1	Preparação do meio TSM	17
4.2	Preparação de solução-mãe de Pb (II) e Hg(II)	17
4.3	Condições de cultivo bacteriano	17
4.4	Exposição bacteriana a variadas concentrações de metal	17
4.5	Biossorção competitiva frente à variação do pH	18
4.6	Estabilidade de adsorção de metais	18
4.7	Avaliação de dados	18
4.7.1	Isoterma de Freundlich	19
4.7.2	Isoterma de Langmuir	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Recuperação dos íons Hg(II) e Pb(II) pelas linhagens <i>C. metallidurans</i> (CH34) e <i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	21
5.2	Isotermas de Langmuir e Freundlich para o íon mercúrio pelas linhagens <i>C. metallidurans</i> (CH34) e <i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	23

5.3	Comparação da capacidade máxima de retenção de Hg(II) entre diferentes biomassas encontradas na literatura	28
5.3.1	Bactérias	29
5.3.2	Fungos	29
5.3.3	Leveduras	30
5.3.4	Algas	30
5.4	Isotermas de Langmuir e Freundlich para o íon chumbo (Pb(II)) pelas linhagens <i>C. metallidurans</i> (CH34) e <i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	31
5.5	Comparação da capacidade máxima de retenção de Pb(II) entre diferentes biomassas encontradas na literatura	35
5.5.1	Bactérias	36
5.5.2	Fungos	36
5.5.3	Leveduras	37
5.5.4	Algas	37
5.6	Determinação da energia livre de Gibbs do processo de adsorção de Hg(II) e Pb(II) pelas linhagens selvagem e recombinante	37
5.7	Estabilidades de adsorção de metais	38
5.8	Biossorção competitiva em sistema binário frente a variações de pH	39
6	CONCLUSÃO	44

INDICE DE TABELAS

Tabela 1	Mecanismos e características dos processos de bioissorção.	8
Tabela 2	Estudos de bioissorção utilizando bactérias como biomassa	10
Tabela 3	Recuperação do mercúrio frente a diferentes concentrações do metal, pelas linhagens <i>C. metallidurans</i> (CH34) e <i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3).	21
Tabela 4	Recuperação do chumbo frente a diferentes concentrações do metal, pelas linhagens <i>C. metallidurans</i> (CH34) e <i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	22
Tabela 5	Constantes de adsorção de Hg(II) em estirpes selvagens (<i>C. metallidurans</i> (CH34)) e recombinantes (<i>C. metallidurans</i> (CH34 / pCM3))	28
Tabela 6	Constantes de adsorção de Pb(II) pelas linhagens selvagens (<i>C. metallidurans</i> (CH34)) e recombinantes (<i>C. metallidurans</i> (CH34 / pCM3))	35
Tabela 7	Determinação da energia livre Gibbs do processo de adsorção de Hg(II) e Pb(II) pelas estirpes recombinantes (<i>C. metallidurans</i> (CH34 / pCM3))	37
Tabela 8	Bioissorção competitiva entre 1,6mg.l de Hg(II) e 1,6mg.l de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante	40
Tabela 9	Bioissorção competitiva entre 1,6mg.l de Hg(II) e 80mg.l de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante	41

Tabela 10	Biossorção competitiva entre 1,6mg.l de Hg(II) e 160mg.l de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante.	42
Tabela 11	Biossorção competitiva entre 0,4mg.l de Hg(II) e 160mg.l de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema geral das etapas para a definição e implementação de um processo de biorremediação	6
Figura 2	Processo de equilíbrio de biossorção	7
Figura 3	<i>Cupriavidus metallidurans</i> (CH34).	14
Figura 4	<i>Cupriavidus metallidurans</i> (CH34/pcm3)	14
Figura 5	Isoterma de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	24
Figura 6	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	24
Figura 7	Isoterma de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	25
Figura 8	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	25
Figura 9	Isoterma de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	26
Figura 10	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	26

Figura 11	Isoterma de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	27
Figura 12	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	27
Figura 13	Isoterma de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	31
Figura 14	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	31
Figura 15	Isoterma de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	32
Figura 16	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C	32
Figura 17	Isoterma de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	33
Figura 18	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	33
Figura 19	Isoterma de freudlic para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	34
Figura 20	Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C	34

Figura 21	Estabilidade de adsorção da linhagem recombinante com Pb(II) após seis meses	38
Figura 22	Estabilidade de adsorção da linhagem recombinante com Hg(II) após seis meses.	39

1 INTRODUÇÃO

A água desempenha um papel fundamental na manutenção da vida na Terra. Atualmente, a contaminação dos sistemas aquáticos é um dos maiores desafios para as agências governamentais de meio ambiente (Pokethitiyook e Poolpak, 2016; Csuros e Csuros, 2016). Essa contaminação pode ocorrer através de processos naturais como, intemperismo, erosão, erupções vulcânicas, ou mesmo por atividades antrópicas oriundas da ocupação desordenada do solo, falta de saneamento básico, presença de lixões, uso de agrotóxicos e fertilizantes na agricultura, atividade de mineração e processos industriais os quais são comumente utilizados e possuem uma alta geração de resíduos (Liao et al., 2016, Yousefi et al., 2016, Csuros, M. e Csuros, C., 2016).

No Brasil, a legislação relativa ao descarte de rejeitos é gerenciada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o qual define quais os padrões de qualidade devem ser respeitados nos sistemas de tratamento de efluentes. De acordo com os art.3º da resolução CONAMA de 2011:

Art. 3º - Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis.

Entretanto essa norma nem sempre é cumprida, causando grandes impactos ambientais e na saúde da população.

Sabe-se que, diariamente, toneladas de metais potencialmente tóxicos são liberadas no meio ambiente por meio de diversas fontes. O impacto ao meio ambiente e a saúde humana está diretamente relacionado aos níveis presentes o que torna seu controle e remoção, principalmente em áreas altamente expostas, de extrema importância não só no que diz respeito à preservação do ambiente como também para a saúde humana.

Nos tratamentos convencionais para a remoção dos íons metálicos, são utilizados produtos químicos para a precipitação, coagulação, redução, adsorção e troca iônica. No entanto, o uso de tais processos são, muitas vezes, inadequados devido a aspectos referentes à

complexidade técnica, problemas ambientais e econômicos (Acosta et al., 2005; Martins, 2004).

Com o intuito de garantir o tratamento de ambientes contaminados por metais, de uma forma limpa e menos impactante, a bioadsorção surgiu como um processo viável, e atualmente é um dos mais estudados. Trata-se da utilização de biomassa (viva ou morta) na adsorção de compostos de forma passiva, isto é, por meio de interações físico-químicas entre os grupos funcionais na superfície do bioadsorvente (Volesky, 2001). Há uma grande variedade de materiais utilizados nesse processo, tais como, as fibras de coco, casca de banana, materiais de origem animal, entre outros. Entretanto, leveduras, fungos, algas e bactérias são os mais utilizados para a bioadsorção de metais (Bulgariu et al., 2015; Praveen et al., 2015; Gupta et al., 2016; Hansda e Kumar 2016; Yan e Viraraghavan, 2003; Raffar et al., 2015; Lee et al., 2015; Abourached et al., 2014; Garcia et al., 2016). As paredes celulares dos micro-organismos geralmente são constituídas de polissacarídeos e proteínas, grupos funcionais que auxiliam na adsorção dos íons metálicos.

As leveduras podem ser usadas sem tratamento prévio na remoção de metais do meio (Vieira e Volesky, 2000). Azevedo e colaboradores (2014) estudaram a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* utilizando o íon cobre (Cu^{2+}), apresentando 0,6 mg.g⁻¹ de adsorção. Já no estudo de Amirnia e colaboradores (2015) utilizaram-se da *S. cerevisiae* em sistema de biorreator contínuo para o íon metálico Pb(II), obtiveram 29,9 mg.g⁻¹ de adsorção.

Os estudos com fungos no processo de bioadsorção foram realizados por Souza e colaboradores (2008) utilizando a *Saprolegnia subterranea* (SPC 1244) para adsorção de Cu(II), a capacidade máxima de adsorção foi $q_{\text{max}} = 7,48 \text{ mg.g}^{-1}$, já para a *Pythium torulosum* (SPC 1425) a adsorção de manganês (Mn^{2+}) foi $q_{\text{max}} = 4,13 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto que para a *S. subterranea* (SPC 1431) a adsorção de cádmio (Cd^{2+}) foi $q_{\text{max}} = 6,75 \text{ mg.g}^{-1}$. No estudo realizado por Buratto e colaboradores (2012) utilizaram *Pleurotus ostreatus* como bioadsorvente, sendo capaz de remover íons metálicos de Cu(II) de soluções aquosas, resultando em uma adsorção máxima de 380,30 mg.g⁻¹ do íon metálico.

As algas são autotróficas, grande parte são unicelulares e não possuem verdadeiras raízes, caules ou folhas (Raven e Johnson, 1986). As algas possuem estruturas que podem ser

divididas em pequenas partículas de biossorvente, esse fator aumenta a área de contato para a adsorção do íon (Vieira e Volesky, 2000; Kiran et al., 2006). Estudo de Oliveira (2016) com *Ascophyllum nodosum* utilizou o íon Cu(II) e obteve 2.25 mg.g⁻¹ de capacidade de retenção. No estudo de Bertagnolli e colaboradores (2014), foi utilizada a alga marinha brasileira *Sargassum filipendula* para remover cromo (Cr (VI)) e Cr (III) de soluções aquosas. A aplicação do modelo de Langmuir aos dados de equilíbrio mostrou uma capacidade máxima de biossorção (q_{max}) para o Cr(VI) (0,819mmol g⁻¹) em comparação com o Cr (III) (0,635 mmol g⁻¹).

Nos últimos anos as bactérias vêm sendo amplamente estudadas no processo de biossorção, uma vez que possuem inúmeras vantagens, tais como: (Beveridge, 1989; Michalak et al., 2013)

- Baixo custo;
- Abundância em número;
- Possuem uma grande área de contato;
- Podem biorremediar grandes concentrações de contaminantes;
- Podem ter resistência a concentrações elevadas de íons metálicos;
- Tem a possibilidade da realização de alterações genéticas, a fim de aumentar a capacidade de biossorção do metal.

Sua utilização, entretanto, depende do conhecimento dos mecanismos presentes no processo, assim como os fatores externos envolvidos.

2 OBJETIVO

Estudar o mecanismo envolvido no processo de bioabsorção dos íons Pb(II) e Hg(II), em meio aquoso, através da *Cupriavidus metallidurans*, linhagens selvagem (CH34) e recombinante (CH34/pCM3).

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Biorremediação

A biorremediação é um processo inovador, pelos quais poluentes são removidos ou reduzidos do meio ambiente através de organismos vivos. Para isso, ocorre o envolvimento de ações enzimáticas na degradação ou transformação de compostos. Em muitos casos são utilizados de biotecnologia para aumentar a eficiência no tratamento de ambientes contaminados (Tonini et al., 2010). É considerada apropriada para o tratamento de áreas contaminadas, uma vez que apresenta algumas vantagens:

(Borges e Barroso, 1997; Andrade et. al., 2010; Tonini, et al., 2010)

- São tecnologias consideradas seguras;
- O processo é mais rápido do que a maioria dos tratamentos físico-químicos;
- Utilizam sistemas biológicos;
- Na maioria dos casos são de baixo custo;
- Podem ser reutilizáveis;
- Podem apresentar seletividade a metais específicos;
- Podem promover elevados valores de acumulação ou adsorção dos contaminantes.

Em se tratando de microrganismos biorremediadores, o processo ocorre de diversas formas, por exemplo, por adsorção na superfície celular ou por formação de complexos intracelulares. A exposição de microrganismo a altas concentrações de metais pode causar a morte celular. Entretanto, determinadas microbiotas tendem ao aumento na capacidade de resistência a esses íons. A interação entre microrganismos e metais, ao longo da evolução, permitiu a resistência dos sistemas biológicos à toxicidade desses íons (Silver e Phung, 2005).

Existem fatores físico-químicos que podem influenciar na eficácia da biorremediação, tais como: pH, temperatura, umidade, teor de O₂ dissolvido e a composição química do poluente (Gaylarde et al., 2005; Yu, et al. 2013; Silva, 2013). A biorremediação é uma tecnologia complexa e sua implementação ocorre em etapas que compreendem um estudo do ambiente, do tipo de contaminante e dos riscos (Fig. 1)

FIGURA 1: Esquema geral das etapas para a definição e implementação de um processo de biorremediação. A figura 1 representa as etapas necessárias para a aplicação da biorremediação. O processo de biossorção se encontra inserido no processo. Primeiramente é necessária a avaliação do ambiente, logo após ocorre a caracterização da contaminação e dos microrganismos mais adequados para a situação, a partir disso pode-se realizar o estudo de biossorção, a fim de avaliar a interação entre o contaminante e o microrganismo em questão.

3.2 Biossorção

3.2.1 Mecanismos de biossorção

O envolvimento da biomassa com os metais no processo de biossorção ocorre devido às propriedades físico-químicas do biossorvente, independente de atividade biológica (Volesky, 2003). A remoção de íons metálicos ocorre por meio do contato com a superfície

celular. A bioissorção é diferente da bioacumulação, que ocorre quando há a captação de um íon ou espécie metálica por meio de material biológico com atividade metabólica.

O processo de bioissorção envolve uma fase sólida (adsorvente) e uma fase líquida (solvente) que contém as espécies dissolvidas que serão adsorvidas (adsorvato ou soluto, por exemplo os íons) através da grande afinidade do adsorvente pelas espécies do adsorvato. O adsorvato é atraído pelo sólido e capturado por diferentes mecanismos (Tab.1), o processo continua até atingir o equilíbrio entre os íons adsorvidos (capturados) e os íons dissolvidos (Fig. 2).

FIGURA 2: Processo de equilíbrio de bioissorção

A captura dos íons das espécies metálicas pode acontecer por diferentes mecanismos que ocorrem de forma isolada ou combinados (Tab.1).

TABELA 1: Mecanismos e características dos processos de biossorção (Pino, 2005 modificado)

Tipo de adsorção	Mecanismo	Características
Química	Complexação	Formação de compostos devido à associação de duas ou mais espécies.
Química	Coordenação	Átomo central de um complexo unido a outros átomos por ligações covalentes.
Química	Quelação	Formam-se quelatos que são complexos nos quais há um composto orgânico unido ao metal.
Química	Troca iônica	Intercambio de íons que se encontram formando espécies moleculares ou atômicas com a perda ou ganho de elétrons.
Física	Adsorção	Moléculas aderem-se a uma superfície sólida, devido a cargas eletrostáticas.
Física	Microprecipitação	Ocorre quando há variação nas condições do sistema próximo da superfície da biomassa, como exemplo, a variação do pH que pode levar a uma precipitação.

O processo de bioadsorção depende principalmente do grau de afinidade entre o metal e o sítio ativo, resultando em diferentes tipos de ligações. (Hancock et al., 1999; Duncan & Brady, 1994; Martins, 2004). Diversos fatores influenciam na capacidade da célula em sequestrar metais, tais como (Volesky, 1990):

- Tipo de metal,
- Sua forma iônica em solução,
- Tipo do sítio ativo de ligação responsável pela captura do metal.
- Temperatura
- Eventual presença de nutrientes ou outros metais
- pH

O valor do pH da solução é um dos fatores que mais afeta a sorção de metais. A adsorção aumenta com o aumento do valor de pH, isso ocorre devido ao aumento da densidade de carga negativa na solução, gerando sítios ativos para interação com o metal. A alteração no pH pode causar a precipitação dos metais ou ainda a complexação dos metais com ligantes solúveis liberados pelo bioadsorvente, diminuindo a capacidade de remoção destes metais (Kleinubing et al., 2010). Valores extremos de pH pode danificar a estrutura da biomassa e alterar o sítio ativo de ligação. Sendo assim, ocorrem limitações na faixa de pH viável para o estudo da bioadsorção. É sabido que para a maioria dos metais a adsorção aumenta com o pH mais básico. Por outro lado, com valores muito altos de pH pode causar a precipitação dos complexos metálicos, e por tanto devem ser evitados nos estudos de sorção (Kleinubing et al., 2010). Diversas biomassas são comumente utilizadas no processo de bioadsorção. Entretanto as bactérias são as que trazem mais vantagens nesse processo.

3.2.2 Bactérias para o processo de bioadsorção

As bactérias pertencem ao reino Monera, são seres unicelulares, procariontes e podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias. Os grupos funcionais presentes nas paredes celulares bacterianas são diretamente responsáveis pela reatividade destas células. Todas as superfícies das bactérias possuem interação com os metais dissolvidos no meio. Isso ocorre

mesmo contendo diferentes formas na superfície celular, proveniente das diferentes espécies de bactérias existentes (Kulczycki et al., 2002).

Fein e colaboradores, (1997), descrevem que as paredes das células bacterianas possuem carga negativa quando em pH ácido. Possibilitando que os grupos funcionais da parede celular tenham um certo grau de afinidade com os íons metálicos em solução. Nos estudos de Quintelas e Tavares, (2002), foi possível verificar que alguns metais apresentam maior afinidade de adsorção do que outros. Nesse estudo o Cd(II) apresentou uma capacidade de adsorção muito inferior ao Cr(II). Entretanto os que obtiveram maior capacidade de retenção foram os íons chumbo (Pb^{2+}) e o ferro (Fe^{2+}), esse resultado pode ser justificado pela maior afinidade destes metais com os sítios de ligação à bactéria. Esta maior afinidade pode ter se dado devido a atração exercida pela carga negativa das células sobre os cátions ferro e chumbo. Outro fator que deve ser levado em consideração é o elevado peso atômico do chumbo e o pequeno raio iônico do ferro, contribuindo para uma melhor retenção. Na tabela 2 encontram-se alguns estudos de bioadsorção com diferentes íons metálicos em bactérias.

TABELA 2: Estudos de bioadsorção utilizando bactérias.

Bactéria	Metal	Adsorção	Referência
<i>Bacillus sp</i>	Cu (II)	16,3 (mg / g)	Tunali et al., 2006
<i>Arthrobacter viscosus</i>	Cr (VI)	20,3 mg / g	Hlihor et al., 2016
<i>Exiguobacterium sp.</i>	Cd(II)	15,6 mg/g	Park e Chon, 2016
<i>Bacillus altitudinis</i>	Hg(II)	19,5mg/g	Ozdemir et al., 2017
<i>K. pneumoniae</i>	Hg(II)	150mg.L	Al-Garni et al., 2010
<i>P. aeruginosa</i>	Hg(II)	100mg.L	Al-Garni et al., 2010
<i>Enterobacter cloacae</i>	Hg(II)	150mg.L	Suriya et al, 2013

<i>Rhodococcus opacus</i>	Hg(II)	37,9 mg.g-1	Abbud, 2010
<i>Bacillus altitudinis</i>	Hg(II)	19,5mg/g	Ozdemir et al., 2017
<i>Bacillus sp.</i>	Hg(II)	0.2 g (peso seco) de biomassa removeram de 0.02 mg (para 0.25 mg/l de Hg(II) (II)) até 0.68 mg (para 10.0 mg/l Hg(II) (II))	Carlos Green-Ruiz, 2006
<i>Bacillus pumilus</i>	Pb(II)	28.06 mg g-1	Colak et al 2011
<i>Bacillus cereus</i>	Pb(II)	22.1 mg g-1	Colak et al 2011
<i>Bacillus thioparans U3</i>	Pb(II)	90.1 mg g-1	Tirado et al., 2012
<i>Rhodococcus opacus</i>	Pb(II)	94,34 mg g-1	Bueno, 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pb(II)	79.5 mg g-1	Chang et al., 1997
<i>Bacillus SP (cepa C16)</i>	Pb(II)	0,53 mg.g	Garcia et al., 2016
<i>Bacillus sp</i>	Pb(II)	9,30 mg.g-1	Jin et al., 2015
<i>Bacillus altitudinis</i>	Pb(II)	35,2 mg / g	Ozdemir et al., 2017

3.3 Biotecnologia em processos biorremediadores

A biotecnologia pode contribuir muito para uma nova forma de desenvolvimento, sustentável. Existe uma variedade imensa de materiais biológicos com capacidade de reter metais do meio ambiente. A utilização de técnicas de engenharia genética pode ser amplamente empregada para aumentar a eficiência de certos materiais biológicos para a biorremediação, principalmente os microrganismos (Urgun-Demirtas et al., 2006).

Muitas linhagens bacterianas possuem determinantes genéticos presentes nos plasmídeos para a resistência a toxicidade dos íons metálicos (Nies, 1992). Os plasmídeos não são essenciais para o crescimento celular, entretanto influenciam nas características dessas células, como por exemplo, os de resistência a metais e a antibióticos, amplamente estudados.

Hu e colaboradores, (1996), utilizaram a *Pseudomonas aeruginosa* (CSU), uma linhagem recombinante de uma bactéria, capaz de remover concentrações maiores de urânio quando comparada com algumas algas e fungos. Zhao e colaboradores, (2005), estudaram a sorção de mercúrio pela bactéria *E. coli* geneticamente modificada (JM109). Sua linhagem selvagem foi capaz de remover 1mg/L de mercúrio (Hg^{2+}) e a recombinante removeu 7,4mg/L de Hg(II).

3.4 Bactéria *Cupriavidus metallidurans* (CH34)

Cupriavidus metallidurans (CH34) foi isolada da água residual de uma fábrica de zinco na Bélgica. Posteriormente também foi encontrada em uma mina de ouro na Austrália. É Gram-negativa, não patogênica, capaz de crescer em altas concentrações de cerca de treze íons metálicos (Borba, 2010; Reith, et al., 2010). É de grande interesse e bastante estudada atualmente, pois é considerado um exemplo de organismo para a adsorção de metais, além de ser excelente para fins biotecnológicos.

Sua temperatura ótima de crescimento é de entorno de 30°C, capaz de crescer autotroficamente em meio mineral, heterotroficamente na presença de compostos orgânicos e anaerobicamente com nitrato. É quimiolitotrófica, podendo crescer utilizando H_2 como fonte de energia e CO_2 como fonte de carbono. (Goris, et al., 1998 Biondo, 2012; Borba, 2010).

Recentemente foi descoberto que a *C. metallidurans* (CH34), quando em contato com o elemento ouro (Au), realiza produção de biofilmes, a fim de que o Au fique adsorvido na camada de polissacarídeo e não entre na célula. Outro mecanismo realizado por essa bactéria trata-se da acumulação de partículas de ouro no interior da célula de forma que ele não interfira com o seu metabolismo (Reith et al., 2009; Wiesemann et al., 2013; Fairbrother et al., 2013). Já no estudo de Borba (2010), foi demonstrado que a bactéria *Cupriavidus metallidurans* (CH34) tem alta capacidade de biorremocão de rejeitos radioativos, tendo removido em média de 95% de Amerício (Am-241) em solução nas concentrações de 75, 150 e 300 Bq/mL a partir de apenas 1 hora de contato e, em 6 horas de contato, a remoção média foi de 99,6%.

A resistência de *C. metallidurans* (CH34) a íons metálicos ocorre pela presença de cerca de 150 genes de resistência junto a presença de dois megaplasmídeos (pMOL30 (234 Kb) e pMOL28 (171Kb)), muito importantes no processo de efluxo de cátions (Mergeay et al., 2003). Esse mecanismo de resistência é muito eficiente na detoxificação do citoplasma, entretanto não é considerado bom para a finalidade de biorremediação. Todavia, é possível tirar proveito da alta resistência aos metais que essa bactéria possui e agregar a ela os genes necessários para a imobilização dos íons metálicos. No trabalho de Bíondo (2008), foi introduzido, através de um plasmídeo, o gene da fitoquelatina sintética EC20sp, que após ser sintetizada resultou numa proteína híbrida que foi capaz de se transportar do interior da célula até o espaço extracelular e se fixar à membrana externa bacteriana com sucesso. O objetivo desse estudo foi obter a construção de uma bactéria recombinante com capacidade otimizada de biorremediação de metais, para ser utilizada em programas de tratamento de efluentes (Schenberg, 2010; Bíondo et al., 2012)

Ao comparar as figuras 3 e 4 pode-se observar que a bactéria geneticamente modificada apresenta capacidade de imobilizar metais do meio externo, em níveis significativamente superiores aos demonstrados pela linhagem selvagem.

FIGURA 3: *Cupriavidus metallidurans* (CH34). (Fonte: Modificada de Biondo (2012)).

Os metais adsorvidos na superfície celular são representados pelos pontos mais escuros. A figura 3 demonstra a bactéria em seu estado natural e pode-se observar que ela adsorve pouca quantidade de metais em sua membrana, quando comparado à linhagem recombinante (fig. 4).

FIGURA 4: *Cupriavidus metallidurans* (CH34/pcm3). (Fonte: Modificada de Biondo (2012)).

Na figura 4 pode-se observar que a bactéria modificada geneticamente é capaz de manter os íons metálicos na sua superfície em níveis muito superiores aos da linhagem selvagem.

3.5 Contaminação ambiental por metais

Entende-se como contaminação ambiental a presença de agentes contaminantes, de forma natural ou antrópica e em quantidades suficientes para afetar negativamente o ecossistema. Além de provocar alterações na estrutura e funcionamento das comunidades presentes (Nass, 2002; Espíndola et al., 2005).

Dependendo da participação dos íons metálicos na ação metabólica de um organismo, podem ser classificados como essenciais (Zn, Cu e Mn), pois são de extrema importância para a vida, como o fato de serem cofatores enzimáticos. Entretanto, quando em altas concentrações podem ser negativos aos organismos. Já os não-essenciais (Pb(II), Cd(II), e Hg(II)), os quais não apresentam função biológica positiva conhecida para organismo, são considerados altamente tóxicos, quando em níveis de contaminação ambiental (Porto, 2009; Yilmaz et al., 2010; Zheng et al, 2014).

Neste projeto, foram utilizados especificamente dois importantes metais: o Mercúrio (Hg(II)) e o Chumbo (Pb(II)). Sabe-se que esses metais não possuem nenhuma função dentro dos organismos e a sua bioacumulação pode provocar graves doenças e até a morte. Quando lançados na água, no solo ou no ar, esses elementos são absorvidos pelos vegetais e animais, provocando graves alterações na cadeia alimentar.

Segundo Moreira e Moreira (2004), o Chumbo (Pb(II)) é um contaminante ambiental tóxico para o ser humano e animais. A inalação e ingestão são as vias mais comuns de entrada. Sua toxicidade e bioacumulação podem afetar quase todos os órgãos e sistemas do organismo, além do alto índice de mutações genéticas geradas nos descendentes. Quando bioacumulados, grande parte ficam nos ossos, devido à substituição do cálcio pelo chumbo (Moreira e Moreira, 2004). Na década de 60 em Santo Amaro na Bahia houve uma grave contaminação ambiental por chumbo. Durante 32 anos a empresa Crobac produziu mais de 500 mil toneladas de resíduo de chumbo descartadas incorretamente e sem nenhum tipo de controle. Até 2015 foram registrados dos 3.500 trabalhadores antigos, 948 morreram em razão da contaminação. Os teores de Pb(II) encontrados foram até sessenta vezes superiores ao nível aceitável estabelecido pela Organização Mundial de Saúde-OMS, (0,1mg/l). Santo Amaro tornou-se, o mais emblemático caso mundial de contaminação por chumbo (Pellegrini, 2015).

O outro elemento não essencial utilizado nesse projeto é o Hg(II). Ele sofre diversas transformações químicas na natureza, em particular no meio aquático. Destaca-se o Hg(II) inorgânico (íons Hg(II)) quando interage com radicais metil (CH₃), formando o composto metil-mercúrio CH₃Hg⁺, sendo esta a forma mais tóxica deste metal (Mauro et al., 1999; Ulrch, 2001). A sua elevada volatilidade e solubilidade em meio aquoso e na presença de lipídios, permite atingir com facilidade os alvéolos pulmonares, a barreira hematoencefálica, a fixação e lesão do sistema nervoso, a inibição de várias enzimas e ação autoimune (Faria, 2003; WHO, 1991).

Na década de 30, em Miamata-Japão, a empresa (Chisso), que fabricava acetaldeído, despejava seus resíduos com mercúrio nos rios, contaminando os peixes. Somente em 1956 começaram a surgir os primeiros casos da doença. Sintomas: problemas no sistema nervoso e no cérebro, causando dormência nos membros, fraquezas musculares, deficiências visuais, dificuldades de fala, paralisia, deformidades levando até mesmo à morte. Esses sintomas foram devido ao consumo de peixe contaminado por mercúrio. Estima-se que a empresa descartou de 200 a 600 toneladas de metilmercúrio na baía da cidade, os níveis eram de 1,6 a 3,6 µg/g de mercúrio na época da contaminação. Depois de várias batalhas judiciais, a empresa foi obrigada a indenizar as vítimas, mas o resultado da contaminação se faz sentir até hoje (Bassett, 2016; Harada, 1978).

A partir dos graves casos de contaminações citados, é importante salientar que os problemas ambientais ultrapassam as fronteiras territoriais e devem ser tratados de forma global, pois afetam a vida de todos no planeta principalmente quando se trata de contaminação ambiental por metais.

4 METODOLOGIA

Para esse estudo, foram utilizadas as linhagens da bactéria *C. metallidurans* (CH34 e CH34/pCM3), disponível no Instituto de Ciências Biomédicas/USP, Departamento de Microbiologia. As bactérias foram crescidas em condições ideais de cultivo e expostas a metais, como descrito adiante.

4.1 Preparação do meio TSM

Foram adicionados 6.06 g/L de Tris, 4.68 g/L de NaCl, 1.49 g/L de KCl, 1.07 g/L de NH_4Cl , 0.43 g/L de Na_2SO_4 , 0.2 g/L de $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.23 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/L de $\text{Fe(III)(NH}_4\text{)}$ citrato, 2% de gluconato de sódio (SIGMA), 1 mL de solução de elementos traço SL7.

Esses elementos foram adicionados em um Becker, junto a água destilada para completar 1L, o pH foi ajustado para 5.0 e a solução foi autoclavada.

4.2 Preparação de solução-mãe de Pb(II) e Hg(II)

Foram utilizados sais de grau analítico (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemanha) de PbCl_2 e HgCl_2 para preparar soluções stock de 1mM. Essas soluções foram esterilizadas por filtração utilizando uma membrana de 0,22 μm (Millipore).

4.3 Condições de cultivo bacteriano.

As linhagens de *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3) foram cultivadas sob condições aeróbias em 100mL de meio mínimo TSM, contendo ou não 100 μM de Pb(II) a fim de estimular a fitoquelatina da linhagem recombinante, a 28 °C e 180 rpm até atingir a densidade óptica ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$) igual a 1,0 (Bíondo, 2008).

4.4 Exposição bacteriana à variadas concentrações de metal

As células crescidas foram centrifugadas a 10.000g, 4 °C por 10 minutos. A biomassa foi adicionada a 10 mL de água Milli-Q contendo Hg(II) (2 a 250 μM) e Pb(II) (100 a 3000 μM). As linhagens de *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3) foram

incubadas por 24h sob agitação de 180rpm a 28°C (condições de equilíbrio). Após o tempo de incubação as células foram centrifugadas, lavadas, secas, pesadas e analisadas junto ao sobrenadante no Analisador de Mercúrio DMA-80 Dual Cell (Milestone) para o Hg(II). No caso do Pb(II) as análises foram realizadas no equipamento de absorção atômica marca Varian (modelo-Spectra AA-220-Fast Sequencial). O estudo foi feito em hexaplicata com uma reprodutibilidade de 10%.

4.5 Bioadsorção competitiva frente à variação do pH

Para a bioadsorção competitiva foi utilizada a mesma metodologia descrita para o cultivo em metais. Entretanto no período de exposição, os íons Hg(II) e Pb(II) foram adicionados conjuntamente nas concentrações de 1,6mg.L de Hg(II) e 1,6mg.L de Pb(II) no primeiro experimento, mais adiante 1,6 mg.L de Hg(II) e 80 mg.L de Pb(II), no terceiro experimento 1,6 mg.L de Hg(II) e 160 mg.L de Pb(II), e no ultimo experimento foram adicionados 0,4 mg.L de Hg(II) e 160 mg.L de Pb(II). Os valores de pH estabelecidos para o estudo foram: 10;7; e 2. As análises foram realizadas no Analisador de Mercúrio DMA-80 Dual Cell (Milestone) para as análises de mercúrio e Espectrofotometria de Absorção Atômica (AAS) com sistema de injeção em fluxo e geração de vapor frio (FIA-CV-AAS) para as análises de chumbo.

4.6 Estabilidade de adsorção de metais

Após o período de exposição às amostras foram armazenadas por seis meses a 28 °C e analisadas uma vez ao mês, a fim de avaliar a estabilidade de adsorção nesse período.

4.7 Avaliação de dados

O equilíbrio de adsorção ocorre quando quantidade de soluto adsorvida sobre o adsorvente é igual à quantidade dessorvida. Atingindo o equilíbrio a concentração do soluto na fase líquida e na fase sólida permanecem constantes (Fig. 2). O equilíbrio de adsorção foi representado graficamente por meio de isotermas de adsorção. Essa isoterma foi plotada a partir dos dados obtidos experimentalmente.

Os modelos de Langmuir (Langmuir, 1918) e Freundlich (Freundlich, 1907), são utilizados com um grande sucesso para a realização de curvas isotérmicas no processo de

biossorção. São simples, bem estabelecidos e têm significado físico e são facilmente interpretáveis, que são algumas das razões importantes para o seu uso frequente e extenso.

4.7.1 Isoterma de Freundlich

Inicialmente a isoterma de Freundlich se dá por meio de uma distribuição logarítmica de sítios ativos e é favorecida quando as moléculas do adsorbato não interagem entre si. A descrição da isoterma é uma adsorção ideal, reversível, em múltiplas camadas, com sítios heterogêneos. Define que os sítios de ligação mais fortes são ocupados primeiro até que a energia de adsorção diminua com a conclusão do processo de adsorção. A equação pode ser descrita por:

$$q_{eq} = k_F \cdot C_{eq}^{n/1}$$

Sendo:

- **q_{eq}** a quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g^{-1});
- **k_F** a constante adimensional relacionada à capacidade de adsorção (mg.g^{-1}) (L.mg^{-1})^{1/n};
- **C_{eq}** a concentração de metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L^{-1});
- **$n/1$** a constante adimensional relacionada à intensidade de adsorção.

4.7.2 Isoterma de Langmuir

Esta isoterma considera que os sítios de adsorção são homogêneos, em monocamadas e que cada sítio é ocupado por apenas uma molécula de adsorbato. As moléculas já adsorvidas nos sítios não realizam interações entre os sítios vizinhos e a energia de cada sítio é igualmente distribuída. A isoterma de Langmuir é apresentada conforme a Equação abaixo:

$$q_{eq} = \frac{QK_L C_{eq}}{(1 + K_L C_{eq})}$$

Sendo:

- **q_{eq}** a quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g^{-1});

- **Q** a capacidade máxima de adsorção do metal (mg) por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (g);
- **K_L** Constante de Langmuir (l.mg⁻¹) (razão entre as taxas de adsorção e dessorção);
- **Ceq** a concentração de metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L⁻¹).

Em estudos de adsorção, a constante de Langmuir tem sido frequentemente considerada como a constante de equilíbrio e utilizada em cálculos da variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), na qual R é constante universal dos gases perfeitos de valor 8,314 J K⁻¹ mol⁻¹, T é a temperatura absoluta (K) e K é a constante de equilíbrio.

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K$$

Quando a energia livre de Gibbs é negativa, o processo de adsorção é considerado espontâneo. Valores de ΔG°_{ads} , maiores que 20 J.K⁻¹. Mol⁻¹ indica adsorção química e valores inferiores indicam que o processo de adsorção corresponde à adsorção física (Ball, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Recuperação dos íons Hg(II) e Pb(II) pelas linhagens *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3).

As tabelas 3 e 4 mostram a recuperação do mercúrio e chumbo, respectivamente, frente a diferentes concentrações desses íons, pelas linhagens selvagem (*C. metallidurans* (CH34)) e recombinante (*C. metallidurans* (CH34/pCM3)).

TABELA 3: Recuperação do mercúrio frente a diferentes concentrações do metal, pelas linhagens *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3).

Mercúrio (μM)	Recuperação <i>C. metallidurans</i> (CH34) (%)	Recuperação <i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3) (%)
2	89,7	99,5
4	76,7	92,6
8	44,4	82,3
10	40,8	78,7
12	32,9	75,2
15	28,0	73,8
20	16,1	64,7
50	7,3	48,1
100	-	32,0
150	-	16,5
200	-	11,1
250	-	8,7

A tabela 3 apresenta os níveis de mercúrio os quais as linhagens selvagem e recombinante foram submetidas, a fim de avaliar a saturação das mesmas. Com isso, pode-se

observar que a linhagem recombinante tem maior potencial de retenção que a selvagem para as análises de mercúrio. Sendo que a linhagem selvagem atingiu a saturação máxima em 50µM com apenas 7,3%, enquanto que para a linhagem recombinante, esse valor foi atingido apenas com 250µM. O estudo foi feito em hexaplicata com uma reprodutibilidade de 10%.

TABELA 4: Recuperação do chumbo frente a diferentes concentrações do metal, pelas linhagens *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3).

Chumbo (µM)	Recuperação	
	<i>C. metallidurans</i> (CH34) (%)	<i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3) (%)
100	83,1	99,0
400	72,3	95,7
600	56,7	81,0
800	43,9	75,2
1000	35,8	61,5
1300	28,6	46,7
1500	25,4	42,1
1700	17,1	39,3
2000	6,4	34,0
2200	-	31,4
2500	-	27,1
2700	-	18,3
3000	-	7,1

A tabela 4 apresenta os níveis de chumbo aos quais as linhagens selvagem e recombinante foram submetidas, a fim de avaliar a saturação das mesmas. Com isso, pode-se observar que a linhagem recombinante tem maior potencial de retenção que a selvagem para as análises de mercúrio. Sendo que a linhagem selvagem atingiu a saturação máxima em 2000 μ M com apenas 6,4%, enquanto que para a linhagem recombinante, esse valor foi atingido apenas com 3000 μ M. Entretanto, quando comparamos a retenção encontrada pela *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3) por Hg(II) e Pb(II) visualizadas nas tabelas 3 e 4, verificamos que a capacidade de retenção é muito maior para o chumbo do que para o mercúrio. O estudo foi feito em hexaplicata com uma reprodutibilidade de 10%.

Existem diversos fatores que podem influenciar a adsorção de metais, tais como pH, raio iônico e, no caso dos organismos geneticamente modificados, afinidade da fitoquelatina com o metal. Satofuka et al. (2001), mostraram que peptídeos de fitoquelatina sintética contendo sete resíduos de cisteína (EC7) ligaram Cd^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} e Zn^{+2} com diferentes afinidades, demonstrando que há uma escala de afinidade pelos resíduos de cisteína. Biondo, (2008) concluiu que a fitoquelatina EC20sp atua com maior afinidade para Pb (II) e menor afinidade pelo íon Hg(II). O principal problema dos peptídeos ricos em cisteína é a falta de especificidade, pode causar dificuldade na recuperação e reciclagem de certos íons (Bae et al, 200, 2001). Além disso, podem ser produzidos fitoquatinas de diferentes comprimentos de cadeia, exibindo diferentes capacidades de ligação a metais (Bae & Mehra, 1997)

5.2 Isotermas de Langmuir e Freundlich para o íon mercúrio pelas linhagens *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3).

As figuras 5 e 6 demonstram o modelo de Langmuir para o íon mercúrio e para linhagem selvagem.

FIGURA 5: Isoterma de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 6: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

As figuras 7 e 8 apresentam o modelo de Freundlich para o íon mercúrio para a linhagem selvagem.

FIGURA 7: Isoterma de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 8: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe=quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

Já as figuras 9 e 10 demonstram o modelo de Langmuir para o íon mercúrio e para linhagem recombinante.

FIGURA 9: Isoterma de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 10: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1)

As figuras 11 e 12 apresentam o modelo de Freundlich para o íon mercúrio para a linhagem recombinante.

FIGURA 11: Isoterma de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 12: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon mercúrio pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm; 28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

A tabela 5 compara a capacidade máxima de adsorção ($q_{\max}$) do íon mercúrio através das isothermas de Langmuir e Freundlich por meio das linhagens recombinantes e selvagens.

TABELA 5: Constantes de adsorção de Hg(II) em estirpes selvagens (*C. metallidurans* (CH34)) e recombinantes (*C. metallidurans* (CH34 / pCM3))

Hg(II)	Modelo de Langmuir *			Modelo de Freundlich**		
	Kl (L/mg)	$q_{\max}$ (mg/g)	R^2	KF (L/mg)	n	R^2
<i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	0,50	3,46	0,99	1,02	0,41	0,79
<i>C. metallidurans</i> (CH34)	1,78	0,98	0,99	1,73	0,36	0,88

*A capacidade máxima de adsorção ($q_{\max}$) indica a quantidade máxima dos íons adsorvidos (mg) por unidade de adsorvente (g). A constante de Langmuir (KL) está relacionada à energia de adsorção e à constante de equilíbrio.

** KF é a constante de equilíbrio de Freundlich; $1/n$ e o parâmetro $1/n$ informa o grau de linearidade da isoterma.

Os valores apresentados na tabela 5 mostram que o modelo de Langmuir ajusta-se muito melhor aos dados experimentais obtidos para o Hg(II) do que o modelo de Freundlich. Comparando-se as curvas plotadas e apresentadas nas figuras 5 a 12, confirma-se, mais uma vez, que o modelo que melhor se correlaciona aos dados experimentais é o de Langmuir. Os valores da capacidade máxima de adsorção ($q_{\max}$) obtidos refletem melhor capacidade de retenção pela linhagem recombinante com uma adsorção de 3,45 mg/g.

5.3 Comparação da capacidade máxima de retenção de Hg(II) entre diferentes biomassas encontradas na literatura

Um levantamento bibliográfico foi realizado a fim de compreender a relação entre a capacidade máxima de retenção de Hg(II) entre diferentes bactérias, fungos, leveduras e algas. Dentre esses organismos foi verificado a existência de uma ampla faixa de adsorção de Hg(II), demonstrando que o uso de cada linhagem é relativo ao nível de contaminação específico de cada local, e isso deve ser levado em consideração na escolha da melhor biomassa. A *C. metallidurans* (CH34/pCM3) possui uma capacidade máxima de adsorção ($q_{\max}$) de 3,45

mg/g, possível de ser utilizada como biorremediadora em diversas áreas de elevada contaminação, como por exemplo em Miamata na época da contaminação (1,6 a 3,6 µg/g).

5.3.1 Bactérias

Muitos autores vem estudando o processo de biossorção do íon Hg(II) através da utilização de bactérias. Al-Garni e colaboradores, (2010), usaram *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, ao qual adsorveram 150mg.L e 100mg.L de Hg(II) respectivamente. Todavia, Suriya e colaboradores, (2013), utilizaram a *Enterobacter cloacae* com 150mg.L de adsorção de Hg(II). Abbud, (2010), usou o *Rhodococcus opacus* com o resultado de 37,9 mg.g⁻¹ de adsorção de Hg(II). Contudo, Ozdemir e colaboradores, (2017), usaram *Bacillus altitudinis* e obtiveram 19,5mg/g da capacidade máxima de adsorção do íon Hg(II).

Algumas bactérias possuem mecanismos de resistência ao íon mercúrio. Essa resistência resulta na redução de Hg⁺² a mercúrio metálico (Hg⁰), que é um elemento volátil, capaz de se difundir passivamente para o exterior da célula (Silver e Phung, 2005). Outro fator importante é a baixa afinidade da fitoquelatina EC20sp com o íon Hg(II). Com isso, é possível compreender os valores obtidos pela capacidade máxima de adsorção (3,45 mg/g) do íon Hg(II) pela *C. metallidurans* (CH34/pCM3). No entanto, ao comparar esse valor aos encontrados nos grandes casos de contaminação ambiental por mercúrio, é possível verificar que a q_{max} é suficiente para remover o mercúrio de uma área contaminada.

5.3.2 Fungos

Estudos encontrados na literatura demonstram a capacidade de adsorção de Hg(II) por meio de fungos, Dil e colaboradores, (2017), demonstraram a capacidade de adsorção do fungo *Yarrowia lipolytica* (70562), obtendo como q_{max} 18mg.g de Hg(II). Sağlam e colaboradores, (2000) estudaram a biossorção de *Phanerochaete chrysosporum* com 61 mg.g de Hg(II). Já no estudo com o *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* a capacidade máxima de adsorção do Hg(II) foi de 270 mg.g⁻¹ (Svecova et al., 2006). O fungo *Penicillium purpurogenum* foi estudado por Say e colaboradores, (2003), obtendo 70.4 mg/g para Hg(II).

5.3.3 Leveduras

Yavuz e colaboradores, (2006), realizaram uma alteração genética na levedura *Saccharomyces cerevisiae subsp. Uvarum* e realizaram o teste de bioadsorção, resultando na capacidade máxima de adsorção 114 mg/g de Hg(II).

5.3.4 Algas

Zaib e colaboradores, (2016) estudaram a *Porphyridium cruentum* e a capacidade máxima de adsorção foi 2.62 mg/g de Hg(II). Tüzün et al., 2005 por meio de *Chlamydomonas reinhardtii* obteve 72 mg.g de adsorção de Hg(II). Zeroual e colaboradores, (2003) obtiveram 149 mg/g de Hg(II) pela *Ulva lactuca*.

5.4 Isotermas de Langmuir e Freundlich para o íon chumbo (Pb(II)) pelas linhagens *C. metallidurans* (CH34) e *C. metallidurans* (CH34/pCM3).

As figuras 13 e 14 demonstram o modelo de Langmuir para o íon chumbo e para linhagem selvagem.

FIGURA 13: Isoterma de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 14: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

As figuras 15 e 16 apresentam o modelo de Freundlich para o íon chumbo para a linhagem selvagem.

FIGURA 15: Isoterma de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 16: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem selvagem. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

Já as figuras 17 e 18 demonstram o modelo de Langmuir para o íon chumbo e para linhagem recombinante.

FIGURA 17: Isoterma de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 18: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Langmuir para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

As figuras 19 e 20 apresentam o modelo de Freundlich para o íon chumbo para a linhagem recombinante.

FIGURA 19: Isoterma de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

FIGURA 20: Relação entre (qe) experimental e (qe) de Freundlich para o íon Pb(II) pela linhagem recombinante. pH7; 180rpm;28°C. (Ce=concentração do metal na solução não adsorvido pela biomassa no equilíbrio (mg.L-1); qe= quantidade de metal adsorvido por quantidade de biomassa utilizada no equilíbrio (mg.g-1).

A Tabela 6 compara a capacidade de adsorção de chumbo iônico através de isotermas de Langmuir e Freundlich por meio das linhagens recombinantes e selvagens.

TABELA 6: Constantes de adsorção de Pb(II) pelas linhagens selvagens (*C. metallidurans* (CH34)) e recombinantes (*C. metallidurans* (CH34 / pCM3))

Pb(II)	Modelo de Langmuir*			Modelo de Freundlich**		
	KI (L/mg)	qmax (mg/g)	R ²	KF (L/mg)	n	R ²
<i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	0,15	172,4	0,98	4,01	0,60	0,89
<i>C. metallidurans</i> (CH34)	0,11	86,2	0,98	5,37	0,47	0,80

*A capacidade máxima de adsorção (qmax) indica a quantidade máxima dos íons adsorvidos (mg) por unidade de adsorvente (g). A constante de Langmuir (KL) está relacionada à energia de adsorção e à constante de equilíbrio.

** KF é a constante de equilíbrio de Freundlich; 1/n e o parâmetro 1/n informa o grau de linearidade da isoterma.

Os valores apresentados na tabela 6 mostram que o modelo de Langmuir ajusta-se muito melhor aos dados experimentais obtidos para o Pb(II) que o modelo de Freundlich. Comparando-se as curvas plotadas e apresentadas nas figuras 13 ao 20, confirma-se, mais uma vez, que o modelo que melhor se correlaciona aos dados experimentais é o de Langmuir. Os valores de qmax obtidos refletem melhor capacidade de retenção pela linhagem recombinante com uma adsorção de 172,4 mg/g.

5.5 Comparação da capacidade máxima de retenção de Pb(II) entre diferentes biomassas encontradas na literatura

Segue a relação entre capacidade máxima de retenção de Pb(II) de diferentes bactérias, fungos, leveduras e algas. Assim como no caso do Hg(II) citado anteriormente existe uma ampla faixa de adsorção de Pb(II) dentre esses organismos, demonstrando que o uso de cada individuo é relativo ao nível de contaminação específico de cada local, e isso deve ser levado em consideração na escolha da melhor biomassa. A *C. metallidurans* (CH34/pCM3) possui uma capacidade de adsorção de 172,4mg/g, superando os níveis de adsorção de diversos

organismos encontrados na literatura. Essa biomassa é possível de ser utilizada como biorremediadora em diversas áreas de elevada contaminação.

5.5.1 Bactérias

Em comparação com a literatura, a *C. metallidurans* (CH34/pCM3) teve uma ótima capacidade de adsorção de Pb(II). Colak e colaboradores, (2011), utilizou as linhagens *Bacillus pumilus* e *Bacillus cereus* como retentoras de chumbo e obtiveram 28.06 mg g⁻¹ e 22.1 mg g⁻¹ de Pb(II), respectivamente. Tirado e colaboradores, (2012), utilizaram a *Bacillus thioparans* U3 e obtiveram 90.1 mg g⁻¹ de adsorção de Pb(II). Bueno, (2009), por meio da bactéria *Rhodococcus opacus* obteve 94,34 mg g⁻¹ e Chang e colaboradores, (1997), estudaram a bioadsorção com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* obtendo 79.5 mg g⁻¹ de adsorção de Pb(II). Garcia e colaboradores, (2016), utilizaram a bactéria *Bacillus sp* (cepa C16), obtendo como capacidade máxima de adsorção 0,536 mg.g de Pb(II). Jin e colaboradores, (2015), usaram *Bacillus sp* e obtiveram 9,30 mg.g⁻¹ de capacidade máxima adsorvida com chumbo. Ozdemir e colaboradores, (2017), usaram *Bacillus altitudinis* e obtiveram 35,2 mg / g de adsorção máxima da capacidade de íons Pb(II). Portanto, a capacidade máxima de adsorção do Pb(II) pela *Cupriavidus metallidurans* (CH34/pCM3) foi significativa para um processo de biorremediação de áreas contaminadas. Como no caso de Santo Amaro citado anteriormente. Diversas biomassas são estudadas a fim de compreender a bioadsorção do íon Pb(II).

5.5.2 Fungos

Dil e colaboradores, (2017), estudaram o fungo *Yarrowia lipolytica* (70562), obtendo como adsorção 22mg.g de Pb(II). A partir do estudo de bioadsorção através da *Pleurotus ostreatus* (U2-11) a capacidade máxima obtida foi 58.34 mg g⁻¹ de Pb(II) (Palin et al., 2010). Foi adsorvido 39.58mg.g⁻¹ de Pb(II) por *Rhizomucor pusillus*. (Qayyum et al., 2016).

5.5.3 Leveduras

Xin e colaboradores, (2017), utilizou a *Saccharomyces cerevisiae* e obteve 238 mg.g de capacidade máxima de adsorção do Pb(II). Ferreira e colaboradores, (2007), estudaram a

bioadsorção da mesma levedura e obteve como capacidade máxima de adsorção 1486.88 mg/g de Pb(II). Amirnia e colaboradores, (2015), utilizando-se da *S. cerevisiae* em sistema de biorreator contínuo para o íon metálico Pb(II) obtiveram 29,9 mg.g-1 de adsorção.

5.5.4 Algas

No estudo realizado por Khan e colaboradores, (2016), foi avaliada a eficiência de adsorção de algas verdes de água doce para o íon Pb(II), obtendo como capacidade máxima 100 mg.g. Wang e colaboradores, (2016) utilizaram a *Laminaria digitata* e o qmax foi de 296 mg.g de Pb(II). Tran e colaboradores, (2016), estudaram alga contida em plantação de arroz e obtiveram 76.92 mg.g de adsorção de Pb(II).

Foi possível observar que há uma faixa grande de capacidade de adsorção entre os organismos encontrados na literatura. Entretanto a *C. metallidurans* (CH34/pCM3) obteve uma capacidade máxima de adsorção maior do que grande parte dos organismos encontrados para o íon Pb(II). A *C. metallidurans* é nativa de ambiente com altos níveis de metais, isso explica a sua resistência.

5.6 Determinação da energia livre de Gibbs do processo de adsorção de Hg(II) e Pb(II) pelas linhagens selvagem e recombinante.

A isoterma de Langmuir permitiu calcular a energia livre de Gibbs, ΔG°_{ads} , por meio da constante KL.

TABELA 7: Determinação da energia livre Gibbs do processo de adsorção de Hg(II) e Pb(II) pelas estirpes recombinantes (*C. metallidurans* (CH34 / pCM3)).

<i>C. metallidurans</i> (CH34/pCM3)	Gibbs free energy (ΔG)
Hg(II)	$\Delta G = -29 \text{ kJ.mol}^{-1}$
Pb(II)	$\Delta G = -26 \text{ kJ.mol}^{-1}$

A partir do cálculo da energia livre de Gibbs apresentado na tabela 7 conclui-se que o processo de adsorção é químico, pois os valores de ΔG°_{ads} encontrados foram, maiores que $20 \text{ J.K}^{-1}.\text{Mol}^{-1}$ e o sinal negativo indica que a adsorção é espontânea, sem qualquer estímulo energético à temperatura de trabalho de 28°C .

5.7 Estabilidades de adsorção de metais

Um dos aspectos que deve ser levado em consideração é se uma vez retido o metal na membrana da bactéria, ele permanece na bactéria ou é rapidamente liberado para o sobrenadante. Deve-se compreender se há estabilidade e robustez na adsorção dos íons metálicos.

As figuras 21 e 22 apresentam a estabilidade de adsorção dos metais Pb(II) e Hg(II). Para isso as amostras foram armazenadas por seis meses a 28°C e analisadas mensalmente. As series 1,2 e 3 representam três níveis de concentrações dos metais aos quais as bactérias foram expostas, sendo a serie 1 a de menor concentração e a 3 a mais elevada.

FIGURA 21: Estabilidade de adsorção da linhagem recombinante com Pb(II) ao longo de seis meses.

A figura 21 apresenta a estabilidade da linhagem recombinante para o íon Pb(II) no período de 6 meses. A série 1 representa a recuperação de cerca de 19 mg.g^{-1} , a serie 2 demonstra a recuperação de cerca de 97 mg.g^{-1} e a serie 3 uma recuperação de cerca de 137 mg.g^{-1} .

FIGURA 22: Estabilidade de adsorção da linhagem recombinante com Hg(II) ao longo de seis meses.

A figura 22 apresenta a estabilidade da linhagem recombinante para o íon Hg(II) no período de seis meses. A série 1 representa a recuperação de cerca de $0,4 \text{ mg.g}^{-1}$, a serie 2 demonstra a recuperação de cerca de $1,8 \text{ mg.g}^{-1}$ e a serie 3 uma recuperação de cerca de $3,3 \text{ mg.g}^{-1}$.

As figuras 21 e 22 demonstram a estabilidade de adsorção da linhagem recombinante mesmo em altas concentrações de metais em um período de seis meses. Os resultados não apresentaram diferenças significativas. Esse fato demonstra a robustez da capacidade de adsorção dos metais.

5.8 Bioissorção competitiva em sistema binário frente a variações de pH

Como já apresentado anteriormente, a linhagem recombinante apresenta uma melhor recuperação de metais em relação a selvagem, portanto o estudo de bioissorção competitiva foi realizada apenas com a linhagem recombinante. A tabela 8 apresenta a bioissorção competitiva entre $1,6 \text{ mg.L}$ de Hg(II) e $1,6 \text{ mg.L}$ de Pb(II). A tabela 9 apresenta bioissorção competitiva entre $1,6 \text{ mg.L}$ de Hg(II) e 80 mg.L de Pb(II). A tabela 10 apresenta bioissorção competitiva entre $1,6 \text{ mg.L}$ de Hg(II) e 160 mg.L de Pb(II). A tabela 11 apresenta bioissorção competitiva entre $0,4 \text{ mg.L}$ de Hg(II) e 160 mg.L de Pb(II). Os valores de pH estabelecidos para o estudo foram: 10;7; e 2.

TABELA 8: Bioissorção competitiva entre 1,6mg.L de Hg(II) e 1,6mg.L de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante.

pH	Adicionado Hg(II) e Pb(II) (mg.L)	Recuperado Hg(II) (mg.g)	Recuperado Pb(II) (mg.g)
10	1,6	1,13	1,34
7	1,6	1,18	1,40
2	1,6	0,44	0,19

Na tabela 8 está representada a capacidade de bioissorção em misturas binárias em concentrações equimolares de metais. Apresenta um comprometimento na capacidade de retenção de ambos os íons se comparada com dados de adsorção contendo somente uma espécie metálica. Isso se deve à interação química entre os metais da solução, assim como entre os metais e a biomassa, resultando numa competição pelos sítios ativos na superfície da célula.

Um fator que indica a tendência da bioissorção de metais por um determinado material são suas propriedades físico-químicas. Outros autores demonstram que a sorção aumenta com o aumento do raio iônico do metal (Mattuschka e Straube, 1993; Chong e Volesky, 1995; Sag et al., 2002; Sharma et al., 2007) e com a eletronegatividade (Stumm e Morgan, 1996), sendo que, no presente estudo, ambos os parâmetros seguem a ordem: Pb(II)>Hg(II).

Em estudo realizado por Sharma e colaboradores, (2007), foi observada a bioissorção de Cd(II), Cr(III) e Ni(II) em misturas contendo os três elementos simultaneamente. A ordem de sorção foi consistente com as propriedades físico-químicas dos metais estudados: Cd(II)>Cr(III)>Ni(II). Akar e Tunali, (2006), constataram, utilizando *Aspergillus flavus*, que a capacidade de bioissorção era reduzida em misturas binárias, se comparada com soluções

contendo somente uma espécie metálica, obtendo a ordem $Pb(II) > Cu(II)$, tanto para a bioissorção competitiva, quanto para a não competitiva. Abu Al-Rub e colaboradores, (2006), observaram a redução da remoção de íons cobre na presença de chumbo e zinco utilizando a alga *Chlorella vulgaris* em pó.

TABELA 9: Bioissorção competitiva entre 1,6mg.L de Hg(II) e 80mg.L de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante.

pH	Adicionado Hg(II) (mg.L)	Recuperado Hg(II) (mg.g)	Adicionado Pb(II) (mg.L)	Recuperado Pb(II) (mg.g)
10	1,6	0,80	80	65,6
7	1,6	0,84	80	71,2
2	1,6	0,41	80	8

Na tabela 9 é possível observar uma queda na recuperação do mercúrio em relação à tabela 8, devido ao aumento da concentração de chumbo no meio. Esse fenômeno é explicado por Aksu e Dönmez, (2006), que afirmam que a presença de outros elementos em uma mesma solução promove automaticamente uma competição pelos sítios de adsorção da biomassa, o que pode influenciar positiva ou negativamente a sorção de cada metal. Além disso, ainda segundo os autores, caso um dos metais se encontre em uma concentração mais elevada, este tende a ocupar mais rapidamente os sítios de ligação, fazendo com que a adsorção dos demais elementos seja automaticamente inferior.

TABELA 10: Biossorção competitiva entre 1,6mg.L de Hg(II) e 160mg.L de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante.

pH	Adicionado Hg(II) (mg.L)	Recuperado Hg(II) (mg.g)	Adicionado Pb(II) (mg.L)	Recuperado Pb(II) (mg.g)
10	1,6	0,60	160	110,4
7	1,6	0,65	160	116,8
2	1,6	0,30	160	24

Na tabela 10 é possível observar uma queda na recuperação do mercúrio em relação às tabelas 8 e 9, devido ao aumento da concentração de chumbo no meio.

TABELA 11: Biossorção competitiva entre 0,4mg.L de Hg(II) e 160mg.L de Pb(II) com variação de pH, pela linhagem recombinante.

pH	Adicionado Hg(II) (mg.L)	Recuperado Hg(II) (mg.g)	Adicionado Pb(II) (mg.L)	Recuperado Pb(II) (mg.g)
10	0,4	0,29	160	115,2
7	0,4	0,30	160	118,4
2	0,4	0,16	160	35,2

O estudo descrito na tabela 11 demonstra o mesmo perfil citado anteriormente, onde a presença de alta concentração do Pb(II) limita ainda mais a adsorção do Hg(II).

Os resultados apresentados mostram claramente a importância do pH, principalmente em se tratando da competição de metais. A influência do mesmo na bio sorção de íons metálicos se dá pela competição entre os íons do metal e os íons H^+ presentes em solução pelos sítios ativos da superfície da biomassa. A dependência da captura de íons pela biomassa em função do pH pode justificar-se pela associação e dissociação de alguns grupos funcionais presentes. Segundo Moreira, (2004), um dos fatores que explica o comportamento competitivo dos metais é o tipo de interação metal-superfície. Cada metal apresenta, portanto, um tipo de ligação/interação preferencial, sendo as interações eletrostáticas e as covalentes as principais. Já Aksu e Dönmez, (2006), atribuem a competição de metais ao número finito de sítios de ligação ativos na superfície da biomassa.

6.CONCLUSÃO

Conforme descrito anteriormente, as bactérias tem se apresentado como um importante vetor para a remoção de metais em meios aquáticos. Os resultados obtidos nesse trabalho confirmam essa hipótese. A *C. metallidurans*, quer na sua forma selvagem (CH34), quer na forma geneticamente modificada (CH34/pCM3), apresentou altas taxas de remoção dos íons estudados, mantendo-os retidos ao longo de seis meses .

Outro aspecto relevante demonstrado nesse trabalho é a confirmação da importância da modificação genética no processo de biossorção, permitindo um aumento significativo da eficácia de todo o processo.

Conforme esperado, alterações do meio têm como consequência o comprometimento da eficiência da capacidade de adsorção, sinalizando que o seu uso em larga escala exigirá o estabelecimento de condições físico-químicas bem controladas, assim como o conhecimento prévio da presença de íons concomitantes e outros organismos capazes de alterar as condições físico químicas do meio em estudo. Atendendo a essas premissas, a *C. metallidurans* (CH34/pCM3) torna-se uma importante opção para ser utilizada em biorreatores para biorremediação.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbud, J. S., (2010). **Biocaptação de Hg pela bactéria *Rhodococcus opacus***. 2010. Tese de Doutorado. PUC-Rio.
- Abourached, C., Catal, T., & Liu, H. (2014). Efficacy of single-chamber microbial fuel cells for removal of cadmium and zinc with simultaneous electricity production. **water research**, v. 51, p. 228-233.
- Acosta, M. P., Valdman, E., Leite, S. G. F., Battaglini, F., & Ruzal, S. M. (2005). Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 1157-1163.
- Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., & Beolchini, F. (2015). A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 86, p. 24-36.
- Al-Garni, S. M., Ghanem, K. M., & Ibrahim, A. S. (2010). Biosorption of mercury by capsulated and slime layerforming Gram-ve bacilli from an aqueous solution. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6413-6421.
- Amirnia, S., Ray, M. B., & Margaritis, A. (2015). Heavy metals removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* in a novel continuous bioreactor–biosorption system. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 863-872.
- Andrade, J. D. A., Augusto, F., & Jardim, I. C. S. F. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43.
- Aquino, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. (2013) Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.18, n.3, p.187-204.

Banco Credit Suisse (2016). “Global Wealth Databook 2016”. Acessado em 18/01/2017: <http://publications.creditsuisse.com/tasks/render/file/index.cfm?fileid=AD6F2B43-B17B-345E-E20A1A254A3E24A5>

Barbosa, L. D. P. (2009). **Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na biorremediação de efluentes ácidos contendo metais**. Tese de mestrado.

Bassett, A. (2016). **A more nuanced approach to environmental hazards?: a critical review of the existence, priorities and scope of the Miamata Convention on Mercury**. Tese de Doutorado. University of British Columbia.

Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2006). Biosorption of mercury (II), cadmium (II) and lead (II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. **International Journal of Mineral Processing**, v. 81, n. 1, p. 35-43.

Bertagnolli, C., da Silva, M. G. C., & Guibal, E. (2014). Chromium biosorption using the residue of alginate extraction from *Sargassum filipendula*. **Chemical Engineering Journal**, v. 237, p. 362-371.

Beveridge, T. J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 147-171.

Bíondo, R. (2008) Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados. **São Paulo, Brasil**.

Bíondo, R., da Silva, F. A., Vicente, E. J., Souza Sarkis, J. E., & Schenberg, A. C. G. (2012). Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 15, p. 8325-8332.

Borba, T.R. (2010) **Estudo da aplicação de bioissorventes no tratamento de rejeitos radioativos líquidos contendo amerício-241**. Dissertação de mestrado.

Borges, A. F., & Barroso, E. V. (1997). Análise da utilização de geofísica e biorremediação em problemas de contaminação de solo e água subterrânea. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 20, p. 107-142.

Brady, J. P., Ayoko, G. A., Martens, W. N., & Goonetilleke, A. (2014). Enrichment, distribution and sources of heavy metals in the sediments of Deception Bay, Queensland, Australia. **Marine pollution bulletin**, v. 81, n. 1, p. 248-255

Bueno, B. M., Molina, F. F., Torem, M. L., de Mesquita, L. M. S., & Pino, G. A. H. (2009). Remoção de Pb(II) de soluções aquosas por Biossorção em *R. opacus*. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 62, n. 4, p. 487-494.

Bulgariu, L., Bulgariu, D., & Rusu, C. (2015). Marine Algae Biomass for Removal of Heavy Metal Ions. In: **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 611-648.

Bunluesin, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Upatham, S., & Lanza, G. R. (2007). Batch and continuous packed column studies of cadmium biosorption by *Hydrilla verticillata* biomass. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 509-513.

Buratto, A. P., Costa, R. D., & Ferreira, E. D. S. (2012). Aplicação de biomassa fúngica de *Pleurotus ostreatus* em processo de biossorção de íons cobre (II). **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 4, p. 413-420.

Chagas A.P (1999). Termodinâmica química. **Editora da Unicamp, Campinas**.

Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Singh, G., & Maity, J. P. (2014). Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 100, p. 61-68.

Chang, J.S., Law, R., Chang, C.C., (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. **Water research**, v. 31, n. 7, p. 1651-1658.

Çolak, F., Atar, N., Yazıcıoğlu, D., & Olgun, A. (2011). Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 2, p. 422-428.

Cotoras, D., Viedma, P., & Pimentel, J. (1993). Biosorption of metal ions by attached bacterial cells in a packed-bed bioreactor. In: **Biohydrometallurgical Technologies**. Torma, A. E.;

Apel, M. L. e Brierley, C. L., eds.; The Minerals, Metals & Materials Society: Warrendale, PA; vol.2, pp 103-110.

Csuros, M., & Csuros, C. (2016). **Environmental sampling and analysis for metals**. CRC Press.

da Silva, J. M., dos Santos, M. O. S., da Silva Augusto, L. G., & Gurgel, I. G. D. (2013). Desenvolvimento sustentável e saúde do trabalhador nos estudos de impacto ambiental de refinarias no Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 22, n. 3, p. 687-700

de Espíndola, M. B., Bechara, F. C., Bazzo, M. S., & Reis, A. (2005). Recuperação ambiental e contaminação biológica: aspectos ecológicos e legais. **Biotemas**, v. 18, n. 1, p. 27-38.

de Freitas, R. R., & Barroso, G. F. (2006). Conflitos de uso dos recursos costeiros: desafios para sustentabilidade do cultivo de moluscos. **Caderno Virtual de Turismo**, v. 6, n. 2.

de Jesus, H. C., de ACosta, E., Mendonça, A. S. F., & Zandonade, E. (2004). Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 378-386.

Dil, E. A., Ghaedi, M., Ghezelbash, G. R., Asfaram, A., & Purkait, M. K. (2017). Highly efficient simultaneous biosorption of Hg 2+, Pb2+ and Cu 2+ by Live yeast *Yarrowia lipolytica* 70562 following response surface methodology optimization: kinetic and isotherm study. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**.

Esposito, A., Pagnanelli, F., & Veglio, F. (2002). pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 3, p. 307-313.

Esteves, F. D. A. (1988). Fundamentos de limnologia. In: **Fundamentos de limnologia**. Interciência/Finep, 575p.

Fairbrother, L., Etschmann, B., Brugger, J., Shapter, J., Southam, G., & Reith, F. (2013). **Environmental science & technology**, v. 47, n. 6, p. 2628-2635.

Faria, M. D. A. M. (2003). Mercuralismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 116-127.

- Ferraz, A. I., Tavares, T., & Teixeira, J. A. (2004). Cr (III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Engineering Journal**, v. 105, n. 1, p. 11-20.
- Ferreira, I. D., & Morita, D. M. (2012). Biorremediação de solo contaminado por isobutanol, Bis-2-etil-hexilftalato e Di-isodecilftalato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 2, p. 643-652.
- Ferreira, J. M., Silva, F. L. H. D., Alsina, O. L. S., Oliveira, L. D. S. C., Cavalcanti, E. B., & Gomes, W. C. (2007). Equilibrium and kinetic study of Pb²⁺ biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1188-1193.
- Fosso-Kankeu, E., Mulaba-Bafubiandi, A. F., & Mishra, A. K. (2014). Prospects for Immobilization of Microbial Sorbents on Carbon Nanotubes for Biosorption: Bioremediation of Heavy Metals Polluted Water. **Application of Nanotechnology in Water Research**, p. 37-61.
- Foster, I. D. L., & Charlesworth, S. M. (1996). Heavy metals in the hydrological cycle: trends and explanation. **Hydrological processes**, v. 10, n. 2, p. 227-261.
- Franchini, C., & de Almeida Gomes, G. (2017). Avaliação do fluxo hidrológico dos rios Lajeado Bonito e Limeira comparando atividades urbanas e rurais sobre a qualidade da água. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 13, n. 1.
- Freundlich, H., & Abramson, H. (1907). Zeitschr. f. physik. **Chem**, v. 67, p. 538.
- Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, n. 2, p. 109-119.
- García, R., Campos, J., Cruz, J. A., Calderón, M. E., Raynal, M. E., & Buitrón, G. (2016). Biosorption of Cd, Cr, Mn, and Pb from aqueous solutions by *Bacillus* sp strains isolated from industrial waste activate sludge. **TIP**, v. 19, n. 1, p. 5-14.
- Gaylarde, C. C., Bellinaso, M. D. L., & MANFIO, G. P. (2005). Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43.

- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., & Vandamme, P. (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle et al. 1998 emend. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1773-1782.
- Gupta, A., Joia, J., Sood, A., Sood, R., & Sidhu, C. (2016). Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review. **J Microb Biochem Technol**, v. 8, p. 364-372.
- Hansda, A., & Kumar, V. (2016) A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 170.
- Harada, M. (1978). Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. **Teratology**, v. 18, n. 2, p. 285-288.
- Hlihor, R. M., Figueiredo, H., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2016). Biosorption potential of dead and living *Arthrobacter viscosus* biomass in the removal of Cr (VI): Batch and column studies. **Process Safety and Environmental Protection**.
- Hou, Y., Cheng, K., Li, Z., Ma, X., Wei, Y., Zhang, L., & Wang, Y. (2015). Biosorption of Cadmium and Manganese Using Free Cells of *Klebsiella* sp. Isolated from Waste Water. **Plos one**, v. 10, n. 10, p. e0140962.
- Kapoor, A., & Viraraghavan, T. (1995). Fungal biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource technology**, v. 53, n. 3, p. 195-206.
- Kavitha, G., Sridevi, V., Venkateswarlu, P., & Babu, N. C. (2016). Biosorption of Chromium from Aqueous Solution by *Gracilaria corticata* (Red Algae) and Its Statistical Analysis Using Response Surface Methodology. **Open Access Library Journal**, v. 3, n. 09, p. 1.
- Khan, T. A., Mukhlif, A. A., Khan, E. A., & Sharma, D. K. (2016). Isotherm and kinetics modeling of Pb(II) and Cd (II) adsorptive uptake from aqueous solution by chemically

modified green algal biomass. **Modeling Earth Systems and Environment**, v. 2, n. 3, p. 1-13.

Kleinübing, S. J., Vieira, R. S., Beppu, M. M., Guibal, E., & Silva, M. G. C. D. (2010). Characterization and evaluation of copper and nickel biosorption on acidic algae *Sargassum filipendula*. **Materials Research**, v. 13, n. 4, p. 541-550, 2010.

Klen, M. R. F. (2006). **Estudo do Equilíbrio da Bio sorção Monocomponente e Multicomponente dos íons Cobre, Zinco e Cádmio pela Biomassa Pré- Tratada de Alga Marinha Sargassum filipendula**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

Kratochvil, D., & Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 291-300.

Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical society**, v. 40, n. 9, p. 1361-1403, 1918.

Lee, S. J., Park, J. H., Ahn, Y. T., & Chung, J. W. (2015). Comparison of heavy metal adsorption by peat moss and peat moss-derived biochar produced under different carbonization conditions. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 2, p. 1-11.

Lemos, J. L. S; Carlos, M.C; Farias, Y.P.T.M.M; dos Santos, R.L.C (2008) Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. Rio de Janeiro: **CETEM/MCT**, 65 p.

Liao, J., Wen, Z., Ru, X., Chen, J., Wu, H., & Wei, C. (2016). Distribution and migration of heavy metals in soil and crops affected by acid mine drainage: Public health implications in Guangdong Province, China. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 460-469.

Liu, Y. (2006). Some consideration on the Langmuir isotherm equation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 274, n. 1, p. 34-36.

Mariano, A. P. (2006). **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 147 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio

Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Marins, R. V., Paraquetti, H. H. M., & Ayres, G. A. (2002). Alternativa analítica para especiação físico-química de mercúrio em águas costeiras tropicais. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 372-378.

Martins, R. (2004). **Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas**. Tese de Doutorado, FEUP, Universidade do Porto.

Matsumoto, S. T., Mantovani, M. S., Malagutti, M. I. A., Dias, A. L., Fonseca, I. C., & Marin-Morales, M. A. (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158.

Mattuschka, B., & Straube, G. (1993). Biosorption of metals by a waste biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 57-63.

Mauro, J. B. N., Guimarães, J. R. D., & Melamed, R. (1999). Aguapé agrava contaminação por mercúrio. **Revista Ciência Hoje**, v. 25, n.15, p. 68 – 71.

Mazzuco, L. M. (2004). **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Mergeay, M., Monchy, S., Vallaes, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., ... & Wattiez, R. (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 385-410.

Módenes, A. N., de Abreu Pietrobelli, J. M. T., & Espinoza-Quñones, F. R. (2009). Cadmium biosorption by non-living aquatic macrophytes *Egeria densa*. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 293-300.

Moreira, C. A., & Dourado, J. C. (2007). Monitoramento da Atenuação Natural de pluma de contaminação pelo método de Radar de Penetração no Solo (GPR). **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 25, n. 4, p. 389-398.

Moreira, F. R., & Moreira, J. C. (2004). A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167-181.

Mueller, C. C. (2004). Os economistas e as inter-relações entre o sistema econômico e o meio ambiente. **Versão preliminar, NEPAMA, Departamento de Economia, UnB.**

Naja, G., & Volesky, B. (2006). Behavior of the mass transfer zone in a biosorption column. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 12, p. 3996-4003.

Nass, D. P. (2002). O conceito de Poluição. **Revista Eletrônica de Ciências. São Carlos: Universidade de São Paulo/Instituto de Química**, n. 13.

Neto, J. A. B., Smith, B. J., McAllister, J. J., & da Silva, M. A. M. (2010). Fontes e transporte de metais pesados para enseada de jurujuba (Baia de Guanabara) RJ-BRASIL. **Revista Tamoios**, v. 1, n. 2.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. **Applied microbiology and biotechnology**, v.51, p.730-750.

Oliveira (2016).An integrated use of Macroalgae as bioproducts source and biosorbent for environmental applications. **Tese de Doutorado. Gheorghe Asachi” Technical University of Iasi, Romania.**

Oliveira Filho, F. A. D. (2001). Aplicação do conceito de produção limpa: estudo de uma empresa metalúrgica do setor de transformação do alumínio. – **Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.**

Oliveira, D.S. (2010). Sustentabilidade na cadeia de rejeitos: estudo de verificação da cadeias de rejeitos no mercado de telefonia móvel do Brasil. 93f. **Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário, Curitiba**

Oxfam (2016). Calculos baseados na riqueza dos indivíduos mais ricos segundo a lista anual de bilionários da Forbes e a riqueza dos 50% mais pobres segundo o relatório Global Wealth Databook do Banco Credit Suisse. Acessado em 18/01/2017. https://www.oxfam.org.br/sites/default/files/economia_para_99-relatorio_completo.pdf

Ozdemir, S., Kilinc, E., Celik, K. S., Okumus, V., & Soylak, M. (2017). Simultaneous preconcentrations of Co^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} ions by *Bacillus altitudinis* immobilized nanodiamond prior to their determinations in food samples by ICP-OES. **Food Chemistry**, v. 215, p. 447-453.

Palin Jr, D., Rufato, K. B., Linde, G. A., Colauto, N. B., Caetano, J., Alberton, O., ... & Dragunski, D. C. (2016). Evaluation of Pb(II) biosorption utilizing sugarcane bagasse colonized by Basidiomycetes. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 5, p. 1-14.

Park, J. H., & Chon, H. T. (2016). Characterization of cadmium biosorption by *Exiguobacterium* sp. isolated from farmland soil near Cu-Pb-Zn mine. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9.

Pino, G. A. H. **Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (cocos nucifera)**. (2005). Dissertação de mestrado- Pontificia Universidade Catolica, Rio de Janeiro.

Pokethitiyook, P., & Poolpak, T. (2016). Biosorption of Heavy Metal from Aqueous Solutions. In: **Phytoremediation**. Springer International Publishing, 2016. p. 113-141.

Porto, L. C. S., & Ethur, E. M. (2009). Elementos traço na água e em vísceras de peixes da bacia hidrográfica butuí-Icamaquã, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n.9; 2512-2518.

Praveen, R. S., & Vijayaraghavan, K. (2015). Optimization of Cu (II), Ni (II), Cd (II) and Pb(II) biosorption by red marine alga *Kappaphycus alvarezii*. **Desalination and Water Treatment**, v. 55, n. 7, p. 1816-1824.

Qayyum, S., Khan, I., Meng, K., Zang, X., Zhao, Y., Gu, Q., & Peng, C. (2016). Bioaccumulation of heavy metals from aqueous solution using indigenous fungal isolates. **Niscair**. V.45 n.04. P. 499-507.

Queiroz¹, S., Maximiano, A., Siqueira, A. F., Cruz¹, Z. M., & Ramos, A. C. (2007). Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do processo de atenuação natural monitorada em área contaminada por solventes clorados. **Natureza on line**, v. 5, n. 1, p. 10-18.

Raffar, N. I. A., Rahman, N. N. A. A., Alrozi, R., Senusi, F., & Chang, S. H. (2015). Potential immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as heavy metal removal. **In: international conference on mathematics, engineering and industrial (ICoMEIA 2014)**. AIP Publishing, 2015. p. 070093.

Reith F., Fairbrother L., Nolze G., Wilhelmi O., Clode P.L., Gregg A., Parsons J.E., Wakelin S.A., Pring A., Hough R., Southam G. and Brugger J. (2010). Nanoparticle factories: Biofilms hold the key to gold dispersion and nugget formation. **Geology**, v. 38, n. 9, p. 843-846. DOI: 10.1130/G31052.1.

Reith, F., Etschmann, B., Grosse, C., Moors, H., Benotmane, M. A., Monsieurs, P., ... & Martinez-Criado, G. (2009). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17757-17762.

Roane TM, Pepper IL. (2000) Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial ecology**, v. 38, n. 4, p. 358-364.

Rodríguez-Tirado, V., Green-Ruiz, C., & Gómez-Gil, B. (2012). Cu and Pb(II) biosorption on *Bacillus thio-parans* strain U3 in aqueous solution: Kinetic and equilibrium studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 181, p. 352-359.

Ruiz, O. N., Alvarez, D., Gonzalez-Ruiz, G., & Torres, C. (2011). Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 82.

Sağlam, N., Say, R., Denizli, A., Patır, S., & Arica, M. Y. (1999). Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to *Phanerochaete chrysosporium* mycelium. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 725-730.

- Santana, R. C., Oliveira, O. M. C., Triguís, J. A., Queiroz, A. D. S., & Cruz, M. J. M. (2010). Procedimentos de biorremediação aplicados na limpeza de substrato de manguezal impactados por petróleo. **Plurais**, v. 1, n.1, p 159-177.
- Santos, R.F.; Matur, E.E.; Santos, R.K. (2015) Implicações do reuso de efluente de esgoto doméstico tratado na irrigação agrícola. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.4, n.2, p. 70-86
- Say, R., Yılmaz, N., & Denizli, A. (2003). Biosorption of cadmium, lead, mercury, and arsenic ions by the fungus *Penicillium purpurogenum*. **Separation Science and Technology**, v. 38, n. 9, p. 2039-2053.
- Schenberg, A. C. G. (2010). Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 07-17.
- Sekhar, K. C., Kamala, C. T., Chary, N. S., & Anjaneyulu, Y. (2003) Removal of heavy metals using a plant biomass with reference to environmental control. **International Journal of Mineral Processing**, v. 68, n. 1, p. 37-45.
- Silvano, J. (2003). Avaliação de metais na água, nos sedimentos e nos peixes da lagoa azul, formada por lavra de mineração de carvão a céu aberto, Siderópolis-SC. Universidade federal do Rio Grande do Sul- UFRGS. Instituto de biociências. Programa de pós-graduação em ecologia. 88p.
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, n. 11-12, p. 587-605.
- Souza, J. I. D., Schoenlein-Crusius, I. H., Pires-Zottarelli, C. L. A., & Schoenlein, N. C. (2008). Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) RL Szym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patai (Oomycetes). **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 217-223
- Suriya, J., Bharathiraja, S., & Rajasekaran, R. (2013). Biosorption of heavy metals by biomass of *Enterobacter Cloacae* isolated from metal-polluted soils. **Inter. J. Chem. Tech. Res**, v. 5, n. 3, p. 1329-1338.

Svecova, L., Spanelova, M., Kubal, M., & Guibal, E. (2006). Cadmium, lead and mercury biosorption on waste fungal biomass issued from fermentation industry. I. Equilibrium studies. **Separation and purification Technology**, v. 52, n. 1, p. 142-153.

Tonini, R. M. C. W., de Rezende, C. E., & Grativol, A. D. (2010). Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **CEP**, v. 28013, p. 602. Doi:10.4257/oeco.2010.1404.11.

Tran, H. T., Vu, N. D., Matsukawa, M., Okajima, M., Kaneko, T., Ohki, K., & Yoshikawa, S. (2016). Heavy metal biosorption from aqueous solutions by algae inhabiting rice paddies in Vietnam. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 2529-2535.

Tunali S, Kiran I, Akar T. (2005). Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. **Minerals Engineering**, v. 18, n. 7, p. 681-689.

Tunali, S., Cabuk, A., & Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 115, n. 3, p. 203-211.

Tüzün, I., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Celik, G., & Arica, M. Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd (II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Environmental Management**, v. 77, n. 2, p. 85-92.

Ulrich, J. C. (2001). **Determinação de impurezas em compostos de urânio por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo (HR-ICPMS)**. 2001. Tese de Mestrado. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

Urrutia, H., Vidal, R., Baeza, M., Reyes, J. E., & Aspe, E. (1997). Growth of methylaminotrophic, acetotrophic and hydrogenotrophic methanogenic bacteria on artificial supports. **Microbiologia (Madrid, Spain)**, v. 13, n. 2, p. 209-214.

Volesky, B. (2003). Biosorption process simulation tools. **Hydrometallurgy**, v. 71, n. 1, p. 179-190

- Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2, p. 203-216.
- Volesky, B. e Holan, Z. R. (1995). Biosorption of heavy metals. **Biotechnology progress**, v. 11, n. 3, p. 235-250.
- Wang, S., Vincent, T., Faur, C., & Guibal, E. (2016). Alginate and Algal-Based Beads for the Sorption of Metal Cations: Cu (II) and Pb(II). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1453.
- WHO. (1991). Environmental Health Criteria 118. **Geneva: World Health Organization**, v. 107.
- Wiesemann, N., Mohr, J., Grosse, C., Herzberg, M., Hause, G., Reith, F., & Nies, D. H. (2013). **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 10, p. 2298-2308.
- Xin, S., Zeng, Z., Zhou, X., Luo, W., Shi, X., Wang, Q., ... & Du, Y. (2017). Recyclable *Saccharomyces cerevisiae* loaded nanofibrous mats with sandwich structure constructing via bio-electrospraying for heavy metal removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 365-372.
- Yakubu, M. B. (2007). Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 24.
- Yan, G., & Viraraghavan, T. (2003). Thiruvengkatachari. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water research**, v. 37, n. 18, p. 4486-4496.
- Yavuz, H., Denizli, A., Güngüneş, H., Safarikova, M., & Safarik, I. (2006). **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 2, p. 253-260.
- Yılmaz, A. B., Sangün, M. K., Yağlıoğlu, D., & Turan, C. (2010). Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from Iskenderun Bay, Turkey. **Food chemistry**, v. 123, n. 2, p. 410-415.

Yousefi, N., Meserghani, M., Bahrami, H., & Mahvi, A. H. (2016). Assessment of Human Health Risk for Heavy Metals in Imported Rice and its Daily Intake in Iran. **Research Journal of Environmental Tóxicology**, v. 10, n. 1, p. 75.

Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., & Shapley, N. C. (2013). Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 425, p. 31-41.

Zaib, M., Athar, M. M., Saeed, A., Farooq, U., Salman, M., & Makshoof, M. N. (2016). Equilibrium, kinetic and thermodynamic biosorption studies of Hg(II) on red algal biomass of *Porphyridium cruentum*. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 9, n. 4, p. 179-189.

Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Chung, P. U., Lee, K., & Blaghen, M. (2003). Biosorption of mercury from aqueous solution by *Ulva lactuca* biomass. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 349-351.

Zhao, X. W., Zhou, M. H., Li, Q. B., Lu, Y. H., He, N., Sun, D. H., & Deng, X. (2005). Simultaneous mercury bioaccumulation and cell propagation by genetically engineered *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1611-1616.

Zheng, H., Li, J. L., Li, H. H., Hu, G. C., & Li, H. S. (2014). Analysis of trace metals and perfluorinated compounds in 43 representative tea products from South China. **Journal of food science**, v. 79, n. 6, p. C1123-C1129.