

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA MOLECULAR, CELULAR E FISIOLÓGICA
DE *Enterobacter cloacae* UENF P7 A CÁDMIO**

GABRIELA PETROCELI MOTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes - RJ

Março de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M917 Mota, Gabriela Petroceli.

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA MOLECULAR, CELULAR E FISIOLÓGICA DE *Enterobacter cloacae* UENF P7 A CÁDMIO / Gabriela Petroceli Mota. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

165 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientadora: Aline Chaves Intorne.
Coorientadora: Marília Amorim Berbert de Molina.

1. Resistência. 2. Cd. 3. Bacteria. 4. *Enterobacter* sp.. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA MOLECULAR, CELULAR E FISIOLÓGICA
DE *Enterobacter cloacae* UENF P7 A CÁDMIO**

GABRIELA PETROCELI MOTA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Aline Chaves Intorne
Co-orientadora: Prof^a Marília Amorim Berbert de Molina

Campos dos Goytacazes - RJ

Março de 2022

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA MOLECULAR, CELULAR E FISIOLÓGICA
DE *Enterobacter cloacae* UENF P7 A CÁDMIO**

GABRIELA PETROCELI MOTA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 18 de março de 2022

Comissão examinadora:

Prof^a Dr^a. Rachel Ann Hauser Davis (Fiocruz, RJ)

Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares (LBCT/CBB/UENF)

Prof. Dr. Diogo de Abreu Meireles (LFBM/CBB/UENF)

Prof^a. Dr^a. Aline Chaves Intorne (LBT/CBB/UENF) – Orientadora

Prof^a. Dr^a. Marília Amorim Berbert de Molina (LBT/CBB/UENF) –
Co-orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos mais difíceis dessa caminhada, me dando forças para superar todas as dificuldades e me permitir chegar até aqui;

À UENF e ao Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela oportunidade de realizar meu doutorado;

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado;

À FAPERJ, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para execução do projeto de pesquisa;

A minha orientadora, Pro^a Aline Chaves Intorne por me receber em seu grupo de pesquisa, pela dedicação nos ensinamentos e crescimento profissional, que foram essenciais na minha formação;

A minha co-orientadora Prof^a Marília Amorim Berbert de Molina por acreditar e confiar em mim, por todo conhecimento e não ter soltado minha mão desde quando iniciei na vida acadêmica. Hoje finalizo meu ciclo acadêmico com muita gratidão por todo apoio e ensinamento durante esses 10 anos;

Aos colaboradores Dr^a Rachel Ann Hauser-Davis, Dr^a Cibele Maria Stivanin de Almeida, Dr^a Letícia Oliveira da Rocha, Dr Fábio Lopes Olivares, Dr Vanildo Silveira e Dr Felipe Astolpho de Almeida que compartilharam o conhecimento e auxílio na obtenção dos dados;

Aos meus pais, Gilza Petroceli e José Antônio Mota e minhas avós Clicelita Petroceli e Rita Mota, por todo apoio, incentivo, por serem meu alicerce e me amarem incondicionalmente;

Ao meu irmão Vinicius Petroceli, cunhada Andressa Bittencourt e sobrinhos Antônio e Davi por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido Vinicius Azevedo que esteve presente em cada etapa da minha vida acadêmica, por todo apoio e por acreditar em mim quando eu achava que não era possível.

As minhas amigas Moara, Glacielen, Mariana, Analyse, Geórgia, Emilane e Sâmella pelos conselhos, ombro amigo nos momentos difíceis, pela confiança, por todo conhecimento compartilhado e acima de tudo pela amizade.

Aos demais colegas do grupo de Microbiologia Ambiental pelo amor compartilhado pela pesquisa e extensão;

Aos professores, técnicos e colegas do LFBM e LBT, em especial à Rívea Cristina e Adão.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para eu estar aqui hoje.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO	XI
ABSTRACT.....	XII
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	8
2.1. OBJETIVO GERAL	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
4. CAPÍTULO 1.....	16
5. CAPÍTULO 2.....	45
6. CAPÍTULO 3.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	99
9. APÊNDICE A.....	118
10. APÊNDICE B.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus célsius
µm	Micrômetro
µL	Microlitros
ANOVA	Análise de variância
As	Arsênio
C	Concentração residual
C ₀	Concentração inicial
Ca	Cálcio
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
Cu	Cobre
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
DO	Densidade óptica
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
g	Gramas
h	Hora
IARC	International Agency for Research on Cancer
K	Potássio
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	Litro
LB	Luria Bertani
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio

mg	Miligrama
MH	Muller-Hinton Agar
min.	Minutos
mL	Mililitro
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Minimal Salt Agar
Ni	Níquel
nm	Nanômetro
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
nr	Não redundante
P	Fósforo
Pb	Chumbo
S	Enxofre
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
T _f	Tempo final
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
Zn	Zinco
ΔS	Consumo de glicose

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Fig. 1 - Mecanismos de resistência a metais em bactéria.....2

CAPÍTULO 1

Fig. 1 - CIM de íons metálicos em meio sólido para *E. cloacae* UENF P7.....32

Fig. 2 – Cinética de crescimento e consumo de glicose no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 com 22,5 mg L⁻¹ Cd35

Fig. 3 – Morfologia e viabilidade celular de *E. cloacae* UENF P7 após exposição a 22,5 mg L⁻¹ Cd38

Fig. 4 – Morfologia da superfície celular de *E. cloacae* UENF P7 durante o cultivo com 22,5 mg L⁻¹ Cd.....39

CAPÍTULO 2

Fig. 1 - Cinética de crescimento e consumo de glicose no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 com 70 e 140 mg L⁻¹ Cd.....61

Fig. 2 - Morfologia e viabilidade celular de *E. cloacae* UENF P7 após exposição a 70 e 140 mg L⁻¹ Cd.....70

Fig. 3 - Morfologia da superfície celular de *E. cloacae* UENF P7 sob exposição de 70 e 140 mg L⁻¹ Cd.....71

Fig. 4 - Morfologia intracelular de *E. cloacae* UENF P7 durante a fase estacionária do cultivo com 70 e 140 mg L⁻¹ Cd72

CAPÍTULO 3

Fig. 1 - Cinética de crescimento e consumo de glicose no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 com 70 mg L⁻¹ Cd.....92

Fig. 2 - Proteínas reguladas positivamente no ciclo do ácido tricarboxílico.....97

Fig. 3 - Proteínas reguladas positivamente na via de biossíntese da arginina.....99

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tab. 1 - Bactérias resistentes a metais.....	3
--	---

CAPÍTULO 1

Tab. 1 - CIM de Cd em meio sólido para <i>E. cloacae</i> UENF P7 e outras espécies de bactérias	33
---	----

Tab. 2 – Parâmetros de crescimento de <i>E. cloacae</i> UENF P7 cultivada com 22 mg L ⁻¹ Cd.....	35
---	----

Tab. 3 - Avaliação do pH no cultivo de <i>E. cloacae</i> UENF P7 com 22,5 mg L ⁻¹ Cd.....	37
--	----

Tab. 4 - Concentração média dos macronutrientes no cultivo de <i>E. cloacae</i> UENF P7 com 22,5 mg L ⁻¹ Cd.....	42
---	----

Tab. 5 - Concentração média dos micronutrientes no cultivo de <i>E. cloacae</i> UENF P7 com 22,5 mg L ⁻¹ Cd.....	44
---	----

CAPÍTULO 2

Tab. 1 - Parâmetros de crescimento de <i>E. cloacae</i> UENF P7 cultivada com 70 e 140 mg L ⁻¹ Cd.....	62
---	----

Tab. 2 - Avaliação do pH no cultivo de <i>E. cloacae</i> UENF P7 com 70 e 140 mg L ⁻¹ Cd.....	67
--	----

CAPÍTULO 3

Tab. 1 - Proteínas UP reguladas em biomassa de <i>E. cloacae</i> UENF P7 cultivada com 70 mg L ⁻¹ Cd.....	98
--	----

RESUMO

A contaminação ambiental por cádmio (Cd) vem crescendo nas últimas décadas, o que tem aumentado a pressão de seleção por organismos resistentes a esse metal. Cádmio é extremamente tóxico e sem função biológica descrita, mas alguns organismos com vias metabólicas especializadas demonstram capacidade de resistir ao estresse gerado por ele. Neste trabalho, foi examinada a resistência de *Enterobacter cloacae* UENF P7, uma bactéria isolada de planta aquática *Pistia stratiotes*, a altas concentrações de Cd, buscando identificar também os mecanismos utilizados para este fim. A bactéria foi cultivada em frascos agitados, a 30 °C e 165 rpm, em meio líquido suplementado com concentrações crescentes de Cd (22,5; 70 e 140 mg L⁻¹), analisando-se a cinética de crescimento (espectrofotometria), a viabilidade celular e aspectos morfológicos (microscopia ótica, kit LIVE/DEAD®, MET e MEV), assim como as alterações na dinâmica de captação de nutrientes e capacidade de remoção de Cd do meio de cultivo por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Amostras recolhidas ao final do cultivo no meio com 70 mg L⁻¹ Cd foram submetidas à análise proteômica, por espectrometria de massa (Synapt G2-Si HDMS), visando identificar proteínas diferencialmente expressas sob essa condição estressante. Os resultados mostraram que a concentração de 22,5 mg L⁻¹ Cd não alterou a cinética de crescimento e a produção de biomassa foi similar ao controle (DO₆₀₀=4). Ambos apresentaram produção de exopolissacarídeos e não foram identificadas alterações celulares. Além disso, essa condição implicou em maior demanda de alguns macronutrientes (Mg, P, K, Ca e S) e micronutrientes (Mn e Cu), o que pode estar relacionado aos processos metabólicos e enzimáticos envolvidos na estratégia usada pela bactéria para contornar o estresse provocado pelo Cd (Capítulo 1). Em meios com 70 e 140 mg L⁻¹ Cd, houve diminuição do pH durante o cultivo e incremento na produção de células (DO₆₀₀=14,3 e 11,6, respectivamente) em relação ao controle (DO₆₀₀=4). Foram observadas células viáveis no tempo final, mas também alterações na morfologia e presença de grânulos eletrodensos, que foram ausentes no controle. A bactéria foi capaz de remover até 57,7 mg L⁻¹ e 136,2 mg L⁻¹ de Cd, respectivamente, nos meios com 70 e 140 mg L⁻¹ Cd (Capítulo 2). A análise proteômica revelou proteínas reguladas positivamente ao final do cultivo em meio com 70 mg L⁻¹ Cd, dentre essas, proteínas associadas a processos de extrusão do metal, à imobilização por metaloproteínas e à defesa antioxidante. Houve também regulação positiva de proteínas relacionadas ao metabolismo energético e de aminoácidos. Esses dados ajudam a explicitar alguns dos mecanismos envolvidos na desintoxicação de cádmio pela bactéria e sua capacidade de produzir elevadas concentrações celulares sob estresse com o metal. Em conjunto, os resultados aqui obtidos evidenciam a resistência de *E. cloacae* UENF P7 ao Cd e mostram seu potencial para processos biotecnológicos, como a remediação de águas residuais contaminadas com Cd.

Palavras chaves: Resistência; Cd; Bactéria; *Enterobacter sp.*

ABSTRACT

Environmental contamination by cadmium (Cd) has been increasing in recent decades, which has increased the selection pressure for organisms resistant to this metal. Cadmium is extremely toxic and has no described biological function, but some organisms with specialized metabolic pathways demonstrate the ability to resist the stress generated by it. In this work, we examined the resistance of *Enterobacter cloacae* UENF P7, a bacterium isolated from the aquatic plant *Pistia stratiotes*, to high concentrations of Cd, also seeking to identify the mechanisms used for this purpose. The bacteria were cultivated in shake flasks, at 30 °C and 165 rpm, in liquid medium supplemented with increasing concentrations of Cd (22.5; 70 and 140 mg L⁻¹), analyzing the growth kinetics (spectrophotometry), the cell viability and morphological aspects (optical microscopy, LIVE/DEAD® kit, TEM and SEM), as well as changes in the dynamics of nutrient uptake and Cd removal capacity (ICP-OEs) from the culture medium. Samples collected at the end of cultivation in the medium with 70 mg L⁻¹ Cd were submitted to proteomic analysis by mass spectrometry (Synapt G2-Si HDMS), aiming to identify proteins differentially expressed under this stressful condition. The results showed that the concentration of 22.5 mg L⁻¹ Cd did not change the growth kinetics and the biomass production was similar to the control (OD₆₀₀=4). Both showed production of exopolysaccharides and no cellular changes were identified. In addition, this condition implied a greater demand for some macronutrients (Mg, P, K, Ca and S) and micronutrients (Mn and Cu), which may be related to the metabolic and enzymatic processes involved in the strategy used by the bacteria to circumvent the stress caused by Cd (Chapter 1). In media with 70 and 140 mg L⁻¹ Cd, there was a decrease in pH during cultivation and an increase in cell production (OD₆₀₀=14.3 and 11.6, respectively) in relation to the control (OD₆₀₀=4). Viable cells were observed at the final time, but also changes in morphology and presence of electron-dense granules, which were absent in the control. The bacterium was able to remove up to 57.7 mg L⁻¹ and 136.2 mg L⁻¹ of Cd, respectively, in media with 70 and 140 mg L⁻¹ Cd (Chapter 2). Proteomic analysis revealed up-regulated proteins at the end of cultivation in a medium with 70 mg L⁻¹ Cd, including proteins associated with metal extrusion processes, immobilization by metalloproteins and antioxidant defense. There was also upregulation of proteins related to energy and amino acid metabolism. These data help to explain some of the mechanisms involved in the detoxification of cadmium by the bacteria and its ability to produce high cellular concentrations under stress with the metal. Taken together, the results obtained here show the resistance of *E. cloacae* UENF P7 to Cd and show its potential for biotechnological processes, such as the remediation of Cd-contaminated wastewater.

Key words: Resistance; Cd; Bacteria; *Enterobacter* sp.

1. INTRODUÇÃO

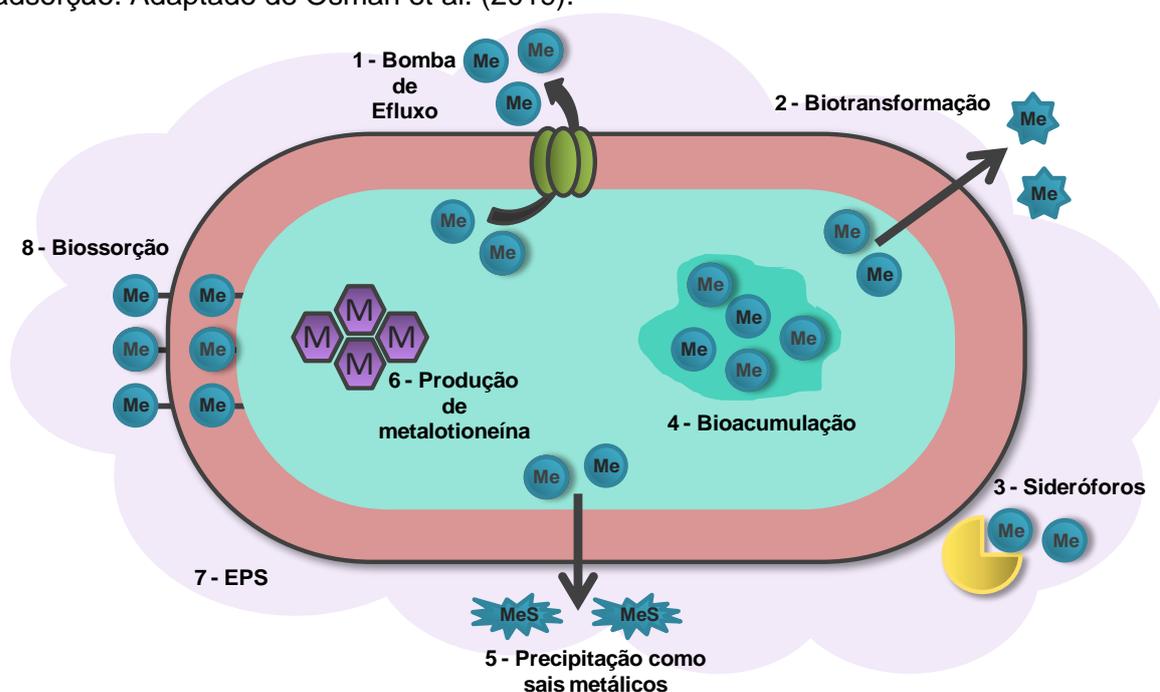
A contaminação por metais é um problema mundial com implicações socioambientais, ecológicas e econômicas. A presença desses elementos em ecossistemas de água doce é intensificada por meio de atividades antropogênicas, como operações de mineração, efluentes industriais e domésticos, curtumes, baterias e escoamento de insumos agrícolas, principalmente, fertilizantes fosfatados (Ali e Khan, 2019; Saravanan et al., 2022). Segundo Bolisetty et al. (2019), 31% dos contaminantes químicos presentes na água são metais e metaloides.

Os metais são considerados um sério desafio aos ecossistemas aquáticos porque não podem ser degradados (Croteau et al., 2005; Ali e Khan, 2019), constituindo uma ameaça, quando biodisponíveis, principalmente em virtude da possível bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica (Ali e Khan, 2019). Metais como cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr) e zinco (Zn) são frequentemente encontrados em corpos hídricos (Azimi et al., 2017). O Cd, especialmente, têm atraído atenção por ser considerado o terceiro contaminante de maior perigo para o meio ambiente, depois do Hg e do Pb (Ismael et al., 2019). Em nível molecular, o Cd causa estresse oxidativo, mudanças epigenéticas na expressão do DNA e interferência competitiva com a ação fisiológica de Zn ou Mg (Matović et al., 2011; Wang et al., 2012; Bernhoft, 2013; Zhang e Reynolds, 2019). A literatura relata que íons metálicos de Cd são muito tóxicos, mesmo em concentrações de 0,001–0,1 mg L⁻¹ (Alkorta et al., 2004).

Por conseguinte, tecnologias inovadoras para remediação de ecossistemas aquáticos contaminados têm surgido e atraído interesse, como a biorremediação mediada por microrganismos. As abordagens de remediação biológica são promissoras por serem ecologicamente corretas e mais baratas (50-65%) comparadas a processos convencionais (Ojuederie e Babalola, 2017).

Nesse cenário, a exposição prolongada à contaminação por metais levou, ao longo da evolução, o desenvolvimento de diversos mecanismos fisiológicos e genéticos de resistência em microrganismos (Figura 1) (Das et al., 2016). Esse processo adaptativo atenua a toxicidade causada pela presença dos elementos metálicos no ambiente.

Fig. 1 - Mecanismos de resistência a metais em bactéria. 1- bombas de efluxo, que expõem o excesso de íons metálicos (Me) da célula; 2- biotransformação, mediada por reações de oxidação microbiana e redução de metais; 3- produção de sideróforos (moléculas orgânicas que podem quelar e mobilizar vários metais); 4- bioacumulação, que envolve a transferência do metal da matriz contaminada para a biomassa microbiana; 5- precipitação do metal no ambiente; 6- produção de metalotioneína (proteínas ricas em cisteína que podem complexar com íons metálicos); 7- Produção de matriz de exopolissacarídeos (EPS) 8- bioissorção, processo de absorção do metal ou retenção por adsorção. Adaptado de Osman et al. (2019).



Devido à sua natureza adaptativa e mecanismo celular, as bactérias podem resistir e remover diferentes tipos de metais, como Cu, Cd, Co e Fe (Tabela 1). *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. já foram descritos com essas características (Abbas et al., 2014; Kamran et al., 2015; Ahmad et al., 2016; Ka-ot et al., 2018; Heidari et al., 2020; Ramos et al., 2020). Nesse contexto, alguns desses mecanismos podem ser explorados para a biorremediação.

Tab. 1 - Bactérias resistentes a metais.

Microrganismos	Metais	Referências
<i>Enterobacter</i> sp. DNB-S2	Cd, Pb, Ni, Cu, Cr e Zn	Sun et al. (2020)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Loktanella cinnabarina</i> , <i>Dietzia maris</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Cd, Co, Cu, Zn, Mn e Ni	Gillard et al. (2019)
<i>Enterobacter</i> sp. YSU e <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> O2	Hg, Cd, Zn, Cu, Cr, Pb, Au, Ag, As e Se	Holmes et al. (2009)
<i>Enterobacter</i> sp. SL e <i>Acinetobacter</i> sp. SL-1	Zn, Cd e Cr	Sun et al. (2020)
<i>Pseudomonas saponiphila</i> , <i>Pseudomonas hunanensi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas asiatica</i>	Cu, Cd, Co, Hg e Zn	Ramos et al. (2020)
<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp. e <i>Enterococcus</i> sp.	Pb, Ni e Cd	Ajmal et al. (2021)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RA-14	Hg, Pb, Zn, Cu, Cd e Ni	Al-Ansari et al. (2021)
<i>Bacillus</i> sp.	As, Zn, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Mn, Mo, Au, Ag	Alotaibi et al. (2021)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zn, Cu, Ag, Cd	Farcasanu e Ruta (2017)
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	Cd, Hg, As, Zn, Co, Ni, Pb, Cr	Mergeay e Houdt (2020)
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter kobei</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Rhizobium pusense</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cd e Pb	Abdollahi et al. (2020)
<i>Viridibacillus arenosi</i> B-21, <i>Sporosarcina sol</i> B-22, <i>Enterobacter cloacae</i> KJ-46 e <i>E. cloacae</i> KJ-47	Pb, Cd e Cu	Kang et al. (2016)

Enterobacter cloacae é um bastonete Gram-negativo, anaeróbico facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Liu et al., 2013; Singh et al., 2017). Segundo Ristuccia e Cunha (1985), apresentam largura entre 0,5 a 0,8 µm e comprimento entre 1,0 a 2,0 µm, móveis por flagelos peritríquios. O gênero foi

descrito pela primeira vez em 1960, porém, ao longo dos anos houve mudanças taxonômicas (Hormaeche & Edwards, 1960).

As principais vias metabólicas são conservadas entre as diferentes cepas *E. cloacae*, dentre elas a capacidade de usar diferentes fontes de carbono (exemplos: glicose, lactose, frutose, sacarose, arabitol, glicerol) (Liu et al., 2013; Singh et al., 2017). A faixa ótima de pH para crescimento está compreendida entre 5 e 7 (Khanna et al., 2011).

Essa bactéria é ubíqua na natureza, podendo se associar a uma variedade de hospedeiros e nichos ecológicos. Estudos relatam o isolamento dessa bactéria de plantas (Khalifa et al., 2016; Macedo-Raygoza et al., 2019; Panigrahi et al., 2020) e ambientes contaminados com metais (Banerjee et al., 2015; Bojórquez et al., 2016; Das et al., 2017; Sabullah et al., 2017).

A variedade de habitats reflete a diversidade genética e versatilidade metabólica da espécie *E. cloacae* (Liu et al., 2013). A espécie é mais relatada como patógeno humano oportunista e de relevância clínica, responsável por várias infecções hospitalares (Mezzatesta et al., 2012; Davin-Regli et al., 2019). No entanto, muitas cepas apresentam aptidões positivas que são exploradas para processos biotecnológicos. Por exemplo, atuam na promoção do crescimento vegetal (Singh et al., 2017; Saeed et al., 2019; Ghosh et al., 2022), na produção de hidrogênio (Nath et al., 2015; Balachandar et al., 2020), biosurfactante (Ekprasert et al., 2020; Uyar e Sağlam, 2021) e em processos de biorremediação (Banerjee et al., 2015; Ghosh et al., 2022).

Dessa forma, devido a grande importância da bactéria na área tecnológica, muitos trabalhos investigam a sua capacidade para resistir e remover metais e metalóides, bem como os mecanismos envolvidos nesse processo (Naik et al., 2012; Chen et al., 2016; Dash et al., 2020; Nwaehiri et al., 2020; Khanthom et al., 2021). Por exemplo, *E. cloacae* TU, isolada de solo contaminado, apresentou excelente desempenho na remoção de Cd (37,4-97,4%), por meio de adsorção, absorção e produção de EPS (Xu et al., 2017). Os autores relatam mudanças na morfologia quando expostas ao Cd, caracterizadas por depressões e deformações após adsorver o metal. Alterações morfológicas, em células bacterianas, podem ser mecanismos de defesa para reduzir o estresse por metais (Jiang et al., 2019; Sun et al., 2020; Wang et al., 2020).

Do mesmo modo, mudanças morfológicas, como aumento no tamanho (~62%) e redução de volume celular foram relatadas na cepa *E. cloacae* RSN3 sob estresse de arsênio (As) (Dash et al., 2020). Análises por espectroscopia de absorção atômica (AAS) demonstraram que esta bactéria foi capaz de absorver 32,22% do metalóide quando cultivada em meio nutriente.

Resultados promissores para remoção de metal, empregando mecanismos diversificados, também foram descritos em outros estudos. Por exemplo, *E. cloacae* P2B mostrou resistência a Pb, Cd e Hg, bem como foi capaz de remover, por meio de EPS, 17% de Pb em pH 7,2 (Naik et al., 2012). Bojórquez et al. (2016), mostram que a cepa *E. cloacae* LMG foi eficiente na sorção de Cd e Pb, em uma taxa de 15 e 72%, respectivamente. A cepa *E. cloacae* AS10 mostrou capacidade de acumular Cd intracelular e adsorver na parede celular por meio de ligações com grupos funcionais. A taxa de remoção do metal do meio compreendeu os valores entre 72,11 a 98,81%, dependendo da concentração inicial (Ghosh et al., 2022).

Na literatura também é documentado que a exposição a metais altera os perfis de expressão proteica como forma de adaptação ao meio estressante. Chuanboon et al. (2019) relatam que três cepas *E. cloacae* (ATCC 13047, EC01 e EC07) foram resistentes e removeram Cd através de mecanismos de sorção. Os autores também mostraram que um conjunto de proteínas foi regulado positivamente em resposta à toxicidade do Cd, como catalase, Hsp20, malato desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, superóxido dismutase, frutose-bifosfato aldolase, GroEL, hidrolase putativa, ATP sintase, enolase, sistema PTS específico para glicose, hidroperoxidase. *E. cloacae* B1 absorveu 95,25% de Pb, 64,17% de Cd e 36,77% de Ni, após três dias de exposição apresentou expressão de proteínas envolvidas na redução de estresses oxidativos causado pela presença dos metais (Banerjee et al., 2015).

A cepa *Enterobacter cloacae* UENF P7, objeto de estudo do presente trabalho foi isolada da planta aquática hiperacumuladora de metais, *Pistia stratiotes*, proveniente do Rio Paraíba do Sul (RPS) (Resende-RJ, Brasil) (Silva, 2017). O RPS é um rio de médio porte que atravessa os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, os três estados mais desenvolvidos do Brasil (Carvalho et al., 2002). Ao logo da bacia hidrográfica, parques industriais e

idades foram estabelecidos, conseqüentemente, o rio recebe efluentes dessas atividades: escoamento agrícola, resíduos industriais e esgoto doméstico (Miguens et al., 2016). Portanto, o RPS é impactado por elevadas concentrações de metais (por exemplo: Cd, Cu, Fe, Co, Cr, Zn e Pb), sendo considerado poluído (Meneguelli-Souza et al., 2021; Miguens et al., 2016). Nesse contexto, Dalcorso et al. (2019) afirmam que cepas isoladas de plantas hiperacumuladoras e de ambientes contaminados são mais resistentes a metais e têm maior potencial para biorremediação de metais.

E. cloacae UENF P7 teve seu genoma sequenciado e foi evidenciado a presença de vários genes codificadores de proteínas envolvidas com a resistência a metais (loide) (Cu, Zn, Co, Cd, Ni e As) na bactéria, como transportadores de efluxo de membrana e enzimas antioxidantes. Em ensaios *in vitro* a bactéria apresentou resistência a Cd e Cu (Silva, 2017).

Em suma, é de grande interesse desvendar os mecanismos envolvidos na resistência e biorremediação de metais por *E. cloacae* UENF P7 para serem explorados em processos biotecnológicos voltados para a desintoxicação ou remoção de metal do meio. Neste sentido, o trabalho apresentado a seguir foi organizado e dividido em três capítulos.

No Capítulo 1, inicialmente foi avaliada a capacidade de *E. cloacae* UENF P7 em resistir a diferentes metais. Dentre os metais, a cepa apresentou maior resistência ao Cd. Portanto, foi explorada a resposta dessa espécie bacteriana ao Cd (22,5 mg L⁻¹ Cd), avaliando-se a cinética de crescimento, sua morfologia e remoção de íons. Essa cepa mostrou ser resistente a concentração do metal testada e não apresentou alterações morfológicas, bem como foi capaz de remover o metal do meio.

No Capítulo 2, foi explorada a resposta de *E. cloacae* UENF P7 a concentrações ainda mais elevadas de Cd no meio de cultivo (70 e 140 mg L⁻¹ Cd). Foi estudada a cinética de crescimento, a produção de biomassa bacteriana, viabilidade celular, características morfológicas, capacidade de sorção do metal e o monitoramento do pH. Os resultados mostraram que o crescimento desta cepa em ambas concentrações de Cd, foi superior ao controle e demonstrou elevada capacidade de remoção deste metal. Isto indica que a bactéria foi capaz de ativar mecanismos de proteção contra o agente estressor e utilizar vias metabólicas

alternativas para obtenção de energia. Também foi verificada modificações morfológicas e diminuição dos valores de pH do meio, que pode influenciar na remoção do metal.

No Capítulo 3, visando ampliar o conhecimento sobre o crescimento de *E. cloacae* UENF P7 em 70 mg L^{-1} Cd e reduzir a influência do pH na remoção do metal, foi realizado cultivo em meio tamponado para estudar a cinética de crescimento, produção de células, remoção de Cd e análise proteômica em momento previamente determinado do processo. Os resultados evidenciaram que nas condições avaliadas, *E. cloacae* UENF P7 apresentou maior remoção de Cd e mecanismos eficientes de defesas antioxidantes para contornar os possíveis efeitos negativos desse metal.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a cepa *Enterobacter cloacae* UENF P7, isolada da planta aquática *Pistia stratiotes*, sob condições de estresse metálico e investigar seu potencial para biorremediação de Cd.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Determinar a concentração inibitória mínima dos metais Cd, Co, Fe e Cu, em meio sólido, para *Enterobacter cloacae* UENF P7;
- B. Avaliar a cinética de crescimento bacteriano em meio líquido com diferentes concentrações de Cd, de modo a identificar o efeito do metal sobre a produção de biomassa;
- C. Verificar a viabilidade celular da cepa sob influência do agente estressante Cd;
- D. Identificar possíveis modificações na morfologia da célula bacteriana em exposição ao Cd;
- E. Analisar a influência de Cd na composição nutricional das células;
- F. Avaliar a eficiência de remoção de Cd por *E. cloacae* UENF P7;
- G. Realizar análise de proteômica da biomassa bacteriana obtida em meio contendo alta concentração de Cd, buscando investigar os mecanismos utilizados por *E. cloacae* UENF P7 para resistência ao metal.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Ismail, N., Lalung, J., 2014. Isolation, identification, characterization, and evaluation of cadmium removal capacity of *Enterobacter* species. *J. Basic Microbiol.* 54, 1279–1287.
- Abdollahi, S., Golchin, A., Shahryari, F., 2020. Lead and cadmium-resistant bacterial species isolated from heavy metal-contaminated soils show plant growth-promoting traits. *Int. Microbiol.* 23, 625–640.
- Ahmad, I., Akhtar, M.J., Asghar, H.N., Ghafoor, U., Shahid, M., 2016. Differential effects of plant growth-promoting rhizobacteria on maize growth and cadmium uptake. *J. Plant Growth Regul.* 35, 303–315.
- Ajmal, A.W., Saroosh, S., Mulk, S., Hassan, M.N., Yasmin, H., Jabeen, Z., Nosheen, A., Shah, S.M.U., Naz, R., Hasnain, Z., Qureshi, T.M., Waheed, A., Mumtaz, S., 2021. Bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils adapt to heavy metal toxicity while maintaining their plant growth promoting traits. *Sustainability* 13, 7792.
- Al-Ansari, M.M., Benabdelkamel, H., AlMalki, R.H., Abdel Rahman, A.M., Alnahmi, E., Masood, A., Ilavenil, S., Choi, K.C., 2021. Effective removal of heavy metals from industrial effluent wastewater by a multi metal and drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain RA-14 using integrated sequencing batch reactor. *Environ. Res.* 199, 111240.
- Ali, H., Khan, E., 2019. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs-concepts and implications for wildlife and human health. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 25, 1353–1376.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Onaindia, M., Garbisu, C., 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 3, 55–70.
- Alotaibi, B.S., Khan, M., Shamim, S., 2021. Unraveling the underlying heavy metal detoxification mechanisms of *Bacillus* species. *Microorganisms* 9, 1628.
- Azimi, A., Azari, A., Rezakazemi, M., Ansarpour, M., 2017. Removal of heavy metals from industrial wastewaters: a review. *ChemBioEng Rev.* 4, 37–59.
- Balachandar, G., Varanasi, J.L., Singh, V., Singh, H., Das, D., 2020. Biological hydrogen production via dark fermentation: a holistic approach from lab-scale

- to pilot-scale. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 5202–5215.
- Banerjee, G., Pandey, S., Ray, A.K., Kumar, R., 2015. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 91.
- Bernhoft, R.A., 2013. Cadmium toxicity and treatment. *Sci. World J.* 2013.
- Bojórquez, C., Frías Espericueta, M.G., Voltolina, D., 2016. Removal of cadmium and lead by adapted strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 32, 407–412.
- Bolisetty, S., Peydayesh, M., Mezzenga, R., 2019. Sustainable technologies for water purification from heavy metals: review and analysis. *Chem. Soc. Rev.*
- Carvalho, C.E., Salomão, M.S.M., Molisani, M., Rezende, C., Lacerda, L., 2002. Contribution of a medium-sized tropical river to the particulate heavy-metal load for the South Atlantic Ocean. *Sci. Total Environ.* 284, 85–93.
- Chen, Y., Chao, Y., Li, Y., Lin, Q., Bai, J., Tang, L., Wang, S., Ying, R., 2016. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp. Strain EG16 under cadmium stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1734–1744.
- Chuanboon, K., Na Nakorn, P., Pannengetch, S., Laengsri, V., Nuchnoi, P., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Isarankura-Na-Ayudhya, P., 2019. Proteomics and bioinformatics analysis reveal potential roles of cadmium-binding proteins in cadmium tolerance and accumulation of *Enterobacter cloacae*. *PeerJ* 7, e6904.
- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., Stewart, A.R., 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1511–1519.
- Dalcorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G., Furini, A., 2019. Heavy metal pollutions : state of the art and innovation in phytoremediation. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Das, A., Belgaonkar, P., Raman, A.S., Banu, S., Osborne, J.W., 2017. Bioremoval of lead using *Pennisetum purpureum* augmented with *Enterobacter cloacae* - VITPASJ1: A pot culture approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 15444–
- Das, S., Dash, H.R., Chakraborty, J., 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments

- with toxic metal pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2967–2984.
- Dash, B., Sahu, N., Singh, A.K., Gupta, S.B., Soni, R., 2020. Arsenic efflux in *Enterobacter cloacae* RSN3 isolated from arsenic-rich soil. *Folia Microbiol. (Praha)*. 1–8.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J., Pagès, J.-M., 2019. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 32.
- Ekprasert, J., Kanakai, S., Yosprasong, S., 2020. Improved biosurfactant production by *Enterobacter cloacae* B14, stability studies, and its antimicrobial activity. *Polish J. Microbiol.* 69, 273–282.
- Farcasanu, I.C., Ruta, L.L., 2017. Metallothioneins, *Saccharomyces cerevisiae*, and heavy metals: a biotechnology triad?, em: Old Yeasts - New Questions. InTech.
- Ghosh, A., Pramanik, K., Bhattacharya, S., Mondal, S., Ghosh, S.K., Maiti, T.K., 2022. A potent cadmium bioaccumulating *Enterobacter cloacae* strain displays phytobeneficial property in Cd-exposed rice seedlings. *Curr. Res. Microb. Sci.* 3, 100101.
- Gillard, B., Chatzievangelou, D., Thomsen, L., Ullrich, M.S., 2019. Heavy-metal-resistant microorganisms in deep-sea sediments disturbed by mining activity: An application toward the development of experimental *in vitro* systems. *Front. Mar. Sci.* 6, 462.
- Heidari, P., Sanaeizade, S., Mazloomi, F., 2020. Removal of nickel, copper, lead and cadmium by new strains of *Sphingomonas melonis* e8 and *Enterobacter hormaechei* WW28. *Journal Appl. Biotechnol. Reports* 7, 208–214.
- Holmes, A., Vinayak, A., Benton, C., Esbenshade, A., Heinselmann, C., Frankland, D., Kulkarni, S., Kurtanich, A., Caguiat, J., 2009. Comparison of Two Multimetal Resistant Bacterial Strains: *Enterobacter* sp. YSU and *Stenotrophomonas maltophilia* ORO2. *Curr. Microbiol.* 59, 526–531.
- Hormaeche, E., Edwards, P.R.A., 1960. The proposed genus *Enterobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 10, 71–74.
- Ismael, M.A., Elyamine, A.M., Moussa, M.G., Cai, M., Zhao, X., Hu, C., 2019. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics* 11, 255–277.

- Jiang, Z., Jiang, L., Zhang, L., Su, M., Tian, D., Wang, T., Sun, Y., Nong, Y., Hu, S., Wang, S., Li, Z., 2019. Contrasting the Pb (II) and Cd (II) tolerance of *Enterobacter* sp. via its cellular stress responses. *Environ. Microbiol.* 22, 1507–1516.
- Ka-ot, A.L., Banerjee, S., Haldar, G., Joshi, S.R., 2018. Acid and heavy metal tolerant *Bacillus* sp. from Rat-Hole Coal Mines of Meghalaya, India. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 88, 1187–1198.
- Kamran, M.A., Syed, J.H., Eqani, S.A.M.A.S., Munis, M.F.H., Chaudhary, H.J., 2015. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on cadmium (Cd) uptake by *Eruca sativa*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 9275–9283.
- Kang, C.H., Kwon, Y.J., So, J.S., 2016. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecol. Eng.* 89, 64–69.
- Khalifa, A.Y.Z., Alsyeeh, A.M., Almalki, M.A., Saleh, F.A., 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 79–86.
- Khanna, N., Kotay, S.M., Gilbert, J.J., Das, D., 2011. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *J. Biotechnol.* 152, 9–15.
- Khanthom, S., Stewart, T.N., Prapagdee, B., 2021. Potential of a rhizobacterium on removal of heavy metals from aqueous solution and promoting plant root elongation under heavy metal toxic conditions. *Environ. Technol. Innov.* 22, 101419.
- Liu, W.Y., Wong, C.F., Chung, K.M.K., Jiang, J.W., Leung, F.C.C., 2013. Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8, e74487.
- Macedo-Raygoza, G.M., Valdez-Salas, B., Prado, F.M., Prieto, K.R., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Canto-Canché, B.B., Carrillo-Beltrán, M., Di Mascio, P., White, J.F., Beltrán-García, M.J., 2019. *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen. *Front. Microbiol.* 10.
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Đukić-Ćosić, D., 2011. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium.

- Arch. Ind. Hyg. Toxicol. 62, 65–76.
- Meneguelli-Souza, A.C., Pestana, I.A., Azevedo, L.S., de Almeida, M.G., de Souza, C.M.M., 2021. Arsenic in the lower drainage basin of the Paraíba do Sul River (Southeast Brazil): dynamics between the water column and sediment. *Environ. Monit. Assess.* 193, 57.
- Mergeay, M., Houdt, R. Van, 2020. *Cupriavidus metallidurans* CH34, a historical perspective on its discovery, characterization and metal resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Mezzatesta, M.L., Gona, F., Stefani, S., 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 7, 887–902.
- Miguens, F.C., Oliveira, M.L. de, Ferreira, A. de O., Barbosa, L.R., Melo, E.J.T. de, Carvalho, C.E.V. de, 2016. Structural and elemental analysis of bottom sediments from the Paraíba do Sul River (SE, Brazil) by analytical microscopy. *J. South Am. Earth Sci.* 66, 82–96.
- Naik, M.M., Pandey, A., Dubey, S.K., 2012. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. *Biodegradation* 23, 775–783.
- Nath, D., MANHAR, A.K., GUPTA, K., SAIKIA, D., DAS, S.K., MANDAL, M., 2015. Phytosynthesized iron nanoparticles: effects on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DH-89. *Bull. Mater. Sci.* 38, 1533–1538.
- Nwaehiri, U.L., Akwukwaegbu, P.I., Nwoke, B.E.B., 2020. Bacterial remediation of heavy metal polluted soil and effluent from paper mill industry. *Environ. Anal. Heal. Toxicol.* 35, e2020009.
- Ojuederie, O., Babalola, O., 2017. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1504.
- Osman, G.E.H., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Shaaban, M.R., Samreen, Ahmad, I., 2019. Recent progress in metal-microbe interactions: prospects in bioremediation. *J. Pure Appl. Microbiol.* 13, 13–26.
- Panigrahi, S., Mohanty, S., Rath, C.C., 2020. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with Indole Acetic Acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities

- against selected crops. South African J. Bot. 134, 17–26.
- Ramos, M.S., Furlan, J.P.R., Gallo, I.F.L., dos Santos, L.D.R., de Campos, T.A., Savazzi, E.A., Stehling, E.G., 2020. High Level of resistance to antimicrobials and heavy metals in multidrug-resistant *Pseudomonas* sp. isolated from water sources. Curr. Microbiol. 77, 2694–2701.
- Ristuccia, P.A., Cunha, B.A., 1985. *Enterobacter*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 6, 124–128.
- Sabullah, M.K., Rahman, M.F., Ahmad, S.A., Sulaiman, M.R., Shukor, M.S., Shamaan, N.A., Shukor, M.Y., 2017. Assessing resistance and bioremediation ability of *Enterobacter* sp. strain Saw-1 on molybdenum in various heavy metals and pesticides. J. Math. Fundam. Sci. 49, 193.
- Saeed, Z., Naveed, M., Imran, M., Bashir, M.A., Sattar, A., Mustafa, A., Hussain, A., Xu, M., 2019. Combined use of *Enterobacter* sp. MN17 and zeolite reverts the adverse effects of cadmium on growth, physiology and antioxidant activity of *Brassica napus*. PLoS Genet. 14.
- Saravanan, A., Kumar, P.S., Hemavathy, R.V., Jeevanantham, S., Harikumar, P., Priyanka, G., Devakirubai, D.R.A., 2022. A comprehensive review on sources, analysis and toxicity of environmental pollutants and its removal methods from water environment. Sci. Total Environ. 812, 152456.
- Silva, N.D., 2017. Genômica e Proteômica de *Enterobacter cloacae* UENF P7: uma bactéria resistente a estresse isolada de planta aquática. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Singh, R.P., Nalwaya, S., Jha, P.N., 2017. The draft genome sequence of the plant growth promoting rhizospheric bacterium *Enterobacter cloacae* SBP-8. Genomics Data 12, 81–83.
- Sun, R., Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y., 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China. Environ. Pollut. 263, 114612.
- Sun, Y., Lan, J., Du, Y., Li, Z., Liao, X., Du, D., Ye, H., Zhangc, T.C., Chen, S., 2020. Efficient removal of heavy metals by synergistic actions of microorganisms and waste molasses. Bioresour. Technol. 302, 122797.
- Uyar, E., Sağlam, Ö., 2021. Isolation, screening and molecular characterization of

- biosurfactant producing bacteria from soil samples of auto repair shops. Arch. Microbiol. 203, 4929–4939.
- Wang, B., Li, Y., Shao, C., Tan, Y., Cai, L., 2012. Cadmium and its epigenetic effects. Curr. Med. Chem. 19, 2611–2620.
- Wang, Q.F., Li, Q., Lin, Y., Hou, Y., Deng, Z., Liu, W., Wang, H., Xia, Z.M., 2020. Biochemical and genetic basis of cadmium biosorption by *Enterobacter ludwigii* LY6, isolated from industrial contaminated soil. Environ. Pollut. 264, 114637.
- Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W., Lu, D., 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU. Chemosphere 173, 622–629.
- Zhang, H., Reynolds, M., 2019. Cadmium exposure in living organisms: a short review. Sci. Total Environ. 678, 761–767.

4. CAPÍTULO 1

**CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E CAPTAÇÃO DE NUTRIENTES NA CEPA
Enterobacter cloacae UENF P7 ALTAMENTE
RESISTENTE A CÁDMIO**

RESUMO

A crescente biodisponibilidade de metais tóxicos no ambiente aquático em decorrência de atividades antrópicas é um problema que demanda a busca por soluções de mitigação e controle. O cádmio (Cd) é um metal hidrossolúvel de elevada toxicidade, com difícil remoção dos corpos hídricos, o que tem incentivado estudos de biorremediação, empregando-se bactérias resistentes ao metal como alternativa para recuperar áreas contaminadas. Neste trabalho, foi examinada a capacidade de *Enterobacter cloacae* UENF P7, uma bactéria isolada de planta aquática *Pistia stratiotes*, em resistir a altas concentrações de cádmio, sendo avaliado o crescimento da cepa, sua morfologia e captação de íons. Inicialmente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos metais cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe) e Cd para a bactéria em cultivo em meio sólido. Em seguida, foi analisado o efeito do Cd sobre a cinética de produção de biomassa microbiana, viabilidade celular, características morfológicas da célula, biossorção do metal pela bactéria e alterações na dinâmica de captação de nutrientes do meio de cultivo. Para tanto, a bactéria foi cultivada em meio LB (controle) ou LB suplementado com CdCl₂ (22,5 mg L⁻¹ de Cd), em frascos Erlenmeyer, a 30 °C e 165 rpm. Como resultado, a cepa cresceu na presença dos quatro metais testados. Co foi o mais tóxico deles (CIM: 470 mg L⁻¹), seguido por Cu (CIM: 1.200 mg L⁻¹), Fe (CIM: 1.600 mg L⁻¹) e Cd (CIM: 8.000 mg L⁻¹), cuja a máxima concentração com formação de colônia foi extremamente elevada (7.300 mg L⁻¹). Neste sentido, ao analisar a cinética de crescimento da bactéria em meio líquido suplementado com Cd (22,5 mg L⁻¹), o cultivo foi muito similar ao obtido no controle, com densidade óptica máxima (DO: 4,1) e tempo de fermentação iguais (8 h). A conversão da DO em concentração celular, bem como a quantificação por unidade formadora de colônia, a análise de viabilidade celular e de microscopia de contraste de fase confirmaram a equivalência na produção de células no meio LB com e sem a adição de Cd. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram ausência de alterações celulares nas células expostas a Cd, mas evidenciaram maior produção de exopolissacarídeos. Análise por ICP-MS mostrou que a bactéria foi capaz de remover Cd do meio. Os dados mostraram também que células de *E. cloacae* UENF P7 desafiadas com Cd tiveram maior demanda de macronutrientes (Mg, P, K, Ca e S) e micronutrientes (Mn e Cu), o que pode estar relacionado à capacidade da bactéria em contornar o estresse mediado por Cd, utilizando esses elementos em enzimas e processos metabólicos. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a cepa *E. cloacae* UENF P7 é altamente resistente a Cd, bem como possui mecanismos de remoção do metal, sendo candidata a formulação de um inoculante em processos de biorremediação.

Palavra-chave: Bactéria; Resistência a estresse; Metal tóxico; Exopolissacarídeo; Composição nutricional.

1. INTRODUÇÃO

O despejo de efluentes domésticos e industriais não tratados nos corpos hídricos, assim como os fertilizantes e pesticidas lixiviados, podem levar a eutrofização e poluição das águas (Abbas et al., 2014; Ayele e Atlabachew, 2021; Wang et al., 2020). Neste contexto, a contaminação por metais constitui um problema global e uma ameaça crescente, uma vez que esses elementos não são degradados e podem se acumular na cadeia trófica (Kumar et al., 2019).

Metais como cobre, ferro e cobalto são micronutrientes essenciais para o funcionamento celular, porém, em elevadas concentrações, podem ser tóxicos (Crans e Kostenkova, 2020). No caso do cádmio (Cd), mesmo em concentrações baixas (0,001 - 0,1 mg L⁻¹) (Alkorta et al., 2004), o elemento apresenta toxicidade para a maioria dos organismos (Khan et al., 2017), sendo considerado um potencial carcinogênico pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) (Joseph, 2009). Embora não seja metal redox, o Cd pode causar estresse oxidativo, levando a danos no DNA e na síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Chen et al., 2016). Somado a isso, é muito solúvel em água, o que aumenta seu potencial de contaminação (Das et al., 2014; Li et al., 2018; Shi et al., 2020).

O Rio Paraíba do Sul está localizado no principal eixo industrial do Brasil, tendo suas águas afetadas por múltiplos usos, por exemplo: pela indústria, agricultura, exploração de areia, reservatórios, abastecimento e canalização do rio (Britto et al., 2016). Alguns estudos têm relatado a presença de metais (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, As e Zn) dissolvidos na água do rio, no material particulado e no sedimento (Meneguelli-Souza et al., 2021; Valitutto et al., 2007).

Pistia stratiotes é uma planta aquática hiperacumuladora de Cd (Ergönül et al., 2020), com ampla distribuição no Rio Paraíba do Sul (Valitutto et al., 2007). Recentemente, *Enterobacter cloacae* UENF P7 foi isolada de *P. stratiotes* coletada no rio e teve seu genoma sequenciado. Dessa forma, foi evidenciada a presença de vários genes codificadores de proteínas de resistência a metais na bactéria, como transportadores de efluxo de membrana e enzimas antioxidantes (Silva, 2017).

Microrganismos isolados de ambientes contaminados com metais apresentam estratégias para sobreviver e combater o estresse através de diferentes mecanismos. A secreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) pode imobilizar íons metálicos (Dhanya et al., 2021; Vélez et al., 2021) e sistemas de transporte removem e acumulam o metal tóxico através de mecanismos físico-químicos (Abbas et al., 2018).

Enterobacter cloacae já foi isolada de plantas (Khalifa et al., 2016; Macedo-Raygoza et al., 2019; Panigrahi et al., 2020) e diferentes nichos ecológicos: lodo de esgoto ativado (Guo et al., 2015), aterro sanitário (Rahman et al., 2015), água e solo contaminados com metais e hidrocarbonetos (Banerjee et al., 2015; Bojórquez et al., 2016; Das et al., 2017; Kamaludeen e Ramasamy, 2008; Sabullah et al., 2017). Estudos *in vitro* têm verificado a capacidade da espécie em resistir a elevadas concentrações de Cd (Chen et al., 2016; Xu et al., 2017), Cu (Khanthom et al., 2021; Mazalan et al., 2020), Fe (Nwaehiri et al., 2020; Pattnaik et al., 2020) e chumbo (Pb) (Banerjee et al., 2015; Das et al., 2017). Algumas cepas apresentaram mecanismos de resistência à metais envolvendo mudanças morfológicas (Naik et al., 2012; Xu et al., 2017), produção de sideróforos (Chen et al., 2016), produção de EPS (Naik et al., 2012; Xu et al., 2017), atividade de enzimas antioxidantes (Banerjee et al., 2015) e adsorção e absorção de metais (Bojórquez et al., 2016; Chen et al., 2016; Xu et al., 2017).

No presente trabalho, foi analisada a resistência de *E. cloacae* UENF P7 aos metais Co, Cu, Fe e Cd, avaliando-se detalhadamente o efeito de Cd sobre o crescimento da bactéria, a sua viabilidade, morfologia e ultraestrutura das células. Também foi estudado o impacto deste metal sobre a composição nutricional de *E. cloacae*. Os resultados mostraram que a cepa UENF P7 foi capaz de contornar a toxicidade de Cd, sendo altamente resistente ao metal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cepa bacteriana e preparo de inóculo

Enterobacter cloacae UENF P7 foi isolada da raiz da planta aquática *Pistia stratiotes*, coletada no Rio Paraíba do Sul, em Resende-RJ, Brasil. O número de acesso à cepa no GenBank é NQLK 00000000.1 (Silva, 2017).

Culturas da bactéria foram estocadas em solução de glicerol 40% a -80 °C e ativadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido. Foi utilizado para inóculo meio LB modificado (g L⁻¹): glicose, 10; triptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5 com pH 6,0 (Xu et al., 2017). O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com chicanas, contendo 50 mL de meio e inoculados com alçadas de cultura fresca ativadas em meio sólido. Os frascos foram incubados a 30 °C e 165 rpm, em agitador orbital (SOLAB SL-222) até o cultivo alcançar *midlog*.

2.2. Solução dos metais

As soluções estoques (1 mol L⁻¹) foram preparadas usando graus analíticos de sais metálicos (CdCl₂.H₂O - CINÉTICA; FeCl₃.6H₂O - VETEC, CoCl₂.6H₂O e CuCl₂.2H₂O - DINÂMICA) em água ultrapura (Sistema Milli-Q), esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm. Alíquotas das soluções foram adicionadas ao meio de cultivo em volume adequado para obter as concentrações desejadas dos íons metálicos.

2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM de cada metal para a cepa bacteriana foi determinada de acordo com o método descrito por Wiegand et al. (2008). Para tanto, 10 µL de inóculo foram transferidos para placas de Petri contendo meio GYS sólido modificado (g L⁻¹: glicose, 10; extrato de levedura, 6; (NH₄)₂SO₄, 1,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; K₂HPO₄, 0,5; agar-agar, 15; com pH 6,0) (Berbert-Molina et al., 2008) suplementado com concentrações crescentes de Co (95 a 470 mg L⁻¹), Fe (135 a 1.600 mg L⁻¹), Cu (85 a 1.200 mg L⁻¹) e Cd (900 a 8.000 mg L⁻¹). As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 7 dias em estufa bacteriológica (HERAEUS 6200). Para controle, o cultivo também foi realizado em meio sem suplementação dos sais metálicos.

2.4. Cultivo bacteriano em meio líquido suplementado com Cd

A cinética de crescimento bacteriano em meio contendo Cd (22,5 mg L⁻¹) foi avaliada empregando-se frascos Erlenmeyer de 500 mL, com chicanas, contendo 100 mL de meio e 5 % v/v de inóculo. Meio LB sem adição de Cd foi empregado como controle. Os frascos foram incubados em agitador orbital (SOLAB SL-222) a 30°C e 165 rpm.

O crescimento celular foi monitorado por espectrofotometria (SHIMADZU UV-1800), a 600 nm (DO₆₀₀), de amostras retiradas em intervalos regulares, até o cultivo atingir a fase estacionária. Posteriormente, os valores de DO₆₀₀ foram convertidos em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume), utilizando uma curva de calibração, conforme descrito por Siqueira (2015). Para a construção da curva foi utilizada uma suspensão de células de *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio LB nas condições citadas, retiradas na fase *midlog*. A variação do pH do meio foi acompanhada durante o cultivo. No tempo final de cultivo, foi realizada contagem de unidade formadora de colônias (UFC) em placas de Petri, utilizando-se meio LB adicionado de ágar (15 g L⁻¹).

Os valores de concentração celular (X) foram utilizados para o cálculo de parâmetros de fermentação. A produtividade em células (Q_x) foi calculada pela equação $Q_x = (X_m - X_0)/t_{x_m}$, em que X_m é a máxima concentração celular, X_0 a concentração celular inicial e t_{x_m} o tempo necessário para obtenção de X_m . O rendimento em células a partir de glicose ($Y_{x/s}$) foi calculado utilizando-se a equação $Y_{x/s} = (X_m - X_0)/(\Delta S)$, em que ΔS é a diferença entre a concentração inicial de glicose e a concentração em t_{x_m} (Berbert et al., 2008).

2.5. Quantificação de glicose

A determinação da concentração de glicose no meio durante o cultivo bacteriano foi feita pelo método descrito por Lindsay (1973). Brevemente, 500 µL do meio fermentado foi centrifugado (EPPENDORF 5804 R) a 16.873 x g por 5 min. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 250 µL do sobrenadante e 250 µL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS - ÊXODO CIENTÍFICA), mantendo-se a mistura em banho-maria a 100 °C por 15 min. Após resfriamento, foram adicionados 2 mL de água ultrapura aos tubos,

seguindo-se a leitura da absorbância a 540 nm (SHIMADZU UV-1800). Solução de glicose P.A (VETEC) foi utilizada como padrão.

2.6. Análise de viabilidade celular

A viabilidade das células no tempo final do cultivo foi avaliada com emprego do kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Assays (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo, 100 µL da suspensão bacteriana foi corada com 0,5 µL de cada marcador fluorescente (fluorocromo SYTO 9 e iodeto de propídio) e a mistura foi incubada no escuro por 15 min. Em seguida, a amostra foi observada em microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axioplan).

2.7. Análise da morfologia celular

Para observação da morfologia celular de *E. cloacae* UENF P7 em resposta a Cd, foi realizada análise de microscopia de amostras retiradas do cultivo. Para microscopia óptica, foram feitas lâminas a fresco, sem diluição da amostra, utilizando microscópio de contraste de fase (Zeiss Axioplan).

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), um volume de 2 mL de meio fermentado foi centrifugado (EPPENDORF 5804 R) a 16.873 x g por 5 min. O processamento das amostras seguiu o protocolo de (Baldotto et al., 2011). Brevemente, o pellet foi fixado com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,1. Após a fixação, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio por 20 min., desidratado em séries crescentes de álcool (15, 30, 50, 70 e 100%) por 30 min., seguido de ponto crítico em CO₂ (CPD030 BAL-TEC). As amostras foram fixadas em suportes porta amostra de alumínio e metalizadas (SCD050 BAL-TEC) com uma liga de ouro-paládio. O material foi visualizado no microscópio eletrônico de varredura EVO 40 (Zeiss).

2.8. Determinação de Cd e composição nutricional das células

A capacidade de remoção do Cd e o efeito desse metal sobre o nível de macronutrientes (Mg, Ca, S, K e P) e micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn e Mo) nas células de *E. cloacae* UENF P7 foram quantificados durante o cultivo em

meio LB suplementado com 22,5 mg L⁻¹ de Cd e em meio LB sem adição deste metal (controle). Resumidamente, 15 mL do meio fermentado foram centrifugados (EPPENDORF 5804 R) a 3.438 x g por 20 min. e lavado duas vezes. O pellet e o sobrenadante (100 mg de cada tratamento) foram digeridos com 1,0 mL de ácido nítrico bidestilado (HNO₃, 67% v/v) e aquecidos a 100 °C nos tubos tampados por 4 h. Após o resfriamento, as amostras foram diluídas com água ultrapura (Sistema Milli-Q) e analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), empregando-se um espectrômetro Nexlon 300x (PerkinElmer, EUA). A taxa de remoção de Cd, expressa em porcentagem, foi calculada usando a equação: Taxa de remoção = $[(C_0 - C) / C_0] \times 100$, em que C₀ é a concentração inicial de Cd (mg L⁻¹) e C a concentração residual de Cd (mg L⁻¹) (Pramanik et al., 2017).

2.9. Análises estatísticas

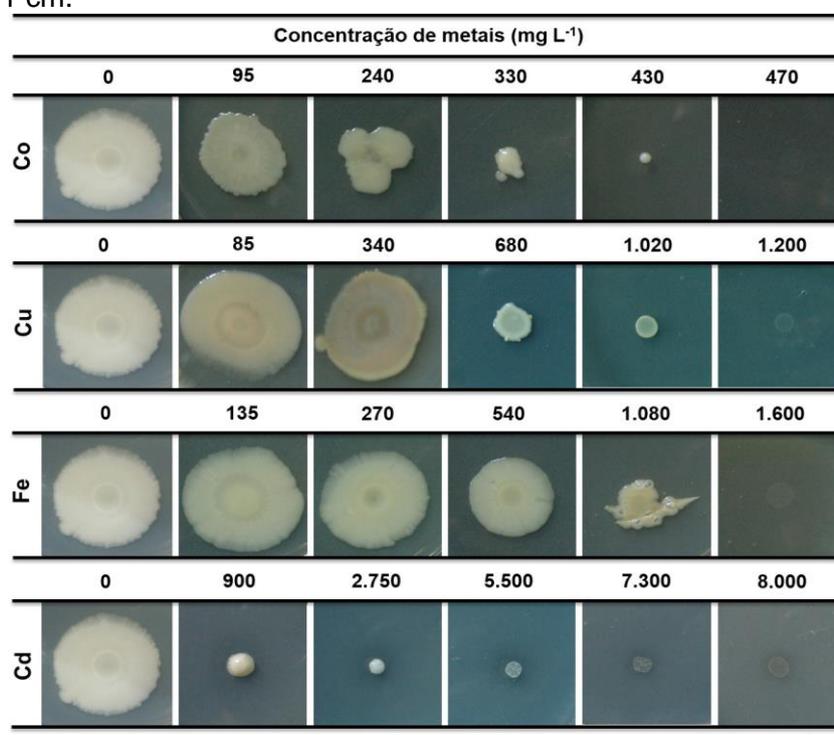
Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão de réplicas biológicas (n=3) e analíticas (n=3). As análises estatísticas foram realizadas usando Graphpad Prism 9.0 para avaliar as diferenças significativas entre cada tratamento por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a um nível de significância de (p ≤ 0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resistência a metais por *E. cloacae* UENF P7

Com o objetivo de avaliar o efeito de Co, Fe, Cu e Cd sobre o crescimento de *E. cloacae* UENF P7, foi realizado ensaio de CIM para determinar a menor concentração dos respectivos metais capaz de inibir a formação de colônias em placa de Petri. *E. cloacae* UENF P7 foi capaz de crescer na presença de todos os metais testados em elevadas concentrações, sendo Co identificado como mais tóxico (470 mg L^{-1}), seguido por Cu (1.200 mg L^{-1}), Fe (1.600 mg L^{-1}) e Cd (8.000 mg L^{-1}) (Fig. 1).

Fig. 1 - CIM de íons metálicos em meio sólido para *E. cloacae* UENF P7. A barra equivale a 1 cm.



Resultado semelhante ao encontrado foi descrito para *Enterobacter* sp. C1D (Subrahmanyam et al., 2018). A cepa também apresentou menor resistência a Co (CIM: 10 mg L^{-1}) comparado a Cu (CIM: 400 mg L^{-1}). No entanto, os valores de CIM obtidos nesta pesquisa foram inferiores aos do presente trabalho. Isso pode estar relacionado ao método utilizado por Subrahmanyam et al. (2018) para realização do ensaio de CIM, que envolvia diluição em placas de Petri.

Em relação a Fe, a CIM obtida para *E. cloacae* UENF P7 foi na mesma faixa de concentração a verificada para *Enterobacter* sp. CTWI-06 (CIM: 1.300 mg L⁻¹) (Pattnaik et al., 2020). Neste caso foi utilizado meio LB e SLP sólido com métodos de plaqueamento semelhantes aos do presente trabalho.

Entre os quatro metais avaliados, *E. cloacae* UENF P7 teve melhor resposta a Cd, apresentando formação de colônia em placa com até 7.300 mg L⁻¹ do metal, uma concentração superior a encontrada na literatura para outros microrganismos (Tab. 1). Sun et al. (2020) atribuíram à cepa *Enterobacter* sp. DNB-S2 uma elevada resistência a Cd, ao verificar CIM de 2.605 mg L⁻¹, utilizando método de difusão em ágar, um valor três vezes inferior ao nosso estudo.

Tab. 1 - CIM de Cd em meio sólido para *E. cloacae* UENF P7 e outras espécies de bactérias.

Cepa bacteriana	Cd	Meio*	CIM (mg L ⁻¹)	Referências
<i>Enterobacter cloacae</i> UENF P7	CdCl ₂	LB	8.000	Presente estudo
<i>Bacillus cereus</i> CFSD01	CdCl ₂	MS	6.039	Muzammil et al. (2021)
<i>Enterobacter</i> sp. S2	CdCl ₂	DM	3.500	Mitra et al. (2018b)
<i>Enterobacter</i> sp. DNB-S2	CdSO ₄	LB	2.605	Sun et al. (2020)
<i>Bacillus cereus</i> MG257494.1 <i>Alcaligenes faecalis</i> MG966440.1	CdCl ₂	MH	2.500	EI-Meihy et al. (2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CdCl ₂	LB	2.200	Lin et al. (2016)

* MS: Minimal Salt agar; DM: Davis Mingioli e MH: Muller-Hinton agar.

A capacidade de *E. cloacae* UENF P7 em sobreviver a elevadas concentrações de Cd pode estar relacionada ao local de seu isolamento. O Rio Paraíba do Sul, onde a planta foi coletada, é um ambiente muito impactado, recebendo elevada carga de efluentes industriais (Meneguelli-Souza et al., 2021). Tonhá et al. (2021) identificaram 0,4 – 3,3 mg kg⁻¹ Cd no material particulado em suspensão coletado no RPS, em Volta Redonda – RJ. Os reservatórios de Santana e Vigário - RJ, por exemplo, que recebem água

proveniente do Rio Paraíba do Sul já apresentaram elevadas concentrações de elementos metálicos no material particulado, incluindo Fe (35.429-40.965 mg kg⁻¹), Zn (184-219 mg kg⁻¹), Cr (177–241 mg kg⁻¹), Pb (43–59 mg kg⁻¹), Cu (34–52 mg kg⁻¹) e Cd (0,23–0,26 mg kg⁻¹) (Valitutto et al., 2007). Além disso, análises das macrófitas aquáticas *P. stratiotes*, *Salvinia auriculata*, *Eichhornia crassipes* e *Eichhornia azurea* desses reservatórios apresentaram acúmulo desses elementos (Valitutto et al., 2007).

Somado a isso, *P. stratiotes* é normalmente uma macrófita capaz de fitorremediar metais e apresenta elevada tolerância a Cd (Chukwuka et al., 2020). (Rodrigues et al., 2017) verificaram que os teores de Cd e Zn na biomassa seca desta planta aumentaram de acordo com o aumento das concentrações dos metais, com capacidade de remoção superior a 70% das soluções utilizadas.

Dessa forma, é esperado que a microbiota associada ao vegetal também tenha essas características, inferindo-se, adicionalmente, que possa auxiliar a planta a viver nessas condições (Ghosh et al., 2020). Portanto, devido à resposta de *E. cloacae* UENF P7 a Cd no ensaio de CIM, este metal foi selecionado para um estudo mais aprofundado de resistência na bactéria.

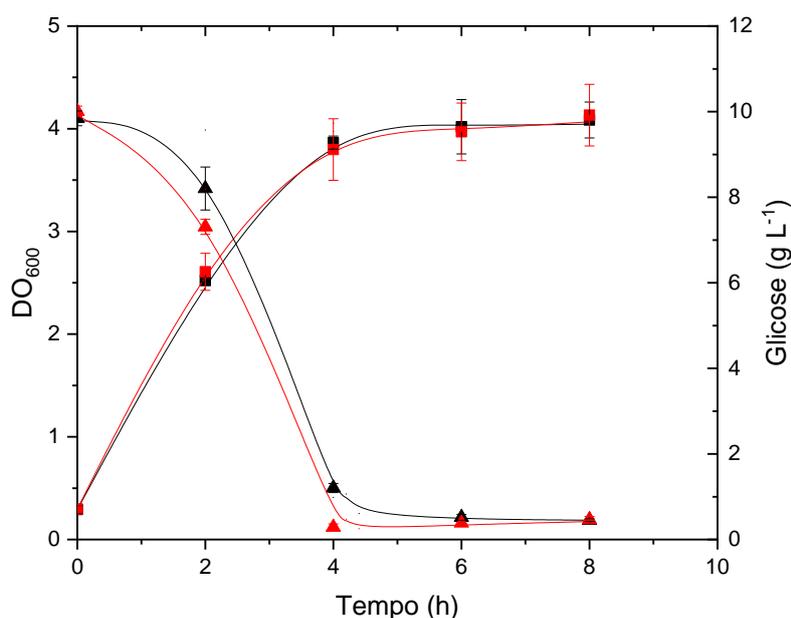
3.2. Efeito do Cd no crescimento de *E. cloacae* UENF P7

O cultivo de *E. cloacae* UENF P7 em meio LB líquido suplementado com 22,5 mg L⁻¹ de Cd foi realizado com a finalidade de verificar o efeito do metal sobre o crescimento da bactéria. Conforme observado na Fig. 2, a cinética de crescimento no meio com a concentração de Cd testada (22,5 mg L⁻¹) foi semelhante à obtida na condição controle (sem adição de Cd), com DO máxima (4,1) e tempo de fermentação (8 h) similares. A velocidade de consumo de glicose foi ligeiramente superior no meio contendo Cd, mas em ambos os casos o substrato foi quase todo consumido (Fig. 2).

A conversão dos valores de DO em concentração celular e o cálculo dos parâmetros de fermentação confirmaram que o desempenho da bactéria no meio suplementado com Cd foi equivalente ao verificado no meio controle (Tab. 2). A máxima concentração celular (X_m) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e embora o tempo necessário para alcançá-la (t_{x_m}) tenha

vido um pouco maior no meio com adição de Cd, a produtividade volumétrica em células (Q_x) foi similar ($p>0,05$). Com a produção de células equivalente (X_m) e uma pequena diferença no total de açúcar consumido (ΔS), os valores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) entre os tratamentos também foram muito similares.

Fig. 2 – Cinética de crescimento (quadrado) e consumo de glicose (triângulo), em função do tempo (h), no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 em meio LB controle (preto) ou com $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd (vermelho). Os dados são médias \pm desvio padrão ($n=3$).



Tab. 2 – Parâmetros de crescimento de *E. cloacae* UENF P7 em meio com adição de $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd. Os dados são médias \pm desvio padrão ($n=3$).

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	$22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd
t_{xm} (h) ^a	6,04	6,55
X_m (g L ⁻¹) ^b	$1,31 \pm 0,09$	$1,32 \pm 0,05$
Q_x (g L.h ⁻¹) ^c	$0,22 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$
$Y_{x/s}$ (g/g) ^d	0,14	0,13
ΔS (g L ⁻¹) ^e	9,49	9,94

^a Tempo para atingir a concentração máxima de células; ^b Concentração máxima de células; ^c Produtividade celular, calculada em t_{xm} ; ^d Rendimento de biomassa com base na glicose, calculado em t_{xm} ; ^e Consumo de glicose até t_{xm} .

A análise da concentração celular por plaqueamento em meio sólido ao final da fermentação também foi realizada. Como esperado, os dados evidenciaram uma concentração de células viáveis similares no meio controle ($2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e no meio contendo 22,5 mg L⁻¹ de Cd ($1,8 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), confirmando a resistência de *E. cloacae* UENF P7 ao metal nesta condição.

Perfis cinéticos de crescimento de diferentes espécies bacterianas em meios contendo variadas concentrações de Cd são encontrados na literatura. No entanto, uma comparação direta com o presente trabalho é dificultada pelas condições de cultivo e composição do meio distintas. Ainda assim, é possível fazer alguns apontamentos interessantes.

Chen et al. (2016) observaram cinéticas de crescimento similares no cultivo de *Enterobacter sp.* EG16 em caldo nutriente sem adição de Cd (controle) e suplementado com 5 e 10 mg L⁻¹ de Cd (Cd(NO₃)₂ foi o sal utilizado). Os autores não mencionaram as condições operacionais empregadas no estudo, mas o tempo total de processo (28 h) foi muito superior ao observado no presente trabalho. Os máximos valores de DO obtidos também foram diferentes, sendo duas vezes menor quando comparado a *E. cloacae* UENF P7, tanto no controle quanto nos meios com Cd, o que reforça o potencial biotecnológico da cepa isolada de *P. stratiotes*.

Em outro estudo, Abbas et al. (2014) avaliaram o efeito de uma concentração muito superior deste metal (100 mg L⁻¹ - o sal utilizado foi CdCl₂) sobre o desempenho de *Enterobacter mori* e *Enterobacter sp.* WS12, cultivadas em condições similares às empregadas no presente trabalho. À exceção da duração da fase *lag*, que foi 4 h mais longa nos meios com Cd, os perfis de crescimento de *E. mori* foram similares ao observado no meio controle, já a cepa WS12 apresentou menores valores de DO final e velocidades de crescimento.

No cultivo de *Bacillus cereus*, bactéria Gram-positiva e formadora de esporos, Huang et al. (2014) observaram que a cinética de crescimento foi visivelmente afetada por concentrações de Cd (II) acima de 20 mg L⁻¹, com aumento progressivo da fase *lag*. Todavia, a exemplo do obtido no presente trabalho, a curva de crescimento em meio com 20 mg L⁻¹ Cd foi semelhante à

do controle, com DO final similar, o que significa ausência de inibição da bactéria nessa concentração de metal. Experimentos posteriores com a cepa UENF P7 serão necessários para avaliar concentrações mais elevadas que $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd.

Outro efeito do Cd no crescimento de *E. cloacae* UENF P7 avaliado durante o cultivo, foi a alteração de pH do meio, aferindo-se os valores na *midlog* (2 h) e ao final com 8 h de fermentação. Observou-se redução nos valores de pH mais acentuada no meio contendo Cd, apresentando diferença significativa comparada ao controle no tempo de 2 h ($p < 0,01$) (Tab. 3). Este resultado é compatível com a análise da cinética de consumo de glicose (Fig. 2), que evidenciou um maior consumo do açúcar no meio com Cd, especialmente no tempo de 2 h. Sugere-se que esse comportamento da bactéria acarretou a produção de mais ácidos orgânicos na presença do metal.

Tab. 3 - Avaliação do pH durante o cultivo de *E. cloacae* UENF P7 com adição de $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd. Os dados são médias \pm desvio padrão ($n=3$).

Tratamentos	pH		
	0 h	2 h	8 h
Controle	$6,0 \pm 0,06$	$4,7 \pm 0,10$	$3,8 \pm 0,18$
$22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd	$6,0 \pm 0,06$	$4,3 \pm 0,10$	$3,3 \pm 0,06$

O pH exerce influência direta na disponibilidade de Cd, bem como nos sítios de ligação do metal na superfície das células (Das et al., 2014; Rao et al., 2011). Em pH ácido (<5), a ligação do Cd à superfície celular é reduzida devido a sua competição com o íon hidrogênio, prejudicando a sorção do metal (Heidari et al., 2020; Lu et al., 2006). Estudos realizados com *Enterobacter* sp. mostraram que a dessorção de Cd da superfície das células foi eficiente em pH ácido (<3) (Lu et al., 2006; Xu et al., 2017). Em *Bacillus cereus* MG257494.1 e *Alcaligenes faecalis* MG966440.1, o processo de bio-sorção de Cd foi mais eficiente em meios com pH próximos ao neutro do que em pH ácido (El-Meihy et al., 2019). Dessa forma, a redução do pH do meio de cultivo com adição de

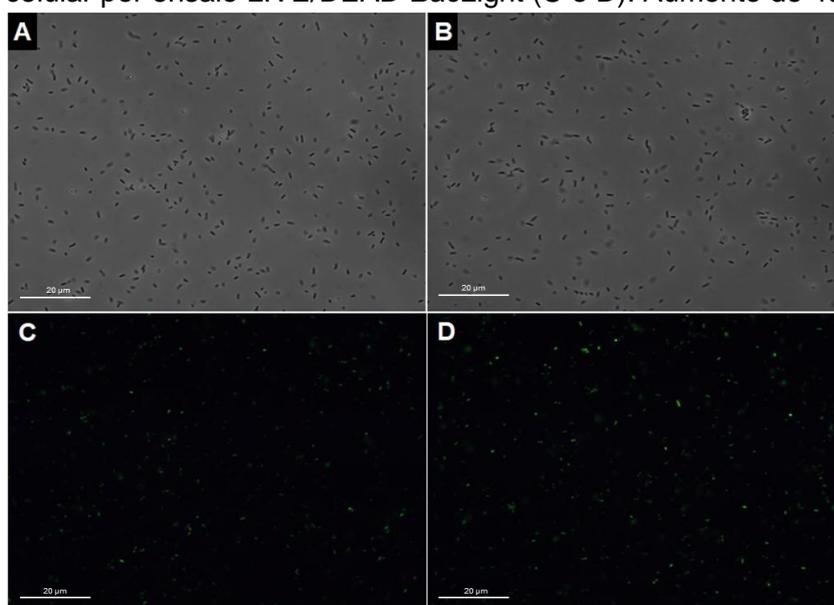
Cd, verificado no presente trabalho, parece ser um fator importante no mecanismo de resistência ao metal por *E. cloacae* UENF P7.

3.3. Morfologia e viabilidade de *E. cloacae* UENF P7 após exposição a Cd

Para confirmar o crescimento e a viabilidade celular de *E. cloacae* UENF P7, amostras não diluídas do meio fermentado com adição de Cd foram retiradas no tempo final da fermentação (8 h). Na análise por microscopia de contraste de fase dessas amostras, observou-se que a produção de células no meio com $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd foi similar à verificada no meio controle (Fig. 3A e 3B), corroborando os resultados obtidos na análise da concentração celular por espectrofotometria e por plaqueamento em meio sólido.

O teste de viabilidade das células usando o kit LIVE/DEAD *BacLight* mostrou, nos dois tratamentos avaliados, a presença de células vivas ao final do cultivo, evidenciada pela fluorescência verde (Fig. 3C e 3D). Aparentemente, as células expostas a $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd (Fig. 3D) não apresentaram uma redução na viabilidade, em comparação com o controle.

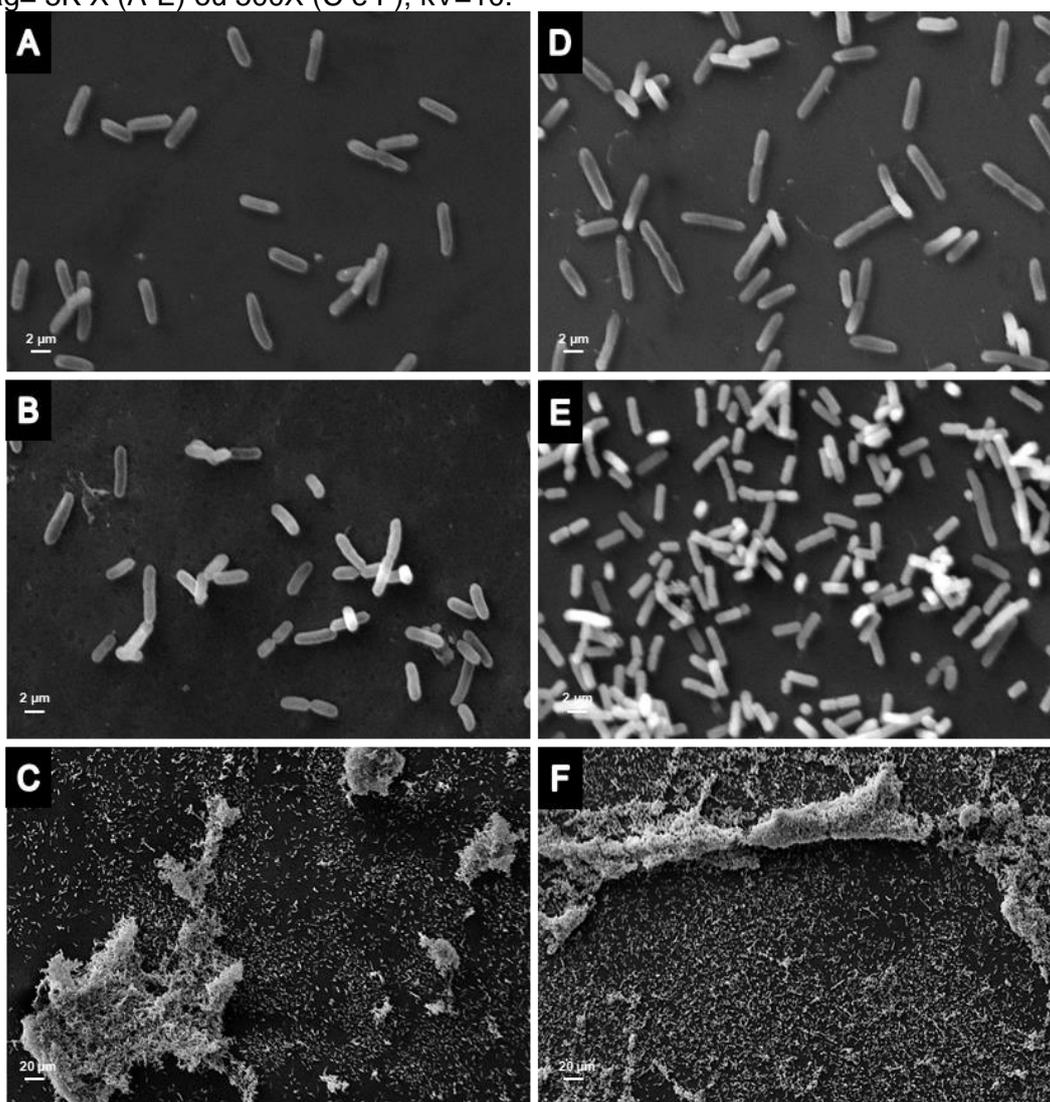
Fig. 3 – *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio LB líquido por 8 h sem adição de Cd (controle; A e C) ou suplementado com $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ (B e D), sendo analisada as características morfológicas por microscopia óptica de contraste de fase (A e B) e a viabilidade celular por ensaio LIVE/DEAD *BacLight* (C e D). Aumento de 400X.



Análises de MEV também foram realizadas com as amostras do cultivo. Neste caso, foram verificadas eventuais alterações morfológicas na superfície

das células de *E. cloacae* UENF P7 durante os tempos de 2 e 8 h em meio suplementado com 22,5 mg L⁻¹ de Cd. Nas micrografias são observadas bactérias em forma de bastonete com a superfície celular lisa em ambos os tratamentos (Fig 4A, 4B, 4D e 4E).

Fig. 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio LB líquido sem adição de Cd (controle: A-C) ou suplementado com 22,5 mg L⁻¹ de Cd (D-F). As amostras do meio fermentado foram retiradas nos tempos de 2 h (A e D) e de 8 h (B e E), verificando-se a formação de biofilme no tempo de 8 h (C e F). Mag= 5K X (A-E) ou 500X (C e F); kV=10.



As células cultivadas em meio LB com Cd não apresentaram alterações morfológicas significativas (Fig. 4D-F) em comparação ao controle (Fig. 4A-C). Com 8 h de cultivo (Fig. 4B e E), foi verificada uma redução no comprimento

das células em relação ao observado no tempo de 2 h (Fig. 4A e D), que pode ser atribuída a qualquer outra condição nutricional do meio neste momento da fermentação, uma vez que o comportamento também ocorreu quando a bactéria foi cultivada em meio LB sem suplementação com 22,5 mg L⁻¹ de Cd. Huang et al. (2014) também não observaram mudanças morfológicas em *Bacillus cereus* quando cultivada em meio com 20 mg L⁻¹ de Cd, ao contrário do ocorrido na presença de concentrações superiores do metal, em que as células apresentaram deformações na superfície e alteração de tamanho. Alterações morfológicas também foram relatadas para *Enterobacter* sp. em meios com maiores concentrações de Cd (50-200 mg L⁻¹ Cd) (Jiang et al., 2019; Xu et al., 2017). Neste caso, será também interessante avaliar o crescimento de *E. cloacae* UENF P7 em concentrações maiores de Cd em experimentos posteriores.

A análise por MEV em menor aumento revelou ainda que ocorreu uma evidente agregação das células no tempo final de 8 h (Fig. 4C e 3F), o que pode ser atribuído à produção de EPS pela bactéria. Vale ressaltar que embora o comportamento tenha sido verificado em ambos os tratamentos, a formação de agregados pode ser um mecanismo de resistência adotado por essa cepa UENF P7 (Xu et al., 2017).

E. cloacae UENF P7 foi capaz de lidar com as condições de crescimento ofertadas, vencendo eventuais efeitos negativos do Cd sobre a célula e produzindo biomassa em meio com Cd de modo equivalente ao meio sem adição do metal. Desta forma, futuramente a bactéria poderá ser desafiada a concentrações maiores de Cd para verificar sua capacidade de resistência e possíveis alterações morfológicas.

3.4. Remoção de Cd por *E. cloacae* UENF P7

Para avaliar a capacidade de *E. cloacae* UENF P7 de remover Cd, inicialmente foi calculada a taxa de remoção através da determinação da concentração residual do metal no meio. Em seguida, também foi determinada a concentração de Cd nas células. Como resultado, foi verificado que houve remoção do metal pela bactéria e que essa taxa de remoção aumentou com o tempo de cultivo.

Na fase logarítmica de crescimento (2 h), a taxa de remoção de Cd foi de 27,6%, enquanto no final da fase estacionária (8 h) este valor foi significativamente maior, chegando a 42,5% ($p < 0,05$). A determinação do Cd nas células corrobora estes dados, sendo verificado aumento da concentração do metal na biomassa bacteriana, de 4,5 ($\pm 0,2$) para 6,4 mg L⁻¹ ($\pm 0,9$) de Cd ($p < 0,05$), com 2 e 8 h de cultivo, respectivamente. Huang et al. (2014) verificaram capacidade de remoção de Cd semelhante em células de *Bacillus cereus*, com remoção máxima de Cd de aproximadamente 6,5 mg L⁻¹, alcançada com 16 h de cultivo. De acordo com a literatura, a remoção de Cd pelas células pode variar de acordo com as fases do crescimento bacteriano, com melhor desempenho na fase logarítmica (Huang et al., 2014; Mitra et al., 2018a, 2018b; Yilmaz e Ensari, 2005).

Algumas espécies de bactérias, incluindo *Enterobacter* sp., são candidatas ao emprego em processos de biorremediação devido à elevada capacidade de remover Cd. Em geral, são observadas nessas espécies taxas de remoção do metal superiores a 70% (Abbas et al., 2014; El-Meihy et al., 2019; Pramanik et al., 2017; Sun et al., 2020). *E. cloacae* UENF P7 apresentou taxa de remoção menor (42,5%), porém, a concentração de Cd acumulada na biomassa bacteriana (6,4 mg L⁻¹) é considerada elevada e pode representar uma vantagem, uma vez que em pouco tempo a bactéria foi capaz de remover uma grande quantidade do metal.

Mitra et al. (2018b) indicaram o emprego de *Enterobacter* sp. S2 em processo de biorremediação, ao relatar elevada taxa de remoção (98%) de Cd pela bactéria. No entanto, este valor correspondia a 2,2 mg L⁻¹ do metal. Do mesmo modo, Pramanik et al. (2017) observaram taxa de remoção elevada (90%), correspondente a 2,9 mg L⁻¹ de Cd por *Klebsiella pneumoniae* MCC 3091. Neste trabalho, os autores ainda mostraram que a bactéria foi capaz de aliviar a fitotoxicidade de Cd em mudas de arroz após biorremediação do metal pela cepa MCC 3091. Dessa forma, os resultados aqui obtidos mostram que *E. cloacae* UENF P7 é altamente resistente ao Cd, bem como possui mecanismos de remoção do metal em meio líquido e pode ser candidata a processos de biorremediação.

3.5. Análise nutricional das células

Ao analisar as concentrações de macro e micronutrientes nas células de *E. cloacae* UENF P7 expostas a Cd (22,5 mg L⁻¹), nos tempos de 2 h e 8 h, foram observadas diferenças significativas na absorção dos elementos. Essas diferenças foram verificadas tanto entre os tratamentos quanto entre os tempos analisados.

As células na presença de Cd apresentaram maior demanda em todos os macronutrientes avaliados (P, K, Ca, Mg e S) (Tab. 4). K e Mg, por exemplo, foram estáveis no controle, nos dois tempos de cultivo. Porém no tratamento com Cd, as concentrações destes elementos foram significativamente maiores, com aumento de 111% no nível de K (p<0,01), com 2 h de processo, e de 13% no nível de Mg (p<0,01), no tempo de 8 h (Tab. 4).

Tab. 4 - Concentração média dos macronutrientes nas células de *E. cloacae* UENF P7 após cultivo em meio LB (controle) e LB com adição de Cd (22,5 mg L⁻¹). As concentrações foram expressas em mg L⁻¹. Os dados são médias ± desvio padrão (n=3).

Nutrientes	Controle		22,5 mg L ⁻¹ Cd	
	2 h	8 h	2 h	8 h
Mg	386,2 ± 17,8	390,5 ± 6,8	413,0 ± 13,6	441,7 ± 10,6
P	4021,0 ± 144,2	4405,7 ± 104,7	4478,0 ± 147,8	5138,0 ± 41,8
K	666,1 ± 72,5	686,8 ± 19,0	1407,0 ± 38,9	917,2 ± 252,0
Ca	96,0 ± 8,2	79,9 ± 3,0	120,5 ± 5,6	121,0 ± 6,4
S	955,4 ± 25,6	1212,7 ± 29,7	1019,7 ± 47,2	1363,5 ± 53,5

Nos níveis de P houve aumento com o tempo de cultivo, sendo a demanda por esse elemento maior nas células expostas ao Cd que no controle (2h: p<0,05); 8h: p<0,001) (Tab. 4). A concentração de Ca nas células tratadas com Cd foi a mesma nos dois tempos analisados, porém superior à concentração deste elemento nas células cultivadas no meio controle, nos dois tempos (25% e 51,4%, respectivamente) (Tab. 4). Em relação ao S, as células

tratadas com Cd apresentaram uma concentração 12,4% maior que a do controle no tempo de 8 h ($p < 0,05$) (Tab. 4).

Quando os organismos são expostos ao Cd, o metal pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a danos celulares e inibição de processos fisiológicos (Ozturk et al., 2021). Logo, os níveis elevados de macronutrientes nas células expostas a Cd podem estar relacionados à maior produção e atividade de enzimas antioxidantes para contornar o estresse oxidativo gerado (Gill e Tuteja, 2011; Mendoza-Cózatl et al., 2005).

Gao et al. (2018) observaram que a adição de Ca reduziu o estresse oxidativo gerado por Cu através da ativação das enzimas superóxido dismutase e catalase em células do fungo *Ganoderma lucidum*. O Ca participa na cascata de sinalização para ativar a expressão dessas proteínas em resposta a estresses ambientais (Gao et al., 2018). Isso deve justificar o aumento da sua absorção pela cepa UENF P7 na presença de Cd. Plantas expostas a Cd com a adição de Ca, tiveram peroxidação lipídica nas células reduzida e um alívio na inibição do crescimento (Li et al., 2016; Wan et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Similar ao Ca, S também desempenha um papel importante nas plantas desafiadas com Cd e está diretamente relacionada ao crescimento e resistência ao estresse por ativação de enzimas (Gill e Tuteja, 2011; Matraszek et al., 2016). As proteínas que possuem em sua estrutura resíduos de S, podem se ligar ao Cd e inativar, devido a sua elevada afinidade pelo elemento (Wang et al., 2019). Sob estresse do Cd, *Burkholderia cepacia* GYP1 apresentou regulação positiva para glutathione que pode estar envolvida na ligação ao Cd através do resíduo de S (Zhang et al., 2019). Para compreender os mecanismos de resistência de *E. cloacae* UENF P7, será pertinente analisar a expressão protéica das células cultivadas na presença do Cd.

Considerando que Mg e Ca são cátions divalentes, a bactéria *E. cloacae* UENF P7 também pode estar aumentando a demanda desses elementos para competir com o Cd na superfície da célula, evitando a entrada do metal tóxico (Begg et al., 2015). Em plantas, a competição entre nutrientes e Cd pelos mesmos transportadores reduz a disponibilidade e sequestro desse metal nos

compartimentos celulares (Tran e Popova, 2013). Vale destacar, que apesar do aumento da aquisição desses nutrientes no tratamento com Cd, isso não foi suficiente para conter a remoção do metal por *E. cloacae* UENF P7.

Em relação aos micronutrientes, os níveis de Fe e Mo não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ou entre o tempo de cultivo (Tab. 5). Por outro lado, as células apresentaram uma maior demanda de Mn com 8 h de crescimento. Tal demanda foi ainda mais elevada nas células tratadas com Cd ($p < 0,001$) (Tab. 5). Possivelmente, o Mn deve estar agindo na proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo metal tóxico, uma vez que é conhecida a relação do Mn com a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase (Horsburgh et al., 2002).

Tab. 5 - Concentração média dos micronutrientes nas células de *E. cloacae* UENF P7 cultivadas em meio LB controle e com adição de Cd (22,5 mg L⁻¹). Concentrações expressas em mg L⁻¹. Os dados são médias \pm desvio padrão (n=3).

Nutrientes	Controle		22,5 mg L ⁻¹ Cd	
	2 h	8 h	2 h	8 h
Fe	8,3 \pm 0,44	8,1 \pm 0,55	9,2 \pm 0,07	9,4 \pm 1,12
Cu	0,8 \pm 0,06	1,2 \pm 0,32	1,2 \pm 0,00	2,2 \pm 0,27
Zn	3,3 \pm 0,25	5,6 \pm 0,24	2,8 \pm 0,09	3,1 \pm 0,11
Mn	0,5 \pm 0,05	4,0 \pm 0,04	0,4 \pm 0,05	5,3 \pm 0,07
Mo	0,107 \pm 0,005	0,070 \pm 0,007	0,101 \pm 0,00	0,087 \pm 0,010

No caso de Cu, as células exibiram um aumento gradativo na concentração do micronutriente com o tempo de cultivo, porém, este aumento foi significativamente maior nas células expostas a 22,5 mg L⁻¹ de Cd em relação ao controle (2 h: $p < 0,01$; 8 h: $p < 0,05$) (Tab. 5). O Zn, por outro lado, foi o único nutriente cuja demanda foi maior no controle que nas células tratadas com Cd ($p < 0,001$) (Tab. 5). O mesmo comportamento foi relatado para *Streptococcus pneumoniae* D39 em estresse com Cd, sendo verificado neste caso, que o metal tóxico desregulou a homeostase de Zn, reprimindo os

sistemas de captação do micronutriente (Begg et al., 2015). É possível que o mesmo esteja acontecendo com *E. cloacae* UENF P7.

O manejo de nutrientes é uma das estratégias empregadas por plantas (Gill e Tuteja, 2011), bactérias (Wu et al., 2021) e fungos (Gao et al., 2018) para superar a toxicidade ao Cd. Os nutrientes analisados são essenciais para atividade metabólica e síntese de enzimas necessárias para lidar com o estresse (Pal et al., 2021). Dessa forma, acredita-se que, no presente estudo, o metabolismo celular não foi afetado negativamente por Cd, uma vez que a bactéria parece ter ajustado a aquisição dos nutrientes para minimizar qualquer dano causado, de forma que não houve prejuízo no crescimento da bactéria. Provavelmente, o aumento na demanda dos macros e micronutrientes no tratamento com Cd está envolvido com o mecanismo de resistência adotado pela cepa *E. cloacae* UENF P7 para neutralizar o efeito negativo desse metal nas células, apresentando crescimento similar ao controle (sem adição de Cd). Desse modo, verifica-se que a disponibilidade dos nutrientes essenciais influencia diretamente no crescimento, mas também na resistência dos microrganismos a Cd.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que *E. cloacae* UENF P7, possui elevada resistência a metais, especialmente Cd. A bactéria apresentou crescimento equivalente ao controle em meio contendo 22,5 mg L⁻¹ do metal, com leve redução do pH. Não foram observadas mudanças morfológicas nas células expostas a Cd, mostrando ausência de dano estrutural. Somado a isso, a cepa apresentou capacidade de remover elevada quantidade de Cd com aumento na demanda por nutrientes essenciais, o que pode ser uma adaptação do metabolismo bacteriano para contornar o estresse causado por Cd, provavelmente, utilizando defesas antioxidantes.

Embora ainda haja muito para ser investigado sobre os mecanismos de resistência a Cd por *E. cloacae* UENF P7 (por exemplo, desafiar a bactéria com concentrações mais elevadas do metal, estudar os níveis de EROs nesta condição e analisar as proteínas envolvidas na resposta), já é possível enxergar uma aplicação biotecnológica. Por ser uma cepa altamente resistente a Cd, no futuro espera-se empregá-la para o tratamento de efluentes industriais contaminados com este metal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H.A., Khalil, H.P.S.A., 2018. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 243–262.
- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Ismail, N., Lalung, J., 2014. Isolation, identification, characterization, and evaluation of cadmium removal capacity of *Enterobacter* species. *J. Basic Microbiol.* 54, 1279–1287.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Onaindia, M., Garbisu, C., 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 3, 55–70.
- Ayele, H.S., Atlabachew, M., 2021. Review of characterization, factors, impacts, and solutions of Lake eutrophication: lesson for lake Tana, Ethiopia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 14233–14252.
- Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R., 2011. Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets «Vitória». *Brazilian J. Microbiol.* 42, 114–125.
- Banerjee, G., Pandey, S., Ray, A.K., Kumar, R., 2015. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 91.
- Begg, S.L., Eijkelkamp, B.A., Luo, Z., Couñago, R.M., Morey, J.R., Maher, M.J., Ong, C.Y., McEwan, A.G., Kobe, B., O'Mara, M.L., Paton, J.C., McDevitt, C.A., 2015. Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* 6, 1–11.
- Berbert-Molina, M.A., Prata, A.M.R., Pessanha, L.G., Silveira, M.M., 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1397–1404.
- Bojórquez, C., Frías Espericueta, M.G., Voltolina, D., 2016. Removal of cadmium and lead by adapted strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 32, 407–412.
- Britto, A.L., Formiga-Johnsson, R.M., Carneiro, P.R.F., 2016. Water supply and hydrosocial scarcity in the Rio de Janeiro Metropolitan Area. *Ambient. Soc.* 19, 183–206.
- Chen, Y., Chao, Y., Li, Y., Lin, Q., Bai, J., Tang, L., Wang, S., Ying, R., Qiu, R., 2016. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp. strain EG16 under cadmium stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1734–1744.
- Chukwuka, K.S., Akpabio, U.S., Uka, U.N., 2020. Bioaccumulation of Zinc and Cadmium by two aquatic plants: *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms and *Pistia stratiotes* L. under nursery conditions. *Trop. Plant Res.* 7, 229–237.
- Crans, D.C., Kostenkova, K., 2020. Open questions on the biological roles of first-row transition metals. *Commun. Chem.* 3, 104.
- Das, A., Belgaonkar, P., Raman, A.S., Banu, S., Osborne, J.W., 2017. Bioremoval of lead using *Pennisetum purpureum* augmented with *Enterobacter cloacae* -VITPASJ1: A pot culture approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 15444–15453.
- Das, D., Salgaonkar, B.B., Mani, K., Braganca, J.M., 2014. Cadmium resistance

- in extremely halophilic archaeon *Haloferax* strain BBK2. *Chemosphere* 112, 385–392.
- Dhanya, B.E., Athmika, Rekha, P.D., 2021. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp. YU16-RN5 and its potential to alleviate cadmium induced cytotoxicity *in vitro*. *3 Biotech* 11, 491.
- El-Meihy, R.M., Abou-Aly, H.E., Tewfike, T.A., El-Alkshar, E.A., Youssef, A.M., 2019. Characterization and identification of cadmium-tolerant bacteria isolated from contaminated regions in Egypt. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101299.
- Ergönül, M.B., Nassouhi, D., Atasağun, S., 2020. Modeling of the bioaccumulative efficiency of *Pistia stratiotes* exposed to Pb, Cd, and Pb + Cd mixtures in nutrient-poor media. *Int. J. Phytoremediation* 22, 201–209.
- Gao, T., Shi, L., Zhang, T., Ren, A., Jiang, A., Yu, H., Zhao, M., 2018. Cross talk between calcium and reactive oxygen species regulates hyphal branching and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* under copper stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 84.
- Ghosh, A., Ali, S., Mukherjee, S.K., Saha, S., Kaviraj, A., 2020. Bioremediation of copper and nickel from freshwater fish *Cyprinus carpio* using rhizoplane bacteria isolated from *Pistia stratiotes*. *Environ. Process.* 7, 443–461.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2011. Cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 215–222.
- Guo, Y., Gong, H., Guo, X., 2015. Rhizosphere bacterial community of *Typha angustifolia* L. and water quality in a river wetland supplied with reclaimed water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2883–2893.
- Heidari, P., Sanaeizade, S., Mazloomi, F., 2020. Removal of nickel, copper, lead and cadmium by new strains of *Sphingomonas melonis* e8 and *Enterobacter hormaechei* WW28. *Journal Appl. Biotechnol. Reports* 7, 208–214.
- Horsburgh, M.J., Wharton, S.J., Karavolos, M., Foster, S.J., 2002. Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol.* 10, 496–501.
- Huang, F., Guo, C.-L., Lu, G.-N., Yi, X.-Y., Zhu, L.-D., Dang, Z., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere* 109, 134–142.
- Jiang, Z., Jiang, L., Zhang, L., Su, M., Tian, D., Wang, T., Sun, Y., Nong, Y., Hu, S., Wang, S., Li, Z., 2019. Contrasting the Pb (II) and Cd (II) tolerance of *Enterobacter* sp. via its cellular stress responses. *Environ. Microbiol.* 22, 1507–1516.
- Joseph, P., 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 272–279.
- Kamaludeen, S.P.B., Ramasamy, K., 2008. Rhizoremediation of metals: Harnessing microbial communities. *Indian J. Microbiol.* 48, 80–88.
- Khalifa, A.Y.Z., Alsyeeh, A.-M., Almalki, M.A., Saleh, F.A., 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 79–86.
- Khan, M.A., Khan, S., Khan, A., Alam, M., 2017. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Sci. Total Environ.* 601–602, 1591–1605.

- Khanthom, S., Stewart, T.N., Prapagdee, B., 2021. Potential of a rhizobacterium on removal of heavy metals from aqueous solution and promoting plant root elongation under heavy metal toxic conditions. *Environ. Technol. Innov.* 22, 101419.
- Kumar, V., Parihar, R.D., Sharma, A., Bakshi, P., Singh Sidhu, G.P., Bali, A.S., Karaouzas, I., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., Gyasi-Agyei, Y., Rodrigo-Comino, J., 2019. Global evaluation of heavy metal content in surface water bodies: A meta-analysis using heavy metal pollution indices and multivariate statistical analyses. *Chemosphere* 236, 124364.
- Li, P., Zhao, C., Zhang, Y., Wang, X., Wang, X., Wang, J., Wang, F., Bi, Y., 2016. Calcium alleviates cadmium-induced inhibition on root growth by maintaining auxin homeostasis in *Arabidopsis seedlings*. *Protoplasma* 253, 185–200.
- Li, Y., Liu, K., Wang, Y., Zhou, Z., Chen, C., Ye, P., Yu, F., 2018. Improvement of cadmium phytoremediation by *Centella asiatica* L. after soil inoculation with cadmium-resistant *Enterobacter* sp. FM-1. *Chemosphere* 202, 280–288.
- Lin, X., Mou, R., Cao, Z., Xu, P., Wu, X., Zhu, Z., Chen, M., 2016. Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains. *Sci. Total Environ.* 569–570, 97–104.
- Lindsay, H., 1973. A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3, 5-dinitrosalicylic acid. *Potato Res.* 16, 176–179.
- Lu, W.-B., Shi, J.-J., Wang, C.-H., Chang, J.-S., 2006. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *J. Hazard. Mater.* 134, 80–86.
- Macedo-Raygoza, G.M., Valdez-Salas, B., Prado, F.M., Prieto, K.R., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Canto-Canché, B.B., Carrillo-Beltrán, M., Di Mascio, P., White, J.F., Beltrán-García, M.J., 2019. *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen. *Front. Microbiol.* 10.
- Matraszek, R., Hawrylak-Nowak, B., Chwil, S., Chwil, M., 2016. Macroelemental composition of cadmium stressed lettuce plants grown under conditions of intensive sulphur nutrition. *J. Environ. Manage.* 180, 24–34.
- Mazalan, N.Z.S., Oyeleye, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Aris, A.Z., Salleh, A.B., Normi, Y.M., 2020. Isolation and characterization of an acid and metal tolerant *Enterobacter cloacae* NZS strain from former mining lake in Selangor, Malaysia. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 9, 27.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R., 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 653–671.
- Meneguelli-Souza, A.C., Pestana, I.A., Azevedo, L.S., de Almeida, M.G., de Souza, C.M.M., 2021. Arsenic in the lower drainage basin of the Paraíba do Sul River (Southeast Brazil): dynamics between the water column and sediment. *Environ. Monit. Assess.* 193, 57.
- Mitra, S., Pramanik, K., Ghosh, P.K., Soren, T., Sarkar, A., Dey, R.S., Pandey, S., Maiti, T.K., 2018a. Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth

- promotion under Cd stress. *Microbiol. Res.* 210, 12–25.
- Mitra, S., Pramanik, K., Sarkar, A., Ghosh, P.K., Soren, T., Maiti, T.K., 2018b. Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 183–196.
- Muzammil, S., Siddique, M.H., Mureed, F., Andleeb, R., Jabeen, F., Waseem, M., Zafar, S., Rehman, H.F., Ali, T., Ashraf, A., 2021. Assessment of cadmium tolerance and biosorptive potential of *Bacillus Cereus* GCFSD01 isolated from cadmium contaminated soil. *Brazilian J. Biol.* 81, 398–405.
- Naik, M.M., Pandey, A., Dubey, S.K., 2012. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. *Biodegradation* 23, 775–783.
- Nwaehiri, U.L., Akwukwaegbu, P.I., Nwoke, B.E.B., 2020. Bacterial remediation of heavy metal polluted soil and effluent from paper mill industry. *Environ. Anal. Heal. Toxicol.* 35, e2020009.
- Ozturk, M., Metin, M., Altay, V., Filippis, L., Ünal, B.T., Khursheed, A., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Kawano, T., Caparrós, P.G., 2021. Molecular biology of cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Trace Elem. Res.* 199, 4832–4846.
- Pal, A., Bhattacharjee, S., Saha, J., Sarkar, M., Mandal, P., 2021. Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: a comprehensive overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 1–29.
- Panigrahi, S., Mohanty, S., Rath, C.C., 2020. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with Indole Acetic Acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. *South African J. Bot.* 134, 17–26.
- Pattnaik, S., Dash, D., Mohapatra, S., Pattnaik, M., Marandi, A.K., Das, S., Samantaray, D.P., 2020. Improvement of rice plant productivity by native Cr(VI) reducing and plant growth promoting soil bacteria *Enterobacter cloacae*. *Chemosphere* 240, 124895.
- Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., Soren, T., Maiti, T.K., 2017. Characterization of cadmium-resistant *Klebsiella pneumoniae* MCC 3091 promoted rice seedling growth by alleviating phytotoxicity of cadmium. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24419–24437.
- Rahman, A., Nahar, N., Nawani, N.N., Jass, J., Hossain, K., Saud, Z.A., Saha, A.K., Ghosh, S., Olsson, B., Mandal, A., 2015. Bioremediation of hexavalent chromium (VI) by a soil-borne bacterium, *Enterobacter cloacae* B2-DHA. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 50, 1136–1147.
- Rao, K.S., Mohapatra, M., Anand, S., Venkateswarlu, P., 2011. Review on cadmium removal from aqueous solutions. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2.
- Rodrigues, A.C.D., Amaral Sobrinho, N.M.B., Santos, F.S., Santos, A.M., Pereira, A.C.C., Lima, E.S.A., 2017. Biosorption of toxic metals by water lettuce (*Pistia stratiotes*) biomass. *Water, Air, Soil Pollut.* 228, 156.
- Sabullah, M.K., Rahman, M.F., Ahmad, S.A., Sulaiman, M.R., Shukor, M.S., Shamaan, N.A., Shukor, M.Y., 2017. Assessing resistance and bioremediation ability of *Enterobacter* sp. strain Saw-1 on molybdenum in various heavy metals and pesticides. *J. Math. Fundam. Sci.* 49, 193.
- Shi, Z., Zhang, Z., Yuan, M., Wang, S., Yang, M., Yao, Q., Ba, W., Zhao, J., Xie, B., 2020. Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2. *Chemosphere* 247, 125834.

- Silva, N.D., 2017. Genômica e Proteômica de *Enterobacter cloacae* UENF P7: uma bactéria resistente a estresse isolada de planta aquática. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Siqueira, S. de P.O., 2015. Otimização do cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL em sistema descontínuo visando a maximização da produção de biomassa. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Subrahmanyam, G., Sharma, R.K., Kumar, G.N., Archana, G., 2018. Vigna radiata var. GM4 plant growth enhancement and root colonization by a multi-metal-resistant plant growth-promoting bacterium *Enterobacter* sp. C1D in Cr (VI)-amended soils. *Pedosphere* 28, 144–156.
- Sun, R., Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y., 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China. *Environ. Pollut.* 263, 114612.
- Tonh a, M.S., Araújo, D.F., Araújo, R., Cunha, B.C., Machado, W., Portela, J.F., Souza, J.P.R., Carvalho, H.K., Dantas, E.L., Roing, H.L., Seyler, P., Garnier, J., 2021. Trace metal dynamics in an industrialized Brazilian river: A combined application of Zn isotopes, geochemical partitioning, and multivariate statistics. *J. Environ. Sci.* 101, 313-325.
- Tran, T.A., Popova, L.P., 2013. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk. J. Botany* 37, 1–13.
- Valitutto, R.S., Sella, S.M., Silva-Filho, E. V., Pereira, R.G., Miekeley, N., 2007. Accumulation of metals in macrophytes from water reservoirs of a power supply plant, Rio de Janeiro State, Brazil. *Water. Air. Soil Pollut.* 178, 89–102.
- Vélez, J.M.B., Martínez, J.G., Ospina, J.T., Agudelo, S.O., 2021. Bioremediation potential of *Pseudomonas* genus isolates from residual water, capable of tolerating lead through mechanisms of exopolysaccharide production and biosorption. *Biotechnol. Reports* 32, e00685.
- Wan, G., Najeeb, U., Jilani, G., Naeem, M.S., Zhou, W., 2011. Calcium invigorates the cadmium-stressed *Brassica napu* L. plants by strengthening their photosynthetic system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1478–1486.
- Wang, H., Cheng, Z., Yuan, H., Zhu, N., Lou, Z., Otieno, P., 2020. Occurrence of banned and commonly used pesticide residues in concentrated leachate: Implications for ecological risk assessment. *Sci. Total Environ.* 710, 136287.
- Wang, X., Zhang, X., Liu, X., Huang, Z., Niu, S., Xu, T., Zeng, J., Li, H., Wang, T., Gao, Y., Huang, M., Cao, L., Zhu, Y., 2019. Physiological, biochemical and proteomic insight into integrated strategies of an endophytic bacterium *Burkholderia cenocepacia* strain YG-3 response to cadmium stress. *Metallomics* 11, 1252–1264.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–175.
- Wu, Z., Zheng, R., Liu, G., Liu, R., Wu, S., Sun, C., 2021. Calcium protects bacteria against cadmium stress via reducing nitric oxide production and increasing iron acquisition. *Environ. Microbiol.* 23, 3541–3553.
- Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W., Lu, D., 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU. *Chemosphere*

- 173, 622–629.
- Yilmaz, E.I., Ensari, N.Y., 2005. Cadmium biosorption by *Bacillus circulans* strain EB1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 777–779.
- Zhang, Junhui, Li, Q., Zeng, Y., Zhang, Jian, Lu, G., Dang, Z., Guo, C., 2019. Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition and mechanism analysis at proteome level. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 176, 162–169.
- Zhang, L., Chen, Z., Zhu, C., 2012. Endogenous nitric oxide mediates alleviation of cadmium toxicity induced by calcium in rice seedlings. *J. Environ. Sci.* 24, 940–948.

5. CAPÍTULO 2

***Enterobacter cloacae* UENF P7 APRESENTA ELEVADA CAPACIDADE DE
CRESCIMENTO E REMOÇÃO DE CÁDMIO NA PRESENÇA DE ALTAS
CONCENTRAÇÕES DO METAL**

RESUMO

Nas últimas décadas, observou-se aumento da contaminação ambiental por Cd, aumentando também a pressão de seleção por organismos resistentes a esse metal. Cd é considerado um metal tóxico sem função biológica descrita. Conseqüentemente, apenas alguns organismos com vias metabólicas especializadas, conseguem resistir a tais condições estressantes. Neste contexto, a biorremediação mediada por bactérias resistentes a Cd é uma alternativa para recuperação de áreas contaminadas. *Enterobacter cloacae* UENF P7 foi isolada de uma planta aquática em região industrializada e tem se mostrado altamente resistente a Cd, sendo capaz de remover o metal do meio. No presente trabalho, foi avaliada a influência de concentrações elevadas de Cd sobre o crescimento da bactéria, sendo analisada a cinética de crescimento em meio líquido e a produção final de biomassa, a viabilidade celular, as características morfológicas e a sorção do metal. Para tanto, a bactéria foi cultivada em meio LB suplementado com CdCl₂ (70 e 140 mg L⁻¹ de Cd), em frascos Erlenmeyer, a 30 °C e 165 rpm. Como resultado, em meio com 70 mg L⁻¹ de Cd, a densidade óptica final (DO_{600nm}=14,3) foi 3,5 vezes maior que a do meio controle após 10 h de cultivo, indicando incremento na produção de células. Esse resultado foi confirmado por contagem de unidade formadora de colônias (UFC) em placas de Petri e por imagens de microscopia. Com 140 mg L⁻¹ de Cd, verificou-se fase lag mais extensa (2 h) e menores velocidades de crescimento, com DO final (DO_{600nm}=11,6) menor que a obtida no meio com 70 mg L⁻¹ de Cd (p<0,0001). Em todas as condições analisadas, as células estavam viáveis ao final do cultivo (kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Assays), e embora tenha havido queda no pH do meio (3,8-4,7) durante o cultivo, nos meios com Cd o pH voltou a subir (6,9-7,3) quando o cultivo atingiu fase estacionária. Nas imagens de microscopia eletrônica, observou-se que em meio com Cd, as células apresentaram grânulos eletrodensos, que foram ausentes no meio controle. Análise por ICP-MS mostrou que a cepa foi capaz de remover Cd nas duas concentrações testadas, alcançando máxima remoção na fase estacionária. No meio com 70 mg L⁻¹ Cd, a biomassa bacteriana removeu até 57,7 mg L⁻¹ e com 140 mg L⁻¹ Cd foi capaz de remover até 136,2 mg L⁻¹ do metal. No que é do nosso conhecimento, esse trabalho é o primeiro que sugere haver uma maior produção de células por uma espécie bacteriana na presença dessas concentrações de Cd, as quais estão muito acima dos limites permitidos pelas legislações ambientais de diferentes países. Portanto, *E. cloacae* UENF P7 demonstrou elevada resistência e remoção de Cd, com elevada produção de célula em algumas horas, o que qualifica a cepa como forte candidata para emprego na remediação de efluentes industriais contaminados pelo metal.

Palavra-chave: Metal tóxico; Resistência; Bactéria; Biossorção; Remediação

1. INTRODUÇÃO

A poluição decorrente do aumento da população no planeta, da industrialização em grande escala e do uso intensivo do solo, tem conduzido a uma rápida degradação da qualidade ambiental (Fernández et al., 2018). Essa contaminação atinge solo, águas subterrâneas, águas superficiais, sedimentos e até mesmo o ar com metais, incluindo o cádmio (Cd), um elemento altamente tóxico (Das et al., 2014; Fernández et al., 2018; Mitra et al., 2018b; Shi et al., 2020).

As principais fontes de contaminação por Cd são o uso de fertilizantes fosfatados e pesticidas, a queima de combustíveis fósseis, atividades de metalurgia e de mineração e resíduos industriais (Das et al., 2014; Khan et al., 2017; Wiangkham e Prapagdee, 2018). No período de 2015 a 2019 foi estimada a produção mundial de Cd entre 25.000 e 28.300 toneladas por ano (Khan et al., 2017; Brown et al., 2021)

O excesso de Cd no ambiente constitui um problema, pois mesmo em baixas concentrações (0,001 - 0,1 mg L⁻¹) este metal é tóxico para os seres vivos (Alkorta et al., 2004; Khan et al., 2017). Altamente solúvel em água, pode bioacumular e biomagnificar na cadeia trófica, causando alterações morfológicas, físico-químicas e induzindo o estresse oxidativo nas células, prejudicando as estruturas de organelas e a funcionalidade da membrana plasmática (Fatima et al., 2019). Dessa forma, é um dos metais mais nocivos para os organismos (Li et al., 2018; Shi et al., 2020).

Bactérias presentes em ambientes contaminados com metais desenvolveram estratégias para sobrevivência e combate ao estresse, podendo remover e acumular metais através de processos físico-químicos e sistemas de transporte de diferentes especificidades (Abbas et al., 2017). Os mecanismos de desintoxicação em bactérias incluem a produção de agentes quelantes (Lian et al., 2022), bombas de efluxo que capturam e expulsam cátions divalentes indesejáveis através da membrana celular (Schindler et al., 2015) e precipitação dos metais no citoplasma das células (Shi et al., 2020). Essas propriedades tornam tais microrganismos uma ferramenta importante em estratégias de biorremediação (Valls e de Lorenzo, 2002; Xu et al., 2017). *Enterobacter cloacae* UENF P7 foi isolada da planta aquática *Pistia stratiotes*

proveniente do Rio Paraíba do Sul (RJ, Brasil), em local impactado por elevadas concentrações de metais (Britto et al., 2016; Silva, 2017; de Souza et al., 2021). Em estudos prévios, essa cepa demonstrou resistência a metais, especialmente Cd e apresentou capacidade de remoção do metal quando cultivada em meio suplementado com 22,5 mg L⁻¹ de Cd (Capítulo 1).

No presente trabalho foi analisada a resistência de *E. cloacae* UENF P7 em concentrações de Cd ainda mais elevadas que 22,5 mg L⁻¹, com foco no impacto do metal sobre o crescimento da bactéria, viabilidade, morfologia e ultraestrutura das células. Os resultados mostraram que *E. cloacae* UENF P7 demonstrou alta resistência e remoção de Cd, com elevada produção de célula em poucas horas, o que qualifica a cepa como forte candidata para emprego na remediação de efluentes industriais contaminados pelo metal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cepa bacteriana e preparo de inóculos

Enterobacter cloacae UENF P7 foi isolada da raiz da planta aquática *Pistia stratiotes*, coletada no Rio Paraíba do Sul, em Resende-RJ, Brasil. O número de acesso à cepa no GenBank é NQLK 00000000.1 (Silva, 2017).

Culturas da bactéria foram estocadas em solução de glicerol 40% a -80 °C e ativadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido. Foi utilizado para inóculo meio LB modificado (g L⁻¹): glicose, 10; triptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5 com pH 6,0) (Xu et al., 2017). Para meio sólido, adicionou-se 15 g L⁻¹ de agar. O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com chicanas, contendo 50 mL de meio e inoculados com alçadas de cultura fresca ativadas em meio sólido. Os frascos foram incubados a 30 °C e 165 rpm, em agitador orbital (SOLAB SL-222) até o cultivo alcançar *midlog*.

2.2. Solução do metal

A solução estoque (1 mol L⁻¹) de CdCl₂.H₂O (CINÉTICA) foi preparada em água ultrapura (Sistema Milli-Q). A mesma foi esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm. Alíquotas da solução foram adicionadas ao meio de cultivo em volume adequado para obter as concentrações desejadas de Cd.

2.3. Cultivo bacteriano em meio líquido suplementado com Cd

A cinética de crescimento bacteriano em meio LB modificado contendo Cd (70 e 140 mg L⁻¹) foi avaliada empregando-se frascos Erlenmeyer de 500 mL, com chicanas, 100 mL de meio e 5% v/v de inóculo. Meio LB sem adição de Cd foi empregado como controle. Os frascos foram incubados em agitador orbital (SOLAB SL-222) a 30°C e 165 rpm.

O crescimento celular foi monitorado por turbidimetria em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800) a 600 nm (DO₆₀₀), de amostras retiradas em intervalos regulares até o cultivo atingir a fase estacionária. Posteriormente, os valores de DO₆₀₀ foram convertidos em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume), utilizando uma curva de calibração, conforme descrito por Siqueira (2015). Para a construção da curva foi utilizada uma suspensão de células de *E. cloacae* UENF P7 cultivada

em meio LB nas condições citadas, retiradas na fase *midlog*. A variação do pH do meio foi acompanhada durante o cultivo. No tempo final de cultivo, foi realizada contagem de unidade formadora de colônias (UFC) em placas de Petri, utilizando-se meio LB adicionado de ágar (15 g L^{-1}).

Os valores de concentração celular (X) foram utilizados para o cálculo de parâmetros de fermentação. A produtividade em células (Q_x) foi calculada pela equação $Q_x = (X_m - X_0)/t_{x_m}$, em que X_m é a máxima concentração celular, X_0 a concentração celular inicial e t_{x_m} o tempo necessário para obtenção de X_m . O rendimento em células a partir de glicose ($Y_{x/s}$) foi calculado utilizando-se a equação $Y_{x/s} = (X_m - X_0)/(\Delta S)$, em que ΔS é a diferença entre a concentração inicial de glicose e a concentração em t_{x_m} . As máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram determinadas por regressão linear do trecho linear da curva, que correlaciona o logaritmo natural da concentração celular com o tempo, correspondendo à fase exponencial de crescimento. O coeficiente angular da equação de reta representa o próprio valor de $\mu_{\text{máx}}$ (Berbert-Molina et al., 2008).

2.4. Quantificação de glicose

A determinação de glicose no meio foi dada ao longo do cultivo, de acordo com o método descrito por Lindsay (1973). Brevemente, 500 μL da cultura foi centrifugada (EPPENDORF 5804 R) a $16.873 \times g$ por 5 min. Em um tubo de ensaio, adicionou-se 250 μL do sobrenadante e 250 μL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS - ÊXODO CIENTÍFICA), mantendo-se a mistura em banho-maria a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Após resfriamento, foram adicionados 2 mL de água ultrapura, seguindo-se a leitura da absorbância a 540 nm (SHIMADZU UV-1800). Solução de glicose P.A (VETEC) foi utilizada como padrão.

2.5. Análise de viabilidade celular

A viabilidade das células no tempo final do cultivo foi avaliada com emprego do kit LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Assays (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo, 100 μL da suspensão bacteriana foi corada com 0,5 μL de cada marcador fluorescente (fluorocromo SYTO 9 e iodeto de propídio) e a mistura foi incubada no escuro

por 15 min. Feito isso, a amostra foi observada em microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axioplan).

2.6. Determinação de Cd

A capacidade de remoção do Cd por *E. cloacae* UENF P7 foi quantificada durante o cultivo em meio LB suplementado com 70 e 140 mg L⁻¹ de Cd. Resumidamente, 15 mL do meio fermentado foram centrifugados (EPPENDORF 5804 R) a 3.438 x g por 20 min. e lavado duas vezes. O pellet e o sobrenadante (100 mg de cada tratamento) foram digeridos com 1,0 mL de ácido nítrico bidestilado (HNO₃, 67% v/v) e aquecido a 100 °C nos tubos tampados por 4 h. Após o resfriamento, as amostras foram diluídas com água ultrapura (Sistema Milli-Q) e analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), empregando-se um espectrômetro Nexlon 300x (PerkinElmer, EUA). A taxa de remoção de Cd, expressa em porcentagem, foi calculada usando a equação: Taxa de remoção = $[(C_0 - C)/C_0] \times 100$, em que C₀ é a concentração inicial de Cd (mg L⁻¹) e C a concentração residual de Cd (mg L⁻¹) (Pramanik et al., 2017).

2.7. Análise da morfologia celular

Para observação da morfologia celular de *E. cloacae* UENF P7 em resposta ao Cd, foi realizada análise de microscopia de amostras retiradas ao longo do cultivo. Foram feitas lâminas a fresco, sem diluição, para observação em microscópio óptico com contraste de fase (Zeiss Axioplan).

A preparação do material para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizou um volume de 2 mL de meio fermentado, que foi centrifugado (EPPENDORF 5804 R) a 16.873 x g por 5 min. O processamento das amostras seguiu o protocolo de Baldotto, Olivares e Bressan-Smith (2011). Brevemente, o pellet foi fixado com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,1. Após a fixação, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio por 20 min.

Posteriormente, as amostras para MEV foram desidratadas em séries crescentes de álcool (15, 30, 50, 70 e 100%) por 30 min., seguido de ponto

crítico em CO₂ (CPD030 BAL-TEC). As amostras foram fixadas em suportes porta amostra de alumínio e metalizadas (SCD050 BAL-TEC) com uma liga de ouro-paládio. O material foi visualizado no microscópio EVO 40 (Zeiss).

Para MET, o material foi desidratado em séries crescentes de acetona (15, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 30 min., seguidas de inclusão em resina Epoxi® na proporção 3:1 a cada 24 h e colocadas em estufa a 60 °C para polimerização. A partir dos blocos obtidos, foram feitos cortes ultrafinos (70 nm) em equipamento ultramicrotomo do tipo *Reichert Ultracuts Leica*, distribuídos em grades de cobre de 400 mesh e contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 5%. O material foi visualizado no microscópio JEOL 1400 PLUS.

2.8. Análises estatísticas

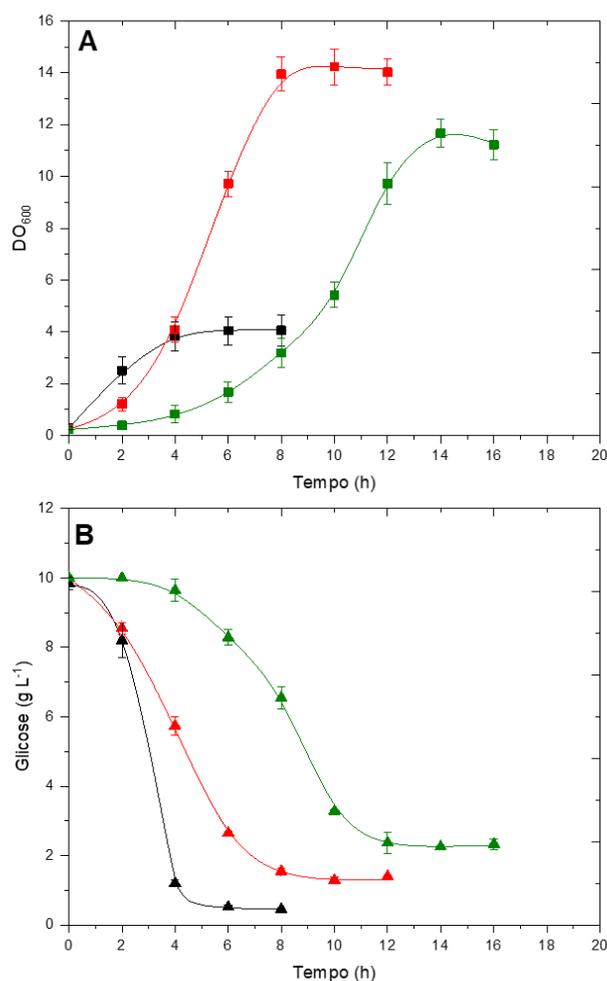
Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de réplica biológica (n=3) e analítica (n=3). As análises estatísticas foram realizadas usando Graphpad Prism 9.0 para avaliar as diferenças significativas entre cada tratamento por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a um nível de significância ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do Cd sobre o crescimento de *E. cloacae* UENF P7

Os perfis cinéticos de crescimento de *E. cloacae* UENF P7 apresentaram diferenças expressivas nas condições de cultivo avaliadas (Fig. 1A). Em meio sem adição de Cd (controle) observaram-se altas velocidades de crescimento nas primeiras 2 h, com consumo de 20% da glicose inicial (Fig. 1B). A partir de então, houve forte incremento da velocidade de consumo do açúcar e aumento simultâneo da DO até 4 h, quando a velocidade de crescimento diminuiu e o cultivo entrou na transição para a fase estacionária. A máxima DO ($DO_{600}=4$) foi alcançada com 6 h, mesmo havendo um pequeno residual da fonte de carbono ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) no meio.

Fig. 1 - Cinética de crescimento (A) e de consumo de glicose (B), em função do tempo (h), no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 em meio LB controle (preto) ou suplementado com 70 (vermelho) e 140 mg L^{-1} de Cd (verde). Os dados são médias \pm desvios padrão (n=3).



Nos meios suplementados com Cd, além de perfis de crescimento distintos do observado no controle, os valores de DO final foram muito superiores ($p < 0,0001$) (Fig. 1A). E como não foram observadas modificações morfológicas (dados apresentados posteriormente nas Fig. 2 e 3) que pudessem interferir na medida do crescimento por espectrofotometria, pode-se concluir que o aumento da DO correspondeu ao aumento das concentrações de células nestes meios (Fig. 1A). Assim, foi possível converter os valores de DO para concentração celular e realizar o cálculo de parâmetros essenciais à compreensão do desenvolvimento cinético da bactéria (Tab. 1), viabilizando também uma análise comparativa mais adequada dos resultados.

Tab. 1 - Parâmetros de crescimento de *E. cloacae* UENF P7 em meios com diferentes concentrações de Cd. Os dados são médias \pm desvios padrão ($n=3$).

Parâmetro	Tratamentos		
	Controle	70 mg L ⁻¹ de Cd	140 mg L ⁻¹ de Cd
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) ^a	-*	0,64	0,30
t_{xm} (h) ^b	6	10	14
X_m (g L ⁻¹) ^c	1,31 \pm 0,09	4,70 \pm 0,13	3,81 \pm 0,12
Q_x (g L.h ⁻¹) ^d	0,22 \pm 0,01	0,47 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01
$Y_{\text{X/S}}$ (g/g) ^e	0,14	0,54	0,46
ΔS (g L ⁻¹) ^f	9,5	8,7	8,3

^aMáxima velocidade específica de crescimento; ^bTempo para atingir a máxima concentração celular; ^cMáxima concentração celular; ^dProdutividade volumétrica em células, calculada em t_{xm} . ^eRendimento em biomassa com base na glicose, calculado em t_{xm} ; ^fConsumo de glicose até t_{xm} ; *não apresenta fase exponencial de crescimento.

No meio com 70 mg L⁻¹ de Cd, não ficou evidente a ocorrência de fase *lag*, mas de acordo com a inclinação da curva, as velocidades de crescimento foram menores do que as observadas no controle nas primeiras 2 h de cultivo, indicando um efeito do metal no metabolismo da bactéria (Fig. 1A). Por outro lado, ficou demonstrada uma fase exponencial de crescimento, com valor de $\mu_{\text{máx}}$ (máxima velocidade específica de crescimento) de 0,64 h⁻¹ (Tab. 1), seguida por um período mais longo (4 a 8h) com velocidades de crescimento

elevadas e constantes (Fig. 1A). Isso coincidiu com intenso metabolismo da glicose, embora em menor velocidade comparado ao controle (Fig. 1B). A entrada na fase estacionária também acompanhou a redução do consumo da glicose, que não foi totalmente esgotada em nenhum dos tratamentos (Fig. 1A e 1B). Neste contexto, a concentração celular no meio contendo 70 mg L⁻¹ de Cd alcançou 4,70 g L⁻¹ (DO₆₀₀=14,3) em 10 h, valor 3,6 vezes maior ($p < 0,0001$) que no meio sem adição do metal ($X_m = 1,31$ g L⁻¹ e DO₆₀₀=4) (Tab. 1 e Fig. 1A). Além disso, a produtividade volumétrica em células (Q_x) e o rendimento em células a partir de glicose ($Y_{x/s}$) foram também muito superiores aos obtidos no meio controle (2,1 e 3,8 vezes, respectivamente) ($p < 0,0001$), o que reforça o desempenho superior da bactéria no cultivo em meio suplementado com Cd.

O emprego de concentração de Cd duas vezes maior (140 mg L⁻¹) influenciou a cinética de crescimento bacteriano já nas primeiras horas de cultivo, ficando evidente a necessidade de adaptação das células (Fig. 1A). Após a fase lag (~ 2 h), as velocidades de crescimento aumentaram lentamente e foram inferiores às do meio com 70 mg L⁻¹ de Cd no mesmo período. Apesar de ter sido evidenciada a fase exponencial, houve diminuição expressiva do valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ (0,3 h⁻¹) (Tab.1), caracterizando inibição do cultivo pelo metal. As velocidades de crescimento e a duração da fase *log* também foram inferiores comparado ao meio com menor teor de Cd, havendo ampliação do tempo para entrada na fase estacionária (Fig. 1A).

Ao analisar a cinética de consumo de glicose no meio com 140 mg L⁻¹ de Cd, foi verificado que o açúcar só passou a ser metabolizado a partir de 4 h de cultivo, e em menor velocidade, compatível com a cinética de crescimento da bactéria observada nesta condição. Houve também maior residual de glicose no tempo final (1,7 g L⁻¹). No entanto, mesmo com esses efeitos causados pelo Cd sobre o desenvolvimento microbiano, a máxima concentração celular ($X_m = 3,8$ g L⁻¹) também foi muito superior (2,9 vezes) à do meio controle ($p < 0,0001$), e apenas 23,7% menor que a do meio com 70 mg L⁻¹ de Cd ($p < 0,0001$) (Tab. 1), acompanhando o resultado da DO que alcançou valores iguais a 11,6 (Fig. 1A).

Apesar do total de glicose consumida (ΔS) ter sido similar nos dois meios com Cd, a menor produção de biomassa na presença de 140 mg L⁻¹ de Cd

resultou em valor de $Y_{x/s}$ ligeiramente menor (17%). Por outro lado, como o tempo para obtenção da máxima concentração celular foi maior ($t_{x_m}=14$ h), a produtividade em células foi mais impactada, sendo calculado um valor 74% menor ($Q_x=0,27$ g L⁻¹ h⁻¹) ($p<0,0001$) (Tab. 1). Estes parâmetros, em conjunto, evidenciam que *E. cloacae* UENF P7 foi capaz de contornar os efeitos tóxicos de Cd e aumentar a produção de células nas condições de estresse, superando as concentrações celulares obtidas no controle e mostrando-se altamente resistente ao metal.

Segundo Fan et al. (2021), metais em baixa concentração podem induzir respostas horméticas em populações de bactérias, ou seja, respostas bifásicas que estimulam o crescimento das células em baixa dose e inibem em alta dose do agente estressante. Em seus estudos, as concentrações indutoras de estímulo compreenderam a faixa de 2 a 4 mg L⁻¹ de Cd, que são muito inferiores às concentrações utilizadas neste trabalho. Assim, parece pouco provável que esteja sendo observado um efeito hormético na resposta da cepa *E. cloacae* UENF P7 aos tratamentos com Cd que superaram as concentrações celulares do controle sem adição de Cd.

Neste sentido, as condições operacionais e a composição do meio de cultivo adotadas no presente trabalho buscaram favorecer o crescimento bacteriano e, assim, explicitar os efeitos de Cd nas células. Considerando que *E. cloacae* é uma bactéria anaeróbia facultativa, procurou-se garantir melhores condições de suprimento de oxigênio, utilizando Erlenmeyers com chicanas, de modo a evitar a limitação do metabolismo respiratório de produção de energia para o crescimento. Do mesmo modo, o meio utilizado continha alta concentração de nitrogênio, especialmente extrato de levedura, que favorece a produção de células (Mignone e Avignone-Rossa, 1996). Além disso, o meio foi suplementado com glicose, que é uma fonte de carbono e energia prontamente assimilável adicional.

Outros autores utilizaram processo fermentativo em batelada e meio LB para avaliar o efeito de Cd sobre o crescimento de espécies bacterianas (Arivalagan et al., 2014). Porém, não foram encontrados relatos com condições similares às utilizadas no presente estudo, sobretudo em relação à

transferência de oxigênio para o cultivo e a adição de glicose no meio. Apesar destas diferenças, é possível destacar alguns aspectos comuns.

Quanto ao comportamento da cinética de crescimento e da produção total de biomassa, da mesma forma que no presente trabalho, foi verificada a necessidade de adaptação das cepas em meios contendo Cd para *Enterobacter* sp. EG16 (Chen et al., 2016), *Enterobacter* sp. WS12 e *Enterobacter mori* (Abbas et al., 2014) e para a bactéria Gram positiva *Bacillus cereus* RC-1 (Huang et al., 2014; Liu et al., 2018), ainda que com duração da fase *lag* muito superior à observada neste estudo.

No trabalho de Chen et al. (2016), verificaram-se fases *lag* de 6 e 8 h em meios com 50 e 100 mg L⁻¹ de Cd (o sal utilizado foi Cd(NO₃)₂), respectivamente, sendo ainda mais longa (10 e 12 h) nos meios com concentrações maiores do metal (200 e 250 mg L⁻¹, respectivamente). Huang et al. (2014) descreveram que a ocorrência e duração da fase *lag* no cultivo de *B. cereus* foram dependentes da concentração de Cd no meio. Com 20 mg L⁻¹ do metal (sal não relatado), houve crescimento rápido desde o início, enquanto o emprego de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de Cd resultou em fases *lag* progressivamente mais longas (4, 6 e 10 h, respectivamente).

A influência do aumento da concentração de Cd no meio de cultivo sobre as velocidades de crescimento e a formação de células também foram destacados em alguns trabalhos. *Enterobacter* sp. EG16 cultivada em caldo nutriente com 5, 10 e 50 mg L⁻¹ de Cd (o sal utilizado foi Cd(NO₃)₂) teve as velocidades de crescimento similares às do controle na maior parte do tempo. Porém, a entrada na fase estacionária ocorreu mais rapidamente no tratamento com 50 mg L⁻¹ de Cd, no qual a DO final também foi menor que a do controle. Chen et al. (2016) verificaram que concentrações de Cd (o sal utilizado foi Cd(NO₃)₂) iguais ou superiores a 100 mg L⁻¹ (150, 200 e 250 mg L⁻¹) implicaram em inibição significativa do crescimento, com redução das velocidades na *midlog*, antecipação da fase estacionária e valores decrescentes de DO final (DO₆₀₀=0,8, 0,7 e 0,6, respectivamente).

No cultivo de outra cepa de *Enterobacter* sp., também foi observada redução da DO final, de 4,75 para 3,7, de acordo com o aumento da concentração de Cd no meio (Mitra et al., 2018b). Em ensaios com

Enterobacter sp. DNB-S2, descrita como altamente resistente a Cd (o sal utilizado foi CdSO_4), a velocidade de crescimento também diminuiu com o aumento da concentração inicial de Cd, verificando-se $\text{DO}_{600}=2,0$ no controle e $\text{DO}_{600}=1,2$ e $0,6$, respectivamente, nos tratamentos com 250 e 500 mg L^{-1} do metal (Sun et al., 2020). Por outro lado, *B. cereus* apresentou velocidades de crescimento similares na fase *log* nos meios controle e com 50 e 100 mg L^{-1} de Cd(II), e apenas ligeiramente menores em 150 mg L^{-1} de Cd(II) (Huang et al., 2014).

No presente trabalho, além das concentrações celulares muito superiores, também foi marcante a diferença observada no tempo de cultivo para obtenção dos valores máximos de DO. Nos trabalhos de Huang et al. (2014) e Chen et al. (2016) essa condição só foi alcançada ao final de 30 h, enquanto Mitra et al. (2018), Li et al. (2018b) e Sun et al. (2020) relataram tempos de cultivo de 72 h.

Destaca-se que dentre os trabalhos relacionados encontrados na literatura, apenas em um deles (Li et al., 2018) foi identificado o emprego da mesma metodologia para a quantificação da biomassa adotada no nosso trabalho. No entanto, foram relatados valores máximos de X_m incomparavelmente menores em todas as condições testadas ($0,004 \text{ g L}^{-1}$ no meio controle; $0,002 \text{ g L}^{-1}$ e $0,001 \text{ g L}^{-1}$ nos meios com 50 mg L^{-1} ou 100 mg L^{-1} de Cd, respectivamente) (o sal utilizado foi $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$).

Todos estes dados evidenciam a diferença considerável entre os valores finais de DO alcançados no presente trabalho para os obtidos no cultivo de outras bactérias. Isso pode ser atribuído às características intrínsecas da cepa *E. cloacae* UENF P7 frente à toxicidade do Cd, mas também a otimização das condições de processo para garantir um ambiente favorável ao desenvolvimento bacteriano.

3.2. Efeito do Cd sobre o pH no cultivo de *E. cloacae* UENF P7

O acompanhamento da variação do pH do meio de cultivo ao longo do processo de fermentação pode ajudar a entender o comportamento da bactéria na presença de Cd em altas concentrações e seus mecanismos de resistência. Como resultado dessa análise, observou-se que em todas as

condições testadas, o metabolismo de glicose foi, aparentemente, direcionado para a formação de um ou mais ácidos orgânicos (Tab. 2).

Tab. 2 - Valores de pH durante o cultivo de *E. cloacae* UENF P7 com Cd em diferentes fases de crescimento. Os dados são médias \pm desvios padrão (n=3).

Tratamentos	pH – Fases de crescimento		
	Inicial	Log	Estacionária
Controle	6,0 \pm 0,06	4,7 \pm 0,10	3,8 \pm 0,18
70 mg L ⁻¹ de Cd	6,0 \pm 0,02	3,9 \pm 0,09	6,9 \pm 0,03
140 mg L ⁻¹ de Cd	6,0 \pm 0,03	4,7 \pm 0,04	7,3 \pm 0,05

Na condição controle, o pH inicial (6,0) reduziu para 4,7 durante o período de intenso consumo de glicose e elevadas velocidades de crescimento, chegando ao valor de 3,8 na fase estacionária (Tab. 2). Nos meios com adição de Cd, a queda do pH foi mais acentuada na fase *log*, alcançando o valor de 3,9 em 6 h com 70 mg L⁻¹ do metal (Tab. 2). Porém, o total consumido de glicose (73%) foi maior comparado ao meio com 140 mg L⁻¹ de Cd (68%), em momento equivalente da curva de crescimento (10 h) (Fig. 1).

Diferente do que foi observado no controle, em ambos os tratamentos com Cd, o pH voltou a subir e atingiu valores próximos a neutro na fase estacionária. Sugere-se que nestas condições de estresse, os ácidos orgânicos produzidos durante o metabolismo de glicose tenham sido utilizados como fonte de energia para produzir células, uma vez que ainda havia glicose em solução (Fig. 1). A utilização de ácidos orgânicos como fonte de carbono foi observada anteriormente em *Escherichia coli* (Rahman et al., 2008) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Siqueira, 2015).

No cultivo de *Enterobacter* sp. DNB-S2 em meio LB sem glicose e suplementado com Cd (o sal utilizado foi CdSO₄), Sun et al. (2020) verificaram diminuição do pH nas primeiras 6 h, com maior redução no meio com 500 mg L⁻¹ de Cd, no qual o pH foi de 7 para 5,7. A partir de 6 h, o pH voltou a subir até a bactéria entrar na fase estacionária, chegando a 10 no meio

controle; 7,4 nos meios com 100 e 250 mg L⁻¹ de Cd e 6,5 no meio com 500 mg L⁻¹ do metal.

Li et al. (2018b) observaram durante o cultivo de *Bacillus cereus* Cd01, diminuição dos valores de pH nas primeiras horas (7 para 6,1) e o tempo necessário para o aumento do pH foi proporcional à concentração de Cd no meio (4, 8, 12 e 24 h, respectivamente, para 0, 20, 50 e 110 mg L⁻¹ de Cd - o sal utilizado foi 3CdSO₄.8H₂O). Então o pH voltou a subir para valores finais muito próximos (pH 7,3-7,4) em todos os tratamentos.

As concentrações de Cd testadas neste trabalho são consideradas altamente tóxicas para bactérias. Somado a isso, o metal também não constitui um micronutriente para microrganismos, diferente do que acontece com cobre, zinco e ferro, por exemplo (Singh et al., 2018; Li et al., 2018b). Logo, o maior crescimento celular de *E. cloacae* UENF P7, nos cultivos em meios com elevadas concentrações de Cd (Fig. 1A e Tab. 1), indica que a bactéria foi capaz de ativar mecanismos de proteção contra o agente estressor e utilizar uma ou mais rotas metabólicas alternativas de obtenção de energia para o crescimento na presença do metal. Para melhor compreensão dessas rotas, são necessários estudos futuros mais aprofundados da cepa UENF P7, envolvendo, por exemplo, a expressão de proteínas no cultivo em meio contendo altos teores de Cd no meio.

3.3. Capacidade de remoção de Cd por *E. cloacae* UENF P7

A capacidade de *E. cloacae* UENF P7 em remover Cd foi avaliada através da taxa de remoção de Cd pela análise da concentração residual do meio e pela determinação desse metal nas células durante o cultivo. No meio contendo 70 mg L⁻¹ de Cd, a biomassa bacteriana removeu 39,9 (± 2,12) mg L⁻¹ de Cd até a *midlog* (6 h), o que corresponde uma taxa de remoção de 78,1%. Em 12 h, quando o cultivo estava na fase estacionária, a remoção de Cd foi significativamente maior, tendo removido 57,7 mg L⁻¹ (±1,12) de Cd (p<0,001) com 83,6% de taxa de remoção (p<0,01). No meio contendo 140 mg L⁻¹ de Cd, a biomassa removeu 73,9 mg L⁻¹ (±2,67) do metal até a *midlog* (10 h), apresentando taxa de remoção igual a 92,6%. Na fase estacionária houve

aumento significativo na remoção do Cd, sendo determinado $136,2 \text{ mg L}^{-1}$ ($\pm 3,19$) ($p < 0,001$) do metal nas células e taxa de remoção de 94,8% ($p < 0,05$).

A remoção de Cd por espécies bacterianas é influenciada, dentre outros fatores, pelo pH do meio (Zhou et al., 2009; Limcharoensuk et al. 2015; Li et al., 2018; Heidari e Sanaeizade, 2020) e pela fase de crescimento microbiano (Yilmaz e Ensari, 2005; Huang et al., 2014; Arivalagan et al., 2014; Mitra et al., 2018a, 2018b). O pH tem forte influência sobre a solubilidade de metais e, conseqüentemente, sobre sua adsorção na célula bacteriana (Arivalagan et al., 2014; Heidari e Sanaeizade, 2020), afetando a rede de cargas negativas e o grau de dissociação dos grupos funcionais na parede celular (Özdemir et al., 2013). A adsorção de Cd^{2+} depende de sítios de ligação carregados negativamente na superfície da célula, bem como da extensão da protonação de grupos funcionais (Arivalagan et al., 2014).

Em pH inferiores a 4, há alta concentração de H^+ e os prótons ocupam a maioria dos sítios de ligação na superfície celular, reduzindo a intensidade de cargas negativas. Em pH na faixa de 5 a 6, a biossorção aumenta, uma vez que mais cargas negativas estarão disponíveis para ligar Cd^{2+} (Arivalagan et al., 2014). Portanto, no meio com 70 mg L^{-1} de Cd, o baixo valor do pH (3,9) pode ter influenciado a adsorção de Cd na fase *log*. No tratamento com 140 mg L^{-1} de Cd, em comparação, o valor mais alto de pH (4,7) pode ter favorecido a ligação de Cd à superfície celular. Na fase estacionária, houve maior remoção de Cd em ambos os meios, o que também deve ter sido influenciado pelo pH, que estava próximo de neutro nos dois casos (Tab. 2).

Boyanov et al. (2003) verificaram que a remoção de Cd por *Bacillus subtilis* aumentou com o aumento do pH do meio de cultivo entre 4,4 e 6,3. O mesmo comportamento foi observado para *Bacillus* sp. GZ22 em meio com 10 mg L^{-1} Cd (o sal utilizado foi $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2$), no qual o aumento do pH de 4 para 5 levou à maior biossorção do metal (4 mg L^{-1}) (Zhao et al., 2017). Sun et al. (2020) verificaram a remoção de $73,6 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd^{2+} por *Enterobacter* sp. DNB-S2 cultivada em meio com 250 mg L^{-1} de Cd (o sal utilizado foi CdSO_4) e pH 7,4 na fase estacionária.

A elevada capacidade de remoção de Cd por *E. cloacae* UENF P7, indica sua aptidão como candidata ao emprego em processos de biorremediação. No

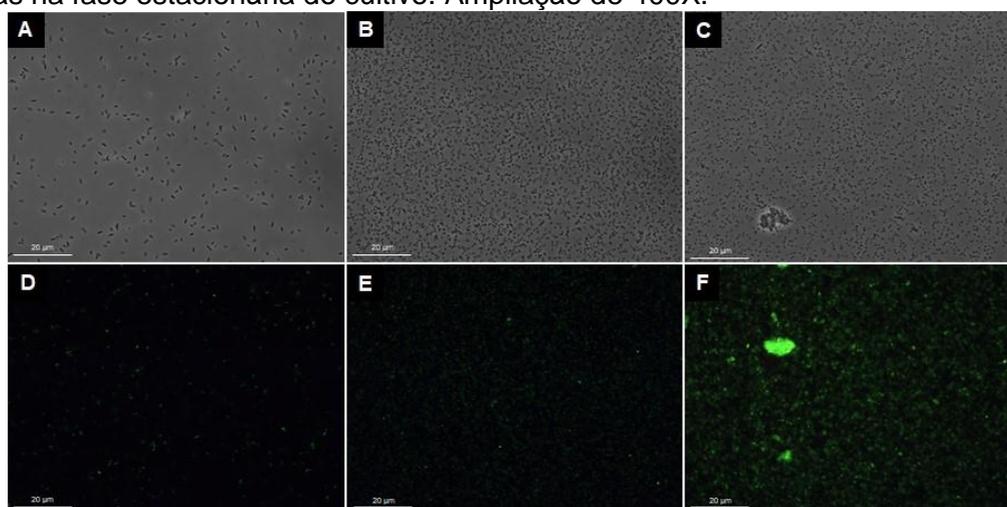
entanto, será interessante no futuro mais estudos para avaliar se o tamponamento do pH do meio pode auxiliar o crescimento do microrganismo sob estresse com Cd e, conseqüentemente, aumentar a eficiência da biorremediação.

3.4. Viabilidade celular e aspectos morfológicos de *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio com Cd

As elevadas densidades celulares verificadas ao final dos cultivos em meios contendo altas concentrações de Cd demandaram a realização de análises adicionais a fim de corroborar com a capacidade de *E. cloacae* UENF P7 de se multiplicar sob tais condições. Então, amostras não diluídas do meio fermentado, retiradas no tempo final, foram observadas no microscópio óptico de contraste de fase.

Conforme pode ser visto nas Figuras 2B e 2C, houve um claro aumento no número de células nos meios com 70 e 140 mg L⁻¹ de Cd, respectivamente, em comparação ao obtido no meio controle (Fig. 2A). Somado a isso, foi feita avaliação da viabilidade celular dessas amostras com o kit LIVE/DEAD[®], que mostrou clara emissão de fluorescência verde (Fig. 2D-F), mostrando que as células estavam viáveis ao final do processo.

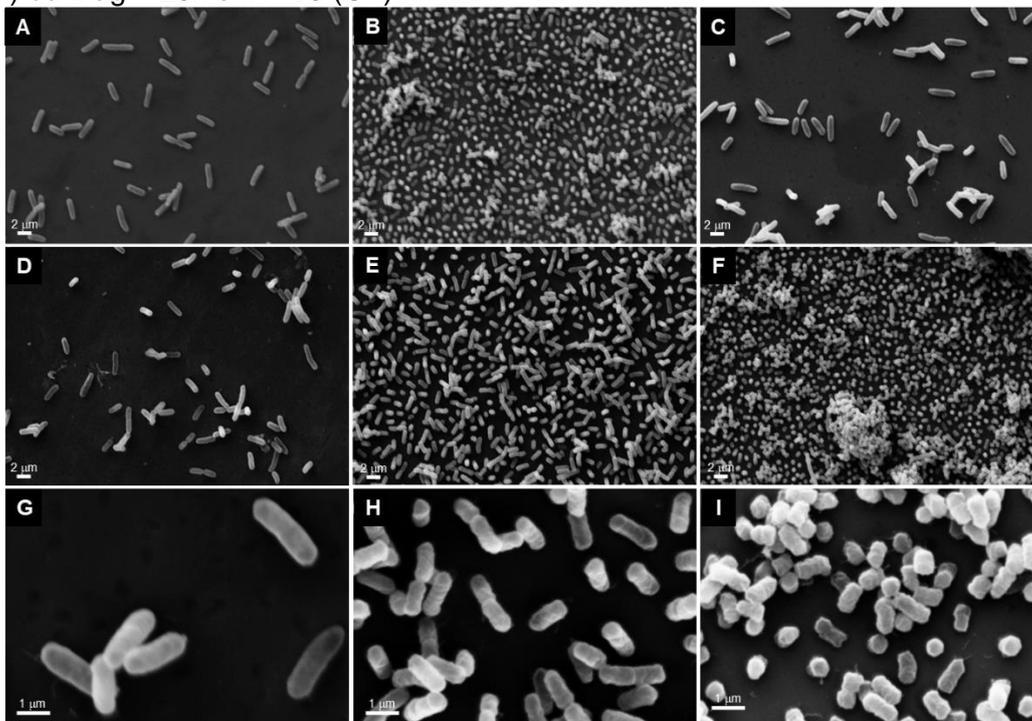
Fig. 2 - *E. cloacae* UENF P7 foi cultivada em meio LB líquido sem adição de Cd (A e D) e suplementado com 70 (B e E) ou 140 mg L⁻¹ (C e F). Imagens mostrando a intensidade da produção de biomassa por microscopia óptica de contraste de fase (A-C) e a viabilidade celular por ensaio Live/Dead *BacLight*/Invitrogen (D-F) de amostras retiradas na fase estacionária do cultivo. Ampliação de 400X.



A contagem de unidades formadoras de colônias em meio sólido confirmou que o número de células viáveis nos tratamentos com 70 mg L⁻¹ de Cd (2,1 x 10⁹ UFC mL⁻¹) e 140 mg L⁻¹ de Cd (1,0 x 10⁹ UFC mL⁻¹) foram muito superiores (12,5 e 7 vezes maiores, respectivamente) às obtidas no controle (2,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹) (p<0,01). Dessa forma, esses dados corroboram as medidas de concentração celular avaliadas por turbidimetria (Fig. 1 e Tab. 1).

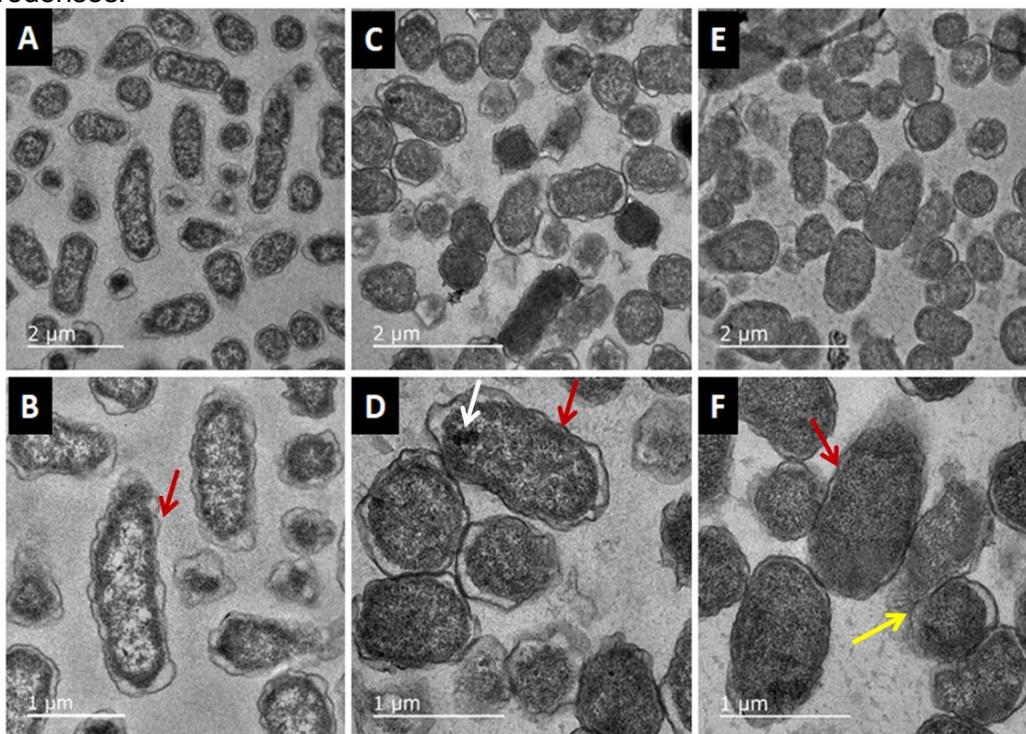
Análises por MEV e MET também foram empregadas para avaliar eventuais alterações morfológicas e/ou ultraestruturais causadas pelo Cd sobre as células de *E. cloacae* UENF P7. Micrografias obtidas por MEV de amostras retiradas durante as fases *log* e estacionária são apresentadas na Fig. 3. Em *midlog*, as células cultivadas em meio com 70 mg L⁻¹ de Cd apresentaram redução de tamanho (6 h) (Fig. 3B), quando comparadas às células cultivadas nos tratamentos controle (2 h) e com 140 mg L⁻¹ de Cd (10 h) (Fig. 3A e 3C, respectivamente). Na fase estacionária, no meio com 140 mg L⁻¹ de Cd, as células apresentaram diminuição do tamanho e superfície celular rugosa (Fig. 3F e I).

Fig. 3 - Micrografia obtida por MEV de *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio LB sem adição de Cd (A, D e G) ou em meio LB com 70 (B, E e H) e 140 mg L⁻¹ de Cd (C, F e I), na fase *midlog* (A-C) e na fase estacionária (D-I) de crescimento. Mag=5x e kV=10 (A-F) ou Mag = 25x e kV=15 (G-I).



As análises por MET foram feitas em amostras retiradas na fase estacionária de crescimento. A morfologia exibida pela bactéria no cultivo em meio sem adição de Cd é apresentada nas Fig. 4A e B. Nos meios com Cd (Figuras 4C-F), as células ficaram menos alongadas e tiveram aumento do diâmetro, além de sofrerem alterações na morfologia da superfície celular. Em comparação com células do meio controle, o contorno da parede celular mostrou-se menos sinuoso nas bactérias cultivadas na presença de Cd (seta vermelha), sobretudo no meio com 140 mg L^{-1} de Cd, onde também foi observada deformação das membranas citoplasmáticas (Fig. 4F - seta amarela). Além disso, a adição de Cd ao meio implicou em aumento da elétrondensidade no compartimento celular (Fig. 4C-F), associada à presença de grânulos eletrodensos quando cultivada em 70 mg L^{-1} Cd (Fig. 4D - seta branca).

Fig. 4 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão de *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio LB sem adição de Cd (A-B) ou em meio LB com 70 (C e D) e 140 mg L^{-1} (E e F) de Cd em fase estacionária. Setas - vermelhas: sinuosidade da parede celular; amarela: deformação de membrana citoplasmática e branca: grânulos eletrodensos.



Em bactérias, as mudanças morfológicas podem indicar uma resposta adaptativa a um ambiente estressante. Este comportamento já foi relatado para *E. cloacae* (Xu et al., 2017), *Enterobacter* sp. (Jiang et al., 2019), *Bacillus pumilus* (Nithya et al., 2011), *B. cereus* (Huang et al., 2014), *Halomonas meridiana* e *Marinobacter algicola* (Fernandes et al., 2018).

A redução do comprimento da célula e o aumento do volume celular são mecanismos adotados para reduzir locais de fixação e adsorção de metais na superfície (Nithya et al., 2011; Jiang et al., 2019). É possível que essa estratégia tenha sido utilizada por *E. cloacae* UENF P7, no entanto, considerando os dados de taxa de remoção de Cd que chegaram a valores próximos de 95%, é possível concluir que não houve sucesso em impedir a ligação dos metais.

Imagens obtidas por MET e MEV de *E. cloacae* TU, antes e depois do tratamento com Cd, mostraram que as células originais se apresentavam como bastonetes lisos e de tamanho uniforme, enquanto a maioria das bactérias que adsorveram Cd na superfície celular apresentaram depressões e deformações na membrana (Xu et al., 2017). Por outro lado, ao estudarem a resposta morfológica de *Enterobacter* sp. DNB-S2 a concentrações elevadas de Cd, Sun et al. (2020) não encontraram diferenças, em relação às células do meio sem adição de Cd, no tamanho, contornos celulares e espessura da parede celular, mas a estrutura intracelular das células cultivadas com Cd foi modificada, apresentando aspecto de vacuolização.

Células de *Enterobacter* EG16 exibiram morfologia distorcida, com membranas citoplasmáticas deformadas, quando cultivadas em meio com 200 mg L⁻¹ de Cd (Cheng et al., 2016). Em *B. cereus* RC1, a morfologia das células foi afetada quando cultivadas em meios com 50 e 100 mg L⁻¹ de Cd, havendo encolhimento do citoplasma e aumento progressivo da rugosidade, o que foi atribuído à adsorção extracelular do metal (Huang et al., 2014), semelhante ao observado na cepa UENF P7. Isto sugere que a superfície das células tratadas com Cd no presente trabalho estavam repletas do metal ligado, devido às alterações que foram observadas nas micrografias em 140 mg L⁻¹ de Cd.

A adsorção de Cd à parede celular também foi o principal mecanismo de resistência utilizado por *E. cloacae* TU (Xu et al., 2017), *Enterobacter* sp. DNB-S2 (Sun et al., 2020), *B. cereus* M-16 (Ganguly et al., 2010) e *Streptomyces zinciresistens* CCNWNQ0016T (Lin et al., 2012). Essa adsorção extracelular de metais pode ser baseada em mecanismos como complexação de superfície, troca iônica e interação eletrostática, podendo todos ocorrer de forma independente ou estarem sinergicamente envolvidos (Srinath et al., 2002).

A produção de substâncias poliméricas extracelulares, como EPS, foi também descrita como alternativa para aumentar a adsorção de Cd na superfície bacteriana. Em *E. cloacae* TU, a hipersecreção de EPS estimulada por Cd foi o mecanismo principal de adsorção do metal na superfície das células (Xu et al., 2017), o que também foi observado em *Pseudomonas putida* KT2440 (Pabst et al., 2010) e *Sinorhizobium meliloti* WT (Slaveykova et al., 2010).

Outras estratégias de desintoxicação de Cd utilizadas por bactérias incluem a precipitação intracelular do metal e sua bioacumulação na forma de grânulos eletrodensos. Esse comportamento foi observado em cepas de *Enterobacter* (Cheng et al., 2014; Mitra et al., 2018b; Sun et al., 2020), *B. cereus* (Li et al., 2018b), *Klebsiella* sp. (Pramanik et al., 2017; Mitra et al., 2018a) e *Cupriavidus* sp. (Shi et al., 2020). Análises por diferentes métodos revelaram que esses grânulos são compostos por sulfeto de cádmio e/ou outros sais de Cd insolúveis, como carbonato e fosfato (Cheng et al., 2016; Li et al., 2018b; Sun et al., 2020). Portanto, futuramente, será necessário averiguar a composição dos grânulos eletrodensos observados nas micrografias de *E. cloacae* UENF P7 tratada com Cd.

Com base nestes relatos, pode-se inferir que as alterações intra e extracelulares observadas na cepa UENF P7 quando cultivada em meios com elevadas concentrações de Cd (Fig. 3 e 4) foram decorrentes da adsorção e/ou bioacumulação do referido metal e fazem parte do rol de mecanismos de resistência presentes nesta bactéria. O sequenciamento genômico de *E. cloacae* UENF P7 já revelou a existência de genes que codificam a produção de enzimas antioxidantes (catalases e superóxido dismutase), transportadores de membrana (tipo ATPase tipo P para cádmio) e proteínas

como CzcA (resistência à cobalto-zinco-cádmio) (Silva, 2017). É possível, portanto, que estes genes tenham sido ativados nestas condições estressantes, contribuindo para o maior crescimento em concentrações tão elevadas do metal, um comportamento aparentemente inédito para bactérias. Outras espécies bacterianas desafiadas com Cd não relataram desempenho semelhante (Abbas et al. 2014; Das et al. 2014; Huang et al. 2014; Chen et al. 2016; Parsons et al. 2017; Xu et al. 2017; Mitra et al. 2018a e 2018b; Sun et al. 2020; Shi et al. 2020).

No entanto, para outros microrganismos como o fungo *Agaricus abruptibulbus*, verificou-se crescimento significativo, tanto meio líquido quanto em meio sólido suplementados com Cd (Meisch et al. 1981). Price & Morel (1990) também verificaram que sob condições de limitação de zinco no meio, Cd atuou substituindo esse elemento em macromoléculas no cultivo da diatomácea marinha *Thalassiosira weissflogii*. Dados obtidos para essa espécie indicaram que Cd atuou diretamente no metabolismo celular, participando no funcionamento da metaloenzima anidrase carbônica, para aquisição de carbono inorgânico (Park et al., 2008; Li et al., 2020). Portanto, são necessários mais estudos com diferentes abordagens para compreender o real papel do Cd no metabolismo de *E. cloacae* UENF P7.

Apesar do conhecimento sobre a existência de múltiplos mecanismos antioxidantes preditos na estrutura genética de *E. cloacae* UENF P7, novas pesquisas poderão elucidar os caminhos utilizados pela bactéria para contornar os efeitos tóxicos do Cd e produzir concentrações tão elevadas de biomassa em cultivos com o metal. Ademais, desvendar e caracterizar os mecanismos utilizados pela bactéria para esta autoproteção e resistência ao Cd poderá trazer luz para a compreensão de fenômenos semelhantes em outros microrganismos, e para outros metais tóxicos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que *E. cloacae* UENF P7 apresenta elevada resistência a Cd, o que foi evidenciado em ensaios de cinética de crescimento celular na presença do metal e por análises de microscopia. As concentrações testadas de Cd são superiores aos limites permitidos pelas legislações ambientais e às relatadas na literatura como limitantes para outros organismos. Por outro lado, o trabalho constitui o primeiro relato sobre a capacidade de uma espécie bacteriana produzir elevadas concentrações de células durante o cultivo em meios contendo altas concentrações de Cd. Considerando a origem da cepa *E. cloacae* UENF P7, os resultados aqui obtidos podem também auxiliar no desenvolvimento de estratégias para remediação de águas residuais contaminadas com o metal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H.A., Khalil, H.P.S.A., 2018. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 243–262.
- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Ismail, N., Lalung, J., 2014. Isolation, identification, characterization, and evaluation of cadmium removal capacity of *Enterobacter* species. *J. Basic Microbiol.* 54, 1279–1287.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Onaindia, M., Garbisu, C., 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 3, 55–70.
- Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., Kaliannan, T., 2014. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecol. Eng.* 71, 728–735.
- Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R., 2011. Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets «Vitória». *Brazilian J. Microbiol.* 42, 114–125.
- Berbert-Molina, M.A., Prata, A.M.R., Pessanha, L.G., Silveira, M.M., 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1397–1404.
- Boyanov, M.I., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Bunker, B.A., Fein, J.B., Fowle, D.A., 2003. Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: a pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 3299–3311.
- Britto, A.L., Formiga-Johnsson, R.M., Carneiro, P.R.F., 2016. Water supply and hydrosocial scarcity in the Rio de Janeiro Metropolitan Area. *Ambient. Soc.* 19, 183–206.
- Brown, T.J., Idoine, N.E., Wrighton, C.E., Raycraft, E.R., Hobbs, S.F.A., Shaw, R., Everett, P., Deady, E.A., Kresse, C., 2021. World Mineral Production 2015-2019. *Br. Geol. Surv.*
- Chen, Y., Chao, Y., Li, Y., Lin, Q., Bai, J., Tang, L., Wang, S., Ying, R., Qiu, R., 2016. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp. strain EG16 under cadmium stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1734–1744.
- Das, D., Salgaonkar, B.B., Mani, K., Braganca, J.M., 2014. Cadmium resistance in extremely halophilic archaeon *Haloferax* strain BBK2. *Chemosphere* 112, 385–392.
- Fan, D., Sun, J., Liu, C., Wang, S., Han, J., Agathokleous, E., Zhu, Y., 2021. Measurement and modeling of hormesis in soil bacteria and fungi under single and combined treatments of Cd and Pb. *Sci. Total Environ.* 783, 147494.
- Fatima, G., Raza, A.M., Hadi, N., Nigam, N., Mahdi, A.A., 2019. Cadmium in human diseases: it's more than just a mere metal. *Indian J. Clin. Biochem.* 34, 371–378.
- Fernandes, S.O., Surya Prakash, L., Balan Binish, M., Padinchati Krishnan, K., John Kurian, P., 2018. Changes in morphology and metabolism enable Mn-oxidizing bacteria from mid-oceanic ridge environment to counter metal-induced stress. *J. Basic Microbiol.* 58, 390–402.
- Ganguly, A., Guha, A.K., Ray, L., 2011. Adsorption behaviour of cadmium by

- Bacillus cereus* M116: some physical and biochemical studies. Chem. Speciat. Bioavailab. 23, 175–182.
- Heidari, P., Sanaeizade, S., Mazloomi, F., 2020. Removal of nickel, copper, lead and cadmium by new strains of *Sphingomonas melonis* e8 and *Enterobacter hormaechei* WW28. Journal Appl. Biotechnol. Reports 7, 208–214.
- Huang, F., Guo, C.-L., Lu, G.-N., Yi, X.-Y., Zhu, L.-D., Dang, Z., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. Chemosphere 109, 134–142.
- Jiang, Z., Jiang, L., Zhang, L., Su, M., Tian, D., Wang, T., Sun, Y., Nong, Y., Hu, S., Wang, S., Li, Z., 2019. Contrasting the Pb (II) and Cd (II) tolerance of *Enterobacter* sp. via its cellular stress responses. Environ. Microbiol. 22, 1507–1516.
- Khan, M.A., Khan, S., Khan, A., Alam, M., 2017. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. Sci. Total Environ. 601–602, 1591–1605.
- Li, F., Wang, W., Li, C., Zhu, R., Ge, F., Zheng, Y., Tang, Y., 2018. Self-mediated pH changes in culture medium affecting biosorption and biomineralization of Cd²⁺ by *Bacillus cereus* Cd01. J. Hazard. Mater. 358, 178–186.
- Li, W., Sunda, W.G., Lin, W., Hong, H., Shi, D., 2020. The effect of cell size on cellular Zn and Cd and Zn-Cd-CO₂ colimitation of growth rate in marine diatoms. Limnol. Oceanogr. 65, 2896–2911.
- Li, Y., Liu, K., Wang, Y., Zhou, Z., Chen, C., Ye, P., Yu, F., 2018. Improvement of cadmium phytoremediation by *Centella asiatica* L. after soil inoculation with cadmium-resistant *Enterobacter* sp. FM-1. Chemosphere 202, 280–288.
- Lian, Z., Yang, Z., Song, W., Sun, M., Gan, Y., Bai, X., 2022. Effects of different exogenous cadmium compounds on the chemical composition and adsorption properties of two gram-negative bacterial EPS. Sci. Total Environ. 806, 150511.
- Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C., 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. Ecotoxicol. Environ. Saf. 122, 322–330.
- Lin, Y., Wang, X., Wang, B., Mohamad, O., Wei, G., 2012. Bioaccumulation characterization of zinc and cadmium by *Streptomyces zinciresistens*, a novel actinomycete. Ecotoxicol. Environ. Saf. 77, 7–17.
- Lindsay, H., 1973. A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3, 5-dinitrosalicylic acid. Potato Res. 16, 176–179.
- Meisch, H.-U., Scholl, A.-R., Schmitt, J.A., 1981. Cadmium - ein wachstumsfaktor für den schiefknulligen anis champignon *Agaricus abruptibulbus* (Peck) Kauffmann. Zeitschrift für Naturforsch. C 36, 765–771.
- Mignone, C.F., Avignone-Rossa, C., 1996. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 78–84.
- Mitra, S., Pramanik, K., Ghosh, P.K., Soren, T., Sarkar, A., Dey, R.S., Pandey, S., Maiti, T.K., 2018a. Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth

- promotion under Cd stress. *Microbiol. Res.* 210, 12–25.
- Mitra, S., Pramanik, K., Sarkar, A., Ghosh, P.K., Soren, T., Maiti, T.K., 2018b. Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 183–196.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Pandian, S.K., 2011. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Mar. Environ. Res.* 71, 283–294.
- Özdemir, S., Kılınç, E., Poli, A., Nicolaus, B., 2013. Biosorption of heavy metals (Cd²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, and Mn²⁺) by thermophilic bacteria, *Geobacillus thermantarcticus* and *Anoxybacillus amylolyticus*: equilibrium and kinetic studies. *Bioremediat. J.* 17, 86–96.
- Pabst, M.W., Miller, C.D., Dimkpa, C.O., Anderson, A.J., McLean, J.E., 2010. Defining the surface adsorption and internalization of copper and cadmium in a soil bacterium, *Pseudomonas putida*. *Chemosphere* 81, 904–910.
- Park, H., McGinn, P., Morel, F., 2008. Expression of cadmium carbonic anhydrase of diatoms in seawater. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 183–193.
- Parsons, C., Lee, S., Jayeola, V., Kathariou, S., 2017. Novel cadmium resistance determinant in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83.
- Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., Soren, T., Maiti, T.K., 2017. Characterization of cadmium-resistant *Klebsiella pneumoniae* MCC 3091 promoted rice seedling growth by alleviating phytotoxicity of cadmium. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24419–24437.
- Price, N.M., Morel, F.M.M., 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* 344, 658–660.
- Rahman, M., Hasan, M.R., Shimizu, K., 2008. Growth phase-dependent changes in the expression of global regulatory genes and associated metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 30, 853–860.
- Schindler, B.D., Frempong-Manso, E., DeMarco, C.E., Kosmidis, C., Matta, V., Seo, S.M., Kaatz, G.W., 2015. Analyses of multidrug efflux pump-like proteins encoded on the *Staphylococcus aureus* Chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 747–748.
- Shi, Z., Zhang, Z., Yuan, M., Wang, S., Yang, M., Yao, Q., Ba, W., Zhao, J., Xie, B., 2020. Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2. *Chemosphere* 247, 125834.
- Silva, N.D., 2017. Genômica e Proteômica de *Enterobacter cloacae* UENF P7: uma bactéria resistente a estresse isolada de planta aquática. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Singh, R., Glick, B.R., Rathore, D., 2018. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: a review. *Pedosphere* 28, 170–189.
- Siqueira, S. de P.O., 2015. Otimização do cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL em sistema descontínuo visando a maximização da produção de biomassa. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Slaveykova, V.I., Parthasarathy, N., Dedieu, K., Toescher, D., 2010. Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environ. Pollut.* 158, 2561–2565.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K., 2002. Chromium (VI)

- biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48, 427–435.
- Sun, R., Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y., 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China. *Environ. Pollut.* 263, 114612.
- Sun, Ruixue, Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y., 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China. *Environ. Pollut.* 263, 114612.
- Valls, M., de Lorenzo, V., 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 327–338.
- Wiangkham, N., Prapagdee, B., 2018. Potential of Napier grass with cadmium-resistant bacterial inoculation on cadmium phytoremediation and its possibility to use as biomass fuel. *Chemosphere* 201, 511–518.
- Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W., Lu, D., 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU. *Chemosphere* 173, 622–629.
- Zhao, Y., Yao, J., Yuan, Z., Wang, T., Zhang, Y., Wang, F., 2017. Bioremediation of Cd by strain GZ-22 isolated from mine soil based on biosorption and microbially induced carbonate precipitation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 372–380.
- Zhou, W., Wang, J., Shen, B., Hou, W., Zhang, Y., 2009. Biosorption of copper(II) and cadmium(II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 72, 295–302.

6. CAPÍTULO 3

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Enterobacter cloacae* UENF P7
REVELA ESTRATÉGIAS DE CRESCIMENTO DURANTE A
EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO**

RESUMO

Enterobacter cloacae é uma bactéria Gram-negativa com grande potencial para aplicações biotecnológicas, em função de sua diversidade metabólica e capacidade de sobrevivência sob condições adversas, incluindo ambientes poluídos por metais pesados. A cepa *E. cloacae* UENF P7 demonstrou expressivo crescimento e capacidade de remoção de cádmio (Cd) durante cultivo sob altas concentrações do metal, evidenciando sua resistência a esse agente estressor. No presente trabalho, buscando esclarecer os mecanismos que justifiquem esse comportamento, foi realizada análise proteômica de amostras obtidas na fase *late log* durante cultivo desta cepa em meio LB tamponado suplementado com 70 mg L⁻¹ Cd. Os ensaios foram feitos em frascos agitados, com controle de temperatura (30 °C) e agitação (165 rpm), acompanhando-se a cinética de crescimento por turbidimetria e a remoção de Cd por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OEs). A análise proteômica foi feita por espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS. Os resultados evidenciaram elevadas velocidades de crescimento e produção de células duas vezes maior (4,9 g L⁻¹) que no meio não suplementado com Cd. A biomassa foi capaz de remover 61,8 mg L⁻¹ Cd até a fase estacionária de crescimento (12 h), o que corresponde a 88% do inicial. A análise do perfil proteômico revelou os seguintes mecanismos para lidar com o estresse causado por Cd: 1) excreção de Cd por bomba de efluxo (ATPase do tipo P transportadora de zinco/cádmio/chumbo (ZntA)); 2) mitigação de danos por enzimas antioxidantes (catalase/peroxidase HPI e catalase HPII); 3) ligação com metaloproteínas (cysteine desulfurase e Fe-S cluster assembly scaffold IscU); Também foram positivamente reguladas várias proteínas envolvidos em diferentes rotas metabólicas de produção de energia (ciclo dos ácidos tricarboxílicos, glicólise, via das pentoses fosfato, fosforilação oxidativa), biossíntese de arginina e vias de degradação de aminoácidos (alanina, aspartato, glutamato, cisteína e metionina). A expressão dessas proteínas ajuda a explicar a elevada atividade celular e resistência ao Cd demonstradas por *E. cloacae* UENF P7 neste trabalho.

Palavras-chave: Mecanismos de resistência; metal; Cd

1. INTRODUÇÃO

A contaminação por metal causada por atividades industriais representa uma ameaça contínua aos ecossistemas e à saúde humana (Das et al., 2016). Dentre os metais, cádmio (Cd) se destaca pela alta toxicidade, estando atrás apenas de mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) (Jamers, 2013; Ismael et al., 2019). O Cd tem efeitos adversos à saúde humana, sendo acumulado principalmente nos rins e no fígado (Klaassen et al., 1999; Aitio et al., 2004) e é categorizado como cancerígeno para humanos (Jaishankar et al., 2014).

Novas tecnologias envolvendo abordagens multidisciplinares com microrganismos têm sido propostas para tratar efluentes contaminados por metais, incluindo bioestimulação, bioaugmentação, bioacumulação e biossorção (Niti et al. 2013). Esses métodos biológicos de remediação têm maior potencial econômico em comparação com métodos físicos e químicos (Wang et al., 2019; Sharma e Kumar et al., 2021), com a vantagem de não alterar o microambiente natural e manter o equilíbrio do ecossistema (Das et al., 2016). As bactérias são candidatas promissoras para estes processos por apresentarem sistemas especializados de resistência a metais (Wang et al., 2019). Além disso, características como a alta razão área de superfície para volume, a presença de material genético extra cromossômico, a plasticidade fenotípica, altas velocidades de crescimento, bem como versatilidade nutricional, favorecem seu potencial de aplicação (Smith, 2005).

Os mecanismos de sobrevivência de bactérias sob exposição ao Cd incluem redução da absorção, sequestro, complexação do metal, efluxo, síntese de peptídeos ligantes e secreção de polissacarídeos extracelulares (Gadd, 2004; Xu et al., 2017; Chuanboon et al., 2019). De acordo com Abbas et al. (2017), dentre as bactérias resistentes a Cd, o principal grupo consiste naquelas que efluem Cd das células por meio de bombas de efluxo. Essas proteínas de membrana são responsáveis pela extrusão do metal. Outras espécies utilizam mecanismos de adsorção à parede celular. Neste caso, grupos funcionais como amina, carboxila, fosfato e hidroxila facilitam a ligação do Cd à superfície bacteriana. Enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase, também podem estar envolvidas na desintoxicação do

Cd em bactérias, pois participam da eliminação de espécies reativas de oxigênio geradas pelo metal (Banerjee et al., 2015).

A análise proteômica é uma ferramenta importante para comparar proteomas, ou seja, o conjunto de proteínas expressas em determinadas condições fisiológicas, como aquelas resultantes da exposição a metais ou outros fatores ambientais (Requejo e Tena, 2005). A melhora substancial nas técnicas de separação e identificação de proteínas, assim como a expansão do conhecimento genômico, levaram a um aumento na aplicação de métodos proteômicos para responder questões biológicas, aprofundando os conhecimentos das interações entre organismos e o meio ambiente (Luque-Garcia et al., 2011; Han et al., 2021).

Enterobacter cloacae é uma bactéria Gram-negativa que tem sido estudada para aplicações biotecnológicas, devido à sua alta capacidade de adaptação e sobrevivência em condições adversas (Chuanboon et al., 2019). A bactéria tem sido relatada como resistente a muitos metais, incluindo Cd, Ni, Cr e Pb, mostrando que possui proteínas de respostas a estes estresses ambientais (Chakraborty e Das, 2014; Banerjee et al., 2015; Rahman et al., 2015; Oziegbe et al., 2021). A análise proteômica de *E. cloacae* EC01 após exposição a Cd mostrou alta expressão de proteínas de ligação ao metal, além da enzima antioxidante catalase (Das et al., 2016).

Trabalhos recentes demonstraram a resistência de *E. cloacae* UENF P7 em meios com elevadas concentrações de Cd, evidenciada pela sua capacidade de produzir biomassa em altas velocidades e de remover altas doses do metal (Capítulo 1 e 2). Certamente, a bactéria dispõe de mecanismos de proteção contra Cd, incluindo a diversificação de rotas metabólicas para obtenção de energia, o que garante o crescimento da cepa nestas condições. Assim, visando esclarecer os mecanismos de resistência e remoção de Cd por *E. cloacae* UENF P7, realizou-se análise proteômica de amostras recolhidas na fase final do cultivo da bactéria, de forma a investigar alterações dos perfis de expressão de proteínas na presença de Cd. Além disso, foi analisada a cinética de remoção de Cd durante o cultivo da bactéria.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cepa bacteriana e preparo do inóculo

E. cloacae UENF P7 foi isolada da raiz da planta aquática *Pistia stratiotes*, coletada no Rio Paraíba do Sul, em Resende-RJ, Brasil. O número de acesso à cepa no GenBank é NQLK 00000000.1 (Silva, 2017).

Culturas da bactéria foram estocadas em solução de glicerol 40% a -80 °C e ativadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido. Foi utilizado para inóculo meio LB modificado (g L⁻¹: glicose, 10; triptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5 com pH 6,0) (Xu et al., 2017). Para meio sólido, adicionou-se 15 g L⁻¹ de agar. O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com chicanas, contendo 50 mL de meio e inoculados com alçadas de cultura fresca ativadas em meio sólido. Os frascos foram incubados a 30 °C e 165 rpm, em agitador orbital (SOLAB SL-222) até o cultivo alcançar *midlog*.

2.2. Solução do metal

A solução estoque (1 mol L⁻¹) de CdCl₂.H₂O (CINÉTICA) foi preparada em água ultrapura (Sistema Milli-Q). A mesma foi esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm. Alíquotas da solução foram adicionadas ao meio de cultivo em volume adequado para obter as concentrações desejadas de Cd.

2.3. Cultivo bacteriano em meio líquido suplementado com Cd

A cinética de crescimento bacteriano em meio contendo 70 mg L⁻¹ foi avaliada empregando-se frascos Erlenmeyer de 500 mL, com chicanas, contendo 100 mL de meio LB tamponado em pH 6,0, com 3 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e KH₂PO₄ e 5% v/v de inóculo. Os frascos foram incubados em agitador orbital (SOLAB SL-222) a 30 °C e 165 rpm. Meio LB tamponado sem adição de Cd foi empregado como controle. A variação do pH do meio foi acompanhada durante o cultivo.

O crescimento celular foi monitorado por espectrofotometria (SHIMADZU UV-1800), a 600 nm (DO₆₀₀), de amostras retiradas em intervalos regulares. Posteriormente, os valores de DO₆₀₀ foram convertidos em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume), utilizando uma curva de calibração, conforme descrito por Siqueira (2017). Para a construção da

curva foi utilizada uma suspensão de células de *E. cloacae* UENF P7 cultivada em meio LB nas condições citadas, retiradas na fase *midlog*. A variação do pH do meio foi acompanhada durante o cultivo.

2.4. Quantificação de glicose

A determinação da concentração de glicose no meio durante o cultivo bacteriano foi feita pelo método descrito por Lindsay (1973). Brevemente, 500 μ L do meio fermentado foi centrifugada (EPPENDORF 5804 R) a 16.873 x g por 5 min. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 250 μ L do sobrenadante e 250 μ L de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS - ÊXODO CIENTÍFICA), mantendo-se a mistura em banho-maria a 100 °C por 15 min. Após resfriamento, foram adicionados 2 mL de água ultrapura aos tubos, seguindo-se a leitura da absorbância a 540 nm (SHIMADZU UV-1800). Solução de glicose P.A (VETEC) foi utilizada como padrão.

2.5. Determinação de Cd

A capacidade de remoção do Cd por *E. cloacae* UENF P7 foi quantificada durante o cultivo em meio LB suplementado com 70 mg L⁻¹ de Cd. Resumidamente, 15 mL do meio fermentado foram centrifugados (EPPENDORF 5804 R) a 3.438 x g por 20 min. e lavado duas vezes. O pellet (100 mg) foi digerido com 1,0 mL de ácido nítrico bidestilado (HNO₃, 67% v/v) e aquecido a 100 °C nos tubos tampados por 4 h. Após o resfriamento, as amostras foram diluídas com água ultrapura (Sistema Milli-Q) e analisadas por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OEs), empregando-se o espectrômetro Varian Liberty Series II (Cd: λ = 214 nm; tempo de exposição: 60 s; sensibilidade: amplo; direção de visualização: horizontal).

2.6. Análise Proteômica

2.6.1. Extração de Proteínas

A análise proteômica foi realizada em amostras obtidas do meio fermentado (três réplicas biológicas, 300 mg cada amostra), quando o cultivo estava entrando na fase estacionária do crescimento, sendo o controle em 4h e

tratamento com Cd (70 mg L^{-1}) com 8h. As proteínas foram extraídas usando o método de precipitação TCA/acetona descrito por Damerval et al. (1986). Resumidamente, as amostras foram precipitadas em 1 mL de tampão de extração refrigerado contendo ácido tricloroacético 10% (p/v) (TCA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em acetona com 20 mmol L^{-1} de ditioneitol (DTT; GE Healthcare), vortexadas por 30 min a $8 \text{ }^\circ\text{C}$ e incubadas a -20°C por 1 h para precipitação das proteínas. Em seguida, a mistura foi centrifugada a $16.000 \times g$ por 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Os pellets resultantes foram lavados três vezes com acetona gelada contendo 20 mmol L^{-1} de DTT, vortexados por 30 s e centrifugados por 5 min. a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, para cada lavagem. As amostras foram secas ao ar, ressuspensas em 1 mL de tampão contendo 7 mol L^{-1} de uréia (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 2 mol L^{-1} de tiouréia (GE Healthcare), 2% de Triton X-100 (GE Healthcare), 1% de DTT, 1 mmol L^{-1} fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma-Aldrich) e incubado durante 30 min em gelo. As amostras foram então vortexadas a $8 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min e centrifugadas a $16.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de proteína foram determinadas usando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA).

2.6.2. Digestão de Proteínas

Para a digestão de proteínas, $100 \text{ } \mu\text{g}$ de proteínas extraídas de cada réplica biológica foram precipitadas usando o método metanol/clorofórmio para remover qualquer interferência das amostras antes da digestão com tripsina (Nanjo et al., 2012). Após a precipitação das proteínas, as amostras foram ressuspensas em solução de 7 mol L^{-1} uréia/ 2 mol L^{-1} tiouréia para suspensão adequada. A digestão de proteínas tripticas (1:100 enzima:proteína, V5111, Promega, Madison, EUA) foi realizada usando o filtro auxiliar de preparação de amostras (FASP) (Wiśniewski et al. 2009), com modificações. Antes de iniciar a digestão, foi realizado um teste de integridade para verificar se havia unidades de filtro danificadas (Hernandez-Valladares et al. 2016), portanto, apenas as unidades de trabalho foram usadas. Posteriormente, alíquotas de proteína foram adicionadas às unidades de filtro Microcon-30 kDa Merck Millipore (Darmstadt, HE, Alemanha) (Lipecka et al. 2016), lavadas com $200 \text{ } \mu\text{L}$ de

bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich) (solução A) e centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 25 °C (salvo indicação em contrário, todas as etapas de centrifugação foram realizadas nesta condição). Esta etapa foi repetida uma vez para remoção completa da uréia antes da redução da proteína. Em seguida, 100 µL de DTT 50 mmol L⁻¹, recém-preparado na solução A, foi adicionado, vortexado e incubado por 20 min a 60 °C (1 min de agitação e 4 min. de repouso, a 350 rpm). A seguir, 200 µL de 8 mol L⁻¹ de uréia em 50 mmol L⁻¹ de bicarbonato de amônio (solução B) foi adicionado e centrifugado por 15 min. Para a alquilação da proteína, 100 µL de iodoacetamida 50 mmol L⁻¹ (GE Healthcare) recém-preparada na solução B, foi adicionado, suavemente vortexado e incubados por 20 min. a 25 °C na ausência de luz (1 min de agitação e 19 min de repouso, a 350 rpm). Posteriormente, 200 µL de solução B foi adicionado e centrifugado por 15 min. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida, 200 µL da solução A foram adicionados e centrifugados por 15 min. Este passo foi repetido duas vezes. Aproximadamente 50 µL da amostra deve permanecer na última lavagem. Para digestão de proteínas, 25 µL de RapiGest 0,2% (v/v) (Waters, Milford, CT, EUA) e 25 µL de solução de tripsina (1:100 enzima:proteína, V511, Promega, Madison, EUA) foi adicionado, suavemente vortexado e incubado por 16 h a 37 °C (1 min de agitação e 4 min de repouso a 350 rpm). Para a eluição peptídica, as unidades de filtro foram transferidas para novos microtubos e centrifugadas por 10 min., então 50 µL de solução A foi adicionado e centrifugado por 15 min. Esta etapa foi repetida uma vez. Para precipitação de RapiGest e inibição de tripsina, 5 µL de ácido trifluoroacético a 15% (TFA; Sigma-Aldrich) foi adicionado, suavemente agitado em vórtex e incubado por 30 min a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min. e os sobrenadantes foram coletados e secos a vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em 100 µL de uma solução a 95% de bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹, acetonitrila 5% e ácido fórmico 0,1% (Sigma-Aldrich). Os peptídeos resultantes foram quantificados pelo método da proteína e peptídeo A205 nm, usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

2.6.3. Análise de Espectrometria de Massa

Um nanoAcquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido) foi usado para ESI-LC-MS/MS. As corridas consistiram em três réplicas biológicas de 1 µg de proteínas digeridas. Durante a separação, as amostras foram carregadas na coluna nanoAcquity UPLC 5 µm C18 trap (180 µm x 20 mm) a 5 µL/min⁻¹ por 3 min. e depois na coluna de fase reversa analítica nanoAcquity HSS T31 1.8 µm (75 µm x 150 mm) a 400 nL/min⁻¹, com temperatura de coluna de 45 °C. Para a eluição peptídica foi utilizado um gradiente binário, com a fase móvel A (água e ácido fórmico 0,1%) e a fase móvel B (acetonitrila e ácido fórmico 0,1%). A eluição em gradiente começou em 7% B, depois aumentou de 7% B para 40% B até 92.72 min., depois permaneceu em 99,9% até 106.00 min, depois diminuiu para 7% B até 106.1 min e finalmente permaneceu em 7% B até o final do experimento em 120 min. A espectrometria de massa foi realizada em modo positivo e resolução (modo V), 35.000 FWHM, com mobilidade iônica e modo de aquisição de dados independente (HDMS^E). A onda de mobilidade iônica foi ajustada para uma velocidade de 600 m s⁻¹; a transferência de energia de colisão aumentou de 19 V para 55 V no modo de alta energia; as voltagens de cone e capilar foram de 30 V e 2750 V, respectivamente; e a temperatura da fonte foi de 70 °C. Nos parâmetros TOF, o tempo de varredura foi ajustado para 0,5 s no modo contínuo com uma faixa de massa de 50 a 2000 Da. O [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol/µL⁻¹ foi usado como calibrador externo e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 s. Os espectros de massa foram adquiridos pelo software MassLynx v4.0.

2.6.4. Análise de Dados Proteômicos

Para processamento espectral e busca em banco de dados, foram utilizados o ProteinLynx Global Server (PLGS; versão 3.0.2) (Waters, EUA) e o software de workflow ISSOQuant (Distler et al. 2014; 2016). O PLGS foi processado usando um limiar de baixa energia de 150 (contagens), um limiar de energia elevada de 50 e um limiar de intensidade de 750. Além disso, a análise foi realizada usando os seguintes parâmetros: duas clivagens perdidas,

um íon de fragmento mínimo por peptídeo igual a 3, um íon fragmento mínimo por proteína igual a 7, um peptídeo mínimo por proteína igual a 2, modificações fixas de carbamidometilo e modificações variáveis de oxidação e fosforil. A taxa de descoberta falsa foi definida para um máximo de 1%. Os dados proteômicos foram processados contra o banco de dados para *Enterobacter cloacae* UENF P7 da uniprot (UP000215937).

A análise comparativa de quantificação sem rótulo foi realizada usando o software ISOQuant, empregando-se configurações e algoritmos descritos anteriormente (Distler et al. 2014; 2016). Resumidamente, a análise incluiu alinhamento de tempo de retenção, tempo de retenção de massa exato e agrupamento de espectrometria de mobilidade de íons, bem como normalização de dados e filtragem de homologia de proteínas. O ISOQuant anota os agrupamentos de recursos resultantes avaliando as identificações de peptídeos de consenso e as probabilidades de identificação. Os parâmetros de identificação de proteínas no ISOQuant foram definidos para uma taxa de descoberta falsa de 1%, uma pontuação de peptídeo maior que seis, um comprimento mínimo de peptídeo de seis aminoácidos e pelo menos dois peptídeos por proteína. A quantificação sem rótulo foi estimada usando a abordagem de quantificação TOP3, seguida pelo processo de normalização multidimensional implementado no ISOQuant (Distler et al. 2014).

Finalmente, para anotação funcional, as proteínas reguladas diferencialmente foram lançadas contra o banco de dados de sequências de Enterobacterales não redundantes (nr) usando o software OmicsBox (Blast2Go).

2.7. Análise estatística

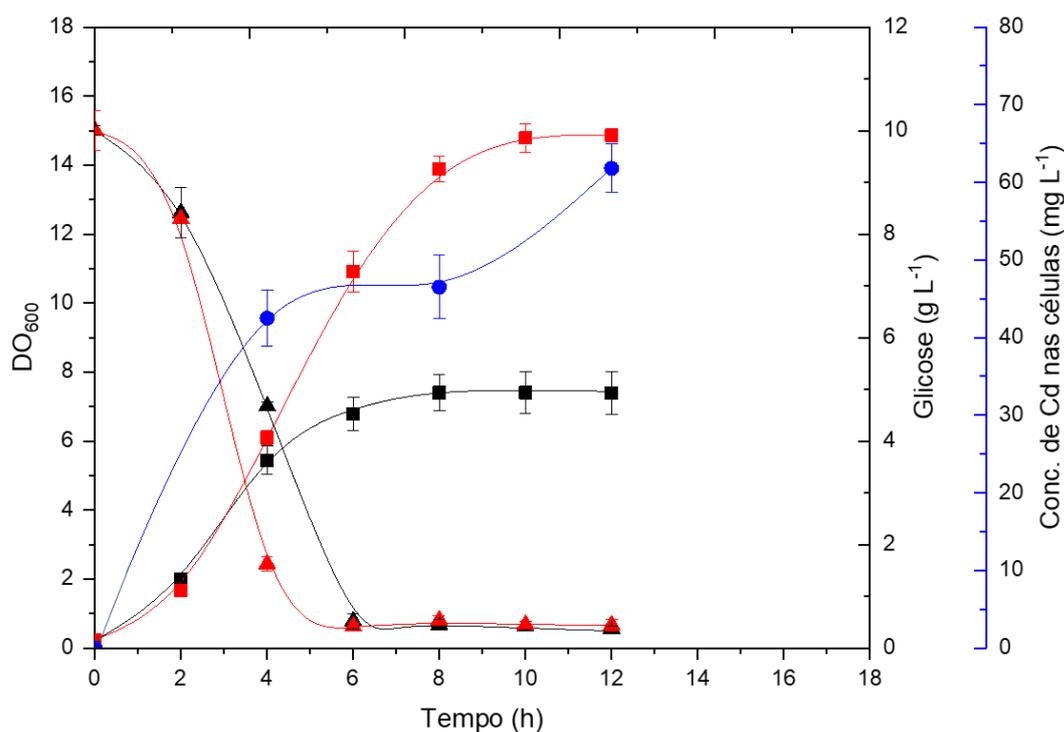
Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de experimentos replicados independentes (n=3). As análises estatísticas foram realizadas usando Graphpad Prism 9.0 para avaliar as diferenças significativas entre cada tratamento por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a um nível de significância ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética de crescimento e de remoção de Cd por *E. cloacae* UENF P7

Conforme mostra a Figura 1, os perfis cinéticos de crescimento foram similares nos dois meios avaliados até o tempo de 3 h. Após esse período, no controle houve desaceleração do crescimento e transição para a fase estacionária. A glicose foi metabolizada em altas velocidades até cerca de 6 h, depois disso, o consumo ficou praticamente paralisado até o final, verificando-se residual de 0,5 g L⁻¹ do açúcar. A máxima DO₆₀₀ (7,5), alcançada com 8 h, corresponde a 2,5 g L⁻¹ de células.

Fig. 1 - Cinética de crescimento (quadrado), consumo de glicose (triângulo) e concentração de Cd nas células (círculo), em função do tempo (h), no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 em meio LB tamponado. Meio controle: preto; meio com 70 mg L⁻¹ Cd: vermelho e azul (n=3).



A partir de 3 h, a cinética de crescimento no meio contendo Cd distinguiu-se consideravelmente daquela do meio controle (Fig.1). As velocidades de crescimento permaneceram elevadas, a fase *log* foi muito mais longa (~ 3,5 h) e a entrada na fase estacionária ocorreu 4 h depois. As velocidades de consumo de glicose foram superiores, mas também foi interrompido antes da

entrada na fase estacionária. O cultivo atingiu a DO_{600} máxima (14,8) com 10 h de cultivo, o que representa o dobro da concentração celular ($4,9 \text{ g L}^{-1}$) obtida no meio controle.

O tamponamento dos meios de cultivo não foi suficiente para manter o pH inicial (6,0) durante todo o cultivo. No meio controle o pH caiu para 5,4 no final da fase *log* (4 h), o que mostra que essa redução não foi suficiente para afetar o crescimento. No meio com Cd, os menores valores de pH (5,1-5,3) foram observados em 4 e 6 h, durante a fase *log*. Em trabalho anterior, no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 em meio LB não tamponado, no meio controle sem suplementação de Cd o pH caiu para 3,8, enquanto no meio com 70 mg L^{-1} Cd, o menor pH foi 3,9. No entanto, a concentração celular no controle foi duas vezes menor que a observada no presente trabalho, enquanto no meio com Cd o crescimento celular não foi afetado (Capítulo 2), o que mostra que o crescimento foi afetado em pH mais ácidos.

A variação da concentração de Cd nas células de *E. cloacae* UENF P7 durante o cultivo é apresentada na Figura 1. Com 4 h de processo, cerca de 61% do Cd ($42,5 \text{ mg L}^{-1}$) inicial haviam sido removidos do meio pela bactéria. Porém, a velocidade de remoção do metal diminuiu drasticamente e entre 4 e 8 h as concentrações de Cd acumulados nas células permaneceram aproximadamente constantes. Este comportamento pode indicar necessidade de readaptação das células, uma vez que o teor de Cd acumulado voltou a subir, chegando a $61,8 \text{ mg L}^{-1}$ em 12 h, valor que corresponde a 88% do total adicionado ao meio de cultivo.

O pH do meio influencia fortemente a solubilidade de metais e a competição entre íons metálicos e prótons pelos sítios de ligação da superfície celular bacteriana (Li et al., 2018; Heidari e Sanaeizade, 2020). Para as cepas *P. aeruginosa* B237 (Limcharoensuk et al., 2015), *Wangia profunda* SM-A87 (Zhou et al., 2009) e *Sphingomonas melonis* E8 (Heidari et al., 2020), a maior bioissorção de Cd^{2+} foi verificada em pH 6. Para outros microrganismos, como *Bacillus cereus* MG257494.1 e *Alcaligenes faecalis* MG966440.1, a bioissorção de Cd^{2+} foi mais eficiente em meios de cultivo com pH neutro (El-Meihy et al., 2019).

A remoção de Cd do meio também pode variar com a fase de crescimento bacteriana. Segundo Arivalagan et al. (2014), a bioabsorção de Cd²⁺ (CdCl₂) por *Bacillus cereus* foi insignificante na fase lag, mas, na fase log, a absorção do metal aumentou rapidamente devido à maior disponibilidade de sítios de ligação ativos na biomassa. De acordo com Huang et al. (2014), a máxima remoção de Cd ocorreu na fase estacionária em meios com 50 e 100 de mg L⁻¹. Em cultivo de *P. aeruginosa* KUCd1, mais de 75% do Cd solúvel no meio de cultivo foi removido na fase estacionária (Sinha e Mukherjee, 2009).

3.2. Estudo de Proteômica Comparativa

A cinética de crescimento de *E. cloacae* UENF P7 apresentada na Fig. 1 evidenciou que esta cepa foi capaz de produzir elevada concentração de células em meio suplementado com Cd, assim como remover elevadas concentrações do metal. Dessa forma, de modo a investigar os mecanismos utilizados pela bactéria para contornar os efeitos tóxicos do metal e reunir dados que ajudem a compreender o desempenho alcançado, foram realizadas análises de proteômica de amostras da biomassa coletadas nos tempos de 4 h, na condição controle, e de 8 h, no meio de cultivo com Cd (70 mg L⁻¹). O tempo de fermentação escolhido para a retirada das amostras baseou-se na fase de crescimento, estando ambos os cultivos na transição para a fase estacionária (*late log*). Foram identificadas 1.068 proteínas, sendo 391 proteínas acumuladas diferencialmente (DAPs). Dentre estas, 222 proteínas foram reguladas positivamente (UP) (Tab. S1) e 169 proteínas reguladas negativamente (DOWN) (Tab. S2), na comparação controle e tratamento. Além disso, foram identificadas 4 proteínas únicas no controle e 22 no tratamento com Cd (Tab. S3). Dentre as DAPs, algumas foram destacadas e discutidas neste trabalho de acordo com sua relevância na resposta ao metal.

A regulação do sistema de transporte é um dos primeiros mecanismos de resistência adotados por bactérias para realizar a manutenção da homeostase de metais na célula (Das et al., 2016). No tratamento com Cd, dentre as proteínas únicas, verificou-se regulação de uma ATPase do tipo P transportadora de zinco/cádmio/chumbo (ZntA). De acordo com Lopez et al. (2018), as ATPases do tipo P são cruciais na resistência ao Cd, pois participam

da exportação do metal na célula. *Burkholderia cepacia* GYP1 apresentou regulação positiva de uma ATPase tipo P exportadora de $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ sob estresse por Cd (Zhang et al., 2019). Poirier et al. (2016) relataram que a elevada regulação de ATPase exportadora de Cd por *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 neutralizou a toxicidade do metal por efluxo ativo de Cd^{2+} .

O Cd pode desencadear uma elevada produção de EROs e as células empregam alguns mecanismos antioxidantes para contornar o estresse oxidativo (Abbas et al., 2017). Os resultados da análise proteômica mostraram que *E. cloacae* UENF P7 cultivada na presença do Cd também apresentaram DAPs relacionadas a defesas antioxidantes. As proteínas glutathione redutase, S-formilglutathione hidrolase e peroxirredoxina C apresentaram regulação negativa, enquanto as proteínas catalase/peroxidase HPI e catalase HPII apresentaram regulação positiva. A expressão da proteína catalase também foi observada em três cepas de *E. cloacae* (ATCC 13047, EC01 e EC07) quando cultivadas sob estresse de Cd, sendo considerada a principal enzima utilizada para desintoxicar os efeitos nocivos do metal na cepa ATCC 13047 (Chuanboon et al., 2019). Banerjee et al. (2015) avaliaram a produção de catalase por *E. cloacae* B1 quando cultivada na presença de Cd, Ni e Pb, e verificaram uma maior produção dessa enzima na presença do Cd. A catalase é uma importante enzima antioxidante responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em água para reduzir o estresse oxidativo (Sun et al., 2020; Borisov et al., 2021). Portanto, a regulação positiva da catalase em *E. cloacae* UENF P7 cultivada na presença de Cd pode estar relacionada à necessidade da redução de radicais livres e proteção da integridade da célula exposta ao metal.

Outro mecanismo de resistência ao Cd adotado por bactérias é a regulação positiva de metaloproteínas, pois sua ligação a essas estruturas pode aliviar o efeito tóxico do metal na célula (Helbig et al., 2008; Wang et al., 2019). Em nossa análise proteômica observamos uma regulação positiva das metaloproteínas cisteína dessulfurase e Fe-S cluster assembly scaffold IscU. Wang et al. (2019) também observaram uma maior produção da cisteína dessulfurase por *Burkholderia cenocepacia* após cultivo na presença do Cd, atribuindo esse resultado ao mecanismo de defesa para desativar o metal no

citoplasma. Da mesma forma, a proteína Fe-S cluster assembly scaffold IscU pode ser inativada pela ligação do Cd aos resíduos de enxofre e cisteína da estrutura (Roy et al., 2017; Wang et al., 2019).

Utilizando o KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para avaliar as vias metabólicas, os resultados da análise proteômica indicaram que proteínas associadas à glicólise, via das pentoses fosfato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), fosforilação oxidativa, biossíntese de arginina e metabolismo de alanina, aspartato, glutamato, cisteína e metionina foram significativamente expressas no cultivo de *E. cloacae* UENF P7 na presença do Cd. Família de isomerases de açúcar-fosfato RpiB/LacA/LacB

As proteínas frutose-bisfosfatase, proteína da família das transcetolases, ribulose-fosfato 3-epimerase e família de isomerases de açúcar fosfato RpiB/LacA/LacB, reguladas positivamente, pertencem às vias glicolítica e pentoses fosfato (fase não oxidativa). Essas proteínas estão envolvidas na produção de D-Ribose-5P, o qual pode ser utilizado para a síntese de ácidos nucléicos (Karaman et al., 2020). Além disso, na via das pentoses fosfato, também observou-se a regulação positiva da proteína gluconoquinase, responsável pela fosforilação de D-gluconato em D-Gluconato-6P. Dessa forma, é provável que *E. cloacae* UENF P7 tenha produzido ácido glucônico na presença de Cd e o produto de sua fosforilação pode ser utilizado para gerar energia na via da pentose fosfato (Kumar et al., 2015).

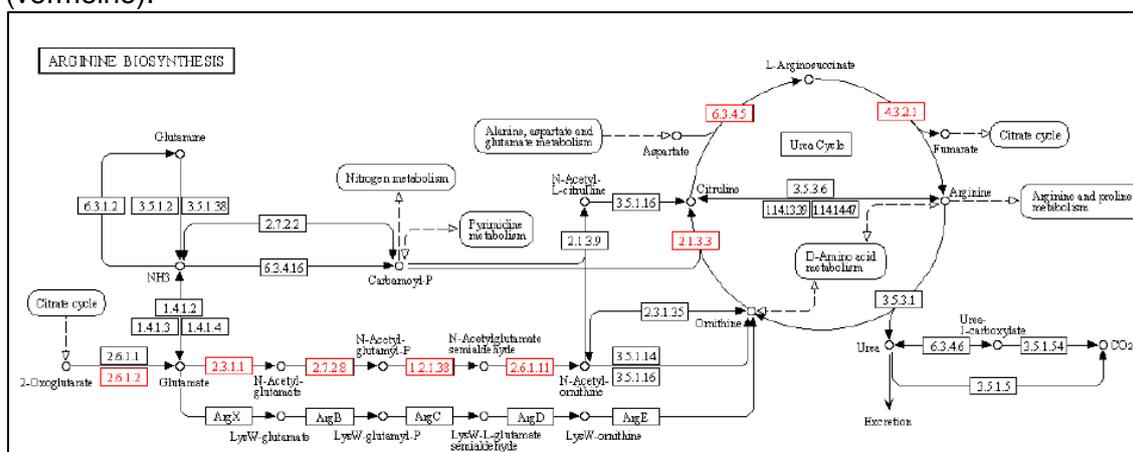
Seis proteínas do TCA apresentaram regulação positiva, indicando que o Cd não interrompeu a atividade do ciclo e continuou gerando energia para *E. cloacae* UENF P7 (Fig. 2 e Tab. 1). Para organismos aeróbicos, essa via é de grande importância para a produção de energia e fornecimento de compostos intermediários utilizados na biossíntese de proteínas, ácidos graxos e aminoácidos (Liu et al., 2018). Assim como no presente trabalho, a cepa *Burkholderia cepacia* GYP1 cultivada na presença de Cd apresentou aumento na produção das proteínas 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, malate dehydrogenase, fumarate hydratase class I e succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit designadas para manutenção da célula e resistência ao Cd (Zhang et al., 2019). Outras cepas bacterianas, quando expostas ao Cd, optam pela economia de energia através da inibição de processos metabólicos com

Tab. 1 - Proteínas UP reguladas identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 cultivadas na presença de 70 mg L⁻¹ Cd, em comparação ao controle.

Via metabólica	Proteína	Fold change	Código enzimático	Acesso
TCA	Malate dehydrogenase	1,01	EC 1.1.1.37	A0A7G3ERP4
	Aconitate hydratase AcnA	1,92	EC 4.2. 1.3	A0A7G3ET73
	Fumarate hydratase	2,57	EC 4.2.1.2	A0A7G3EXW7
	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	3,87	EC 1.3.5.4	A0A7G3EY32
	FAD-binding protein	2,71	EC 1.3.5.1	A0A7G3F146
	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	3,21	EC 2.3.1.6.1	A0A7G3EWX9
Biossíntese de Arginina	Alanine transaminase AlaA	1,41	EC 2.6.1.2	A0A7G3EQ17
	Argininosuccinate lyase	2,5	EC 2.3.1.1	A0A7G3F021
	Acetylglutamate kinase	4,29	EC 2.7.2.8	A0A7G3F1L2
	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	2,74	EC 1.2.1.38	A0A7G3EY70
	Aspartate aminotransferase family protein	5,18	EC2.6.1.11	A0A7G3F2P0
	Ornithine carbamoyltransferase	3,55	EC 2.1.3.3	A0A7G3F481
	Argininosuccinate synthase	2,42	EC 6.3.4.5	A0A7G3EYU5
	Argininosuccinate lyase	2,50	EC 4.3.2.1	A0A7G3F021
CTE	NuoA - N-succinylarginine dihydrolase	5,59	-	A0A7G3EYH4
	NuoB - NADH-quinone oxidoreductase subunit B	2,17	-	A0A156AQK3
	NuoC - NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	1,40	-	A0A7G3EV61
	NuoF - NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF	2,11	-	A0A094YMR4
	NuoG - NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoG	1,60	-	A0A7G3F050
	NuoI - NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoI	1,50	-	A0A7G3EP94
	SDHA - FAD-binding protein	2,71	-	A0A7G3F146
	SdhA - succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	4,09	-	A0A0U1PDU7
	SdhB - succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	3,87	-	A0A7G3EY32
	CydA - cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	2,41	-	A0A157IR73

No presente trabalho, também foi constatado aumento na regulação de oito proteínas da via metabólica de biossíntese de arginina, sendo uma delas (alanine transaminase AlaA) responsável pela conversão de 2-oxoglutarato (composto intermediário do TCA) em glutamato e outras quatro envolvidas na via de degradação deste composto para alimentar o ciclo da uréia (Fig. 3 e Tab. 1). Outras três proteínas deste ciclo, também apresentaram regulação positiva para a formação de fumarato. Além disso, ocorreu também elevada expressão de doze proteínas reguladoras do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, destacando-se as proteínas alanine transaminase AlaA, aspartato amônia-liase e succinato semialdeído desidrogenase, responsáveis pela produção de piruvato, fumarato e succinato, respectivamente. Também verificou-se aumento na expressão das proteínas cistationina gama-sintase e metionina sintase envolvidas na biossíntese de cisteína e metionina, respectivamente.

Fig. 3 - Proteínas reguladas positivamente na via de biossíntese da arginina (vermelho).



Os compostos intermediários obtidos por essas vias alternativas podem ser utilizados para reposição no TCA, de modo a fornecer energia para as células (Tribelli e Lopez, 2018). Os aminoácidos e seus derivados também podem ser utilizados como nutrientes ou para complexar metais, principalmente os que possuem grupo carboxilato (-COO) e amina (-NH₂) em sua estrutura (Dalir e Khoshgoftarmanesh, 2014; He et al., 2019). Análise metabólica de *Brassica juncea* identificou aumento na biossíntese dos aminoácidos aspártico,

lisina, arginina e glutamato quando cultivada na presença de Cd, sendo um dos mecanismos adotados para tolerância ao metal (Tan et al., 2021).

A análise proteômica também mostrou regulação positiva de proteínas para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Tab. 1), sendo sete proteínas do complexo I (NADH desidrogenase) e quatro proteínas do complexo II (succinato desidrogenase/fumarato desidrogenase), que são responsáveis pela oxidação do NADH e succinato, respectivamente. A transferência dos prótons e elétrons para a CTE é de suma importância para atender a demanda de ATP nas células expostas ao Cd (Moosavi et al., 2019).

Os dados acima evidenciaram que as proteínas reguladas em resposta ao Cd estão relacionadas ao efluxo do metal, defesas antioxidantes, imobilização por metaloproteína e aumento do metabolismo energético para contornar os possíveis efeitos deletérios do metal. Em conjunto, esses mecanismos ativamente regulados foram importantes para a sobrevivência e elevada atividade celular de *E. cloacae* UENF P7 quando cultivada na presença do Cd.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho comprovaram a resistência de *E. cloacae* UENF P7 ao cádmio e sua capacidade de crescer em meio com alta concentração do metal, produzindo concentrações celulares superiores às obtidas em meio controle. A biomassa também demonstrou capacidade de remover eficientemente o Cd do meio de cultivo. Por meio de análise proteômica, foi possível explicitar alguns dos mecanismos envolvidos na desintoxicação de cádmio para aliviar o estresse causado sobre o crescimento da bactéria e permitir o acúmulo do metal. Foram identificadas proteínas reguladas positivamente durante o cultivo na presença de Cd, as quais estão atreladas a processos de extrusão do metal, à imobilização por metaloproteínas e à defesa antioxidante. Várias outras proteínas relacionadas ao metabolismo energético e ao metabolismo de aminoácidos também mostraram regulação positiva, o que é coerente com as altas concentrações celulares observadas. Os resultados abrem caminho para uma maior compreensão da habilidade de *E. cloacae* UENF P7 em resistir a concentrações tão elevadas de Cd e podem contribuir para uma futura aplicação da bactéria em processo de biorremediação deste metal tóxico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H.A., Abdul Khalil, H.P.S., 2018. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 243–262.
- Abbas, S Z, Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H.A., Khalil, H.P.S.A., 2018. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 243–262.
- Aitio, A., Tritscher, A., 2004. Effects on health of cadmium- WHO approaches and conclusions. *BioMetals* 17, 491.
- Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., Kaliannan, T., 2014. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecol. Eng.* 71, 728–735.
- Banerjee, G., Pandey, S., Ray, A.K., Kumar, R., 2015. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 91.
- Borisov, V.B., Siletsky, S.A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffrè, A., Poole, R.K., 2021. Bacterial Oxidases of the cytochrome bd family: redox enzymes of unique structure, function, and utility as drug targets. *Antioxid. Redox Signal.* 34, 1280–1318.
- CAVALIER-SMITH, T., 2005. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Ann. Bot.* 95, 147–175.
- Chakraborty, J., Das, S., 2014. Characterization and cadmium-resistant gene expression of biofilm-forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 14188–14201.
- Chen, Y., Chao, Y., Li, Y., Lin, Q., Bai, J., Tang, L., Wang, S., Ying, R., Qiu, R., 2016. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp. strain EG16 under cadmium stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1734–1744.
- Chuanboon, K., Na Nakorn, P., Pannengpetch, S., Laengsri, V., Nuchnoi, P., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Isarankura-Na-Ayudhya, P., 2019. Proteomics and bioinformatics analysis reveal potential roles of cadmium-binding proteins in cadmium tolerance and accumulation of *Enterobacter cloacae*. *PeerJ* 7, e6904.
- Dalir, N., Khoshgoftarmanesh, A.H., 2014. Symplastic and apoplastic uptake and root to shoot translocation of nickel in wheat as affected by exogenous amino acids. *J. Plant Physiol.* 171, 531–536.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52–54.
- Das, S., Dash, H.R., Chakraborty, J., 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2967–2984.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., Tenzer, S., 2014. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent

- acquisition proteomics. *Nat. Methods* 11, 167–170.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Tenzer, S., 2016. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat. Protoc.* 11, 795–812.
- El-Meihy, R.M., Abou-Aly, H.E., Tewfike, T.A., El-Alkshar, E.A., Youssef, A.M., 2019. Characterization and identification of cadmium-tolerant bacteria isolated from contaminated regions in Egypt. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101299.
- Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109–119.
- Han, H., Zhang, H., Qin, S., Zhang, J., Yao, L., Chen, Z., Yang, J., 2021. Mechanisms of *Enterobacter bugandensis* TJ6 immobilization of heavy metals and inhibition of Cd and Pb uptake by wheat based on metabolomics and proteomics. *Chemosphere* 276, 130157.
- Heidari, P., Sanaeizade, S., Mazloomi, F., 2020. Removal of nickel, copper, lead and cadmium by new strains of *Sphingomonas melonis* e8 and *Enterobacter hormaechei* WW28. *ournal Appl. Biotechnol. Reports* 7, 208–214.
- Helbig, K., Grosse, C., Nies, D.H., 2008. Cadmium toxicity in *Glutathione* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 5439–5454.
- Hernandez-Valladares, M., Aasebø, E., Mjaavatten, O., Vaudel, M., Bruserud, Ø., Berven, F., Selheim, F., 2016. Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *Biol. Proced. Online* 18, 13.
- Huang, F., Guo, C.-L., Lu, G.-N., Yi, X.-Y., Zhu, L.-D., Dang, Z., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere* 109, 134–142.
- Ismael, M.A., Elyamine, A.M., Moussa, M.G., Cai, M., Zhao, X., Hu, C., 2019. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics* 11, 255–277.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., Jones, O.A.H., 2013. An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 126, 355–364.
- Kaakoush, N.O., Raftery, M., Mendz, G.L., 2008. Molecular responses of *Campylobacter jejuni* to cadmium stress. *FEBS J.* 275, 5021–5033.
- Karaman, M., Temel, Y., Bayindir, S., 2020. Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *J. Mol. Struct.* 1220, 128700.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294.
- Kumar, A., Rai, L.C., 2015. Proteomic and biochemical basis for enhanced growth yield of *Enterobacter* sp. LCR1 on insoluble phosphate medium. *Microbiol. Res.* 170, 195–204.
- Li, F., Wang, W., Li, C., Zhu, R., Ge, F., Zheng, Y., Tang, Y., 2018. Self-mediated pH changes in culture medium affecting biosorption and biomineralization of Cd²⁺ by *Bacillus cereus* Cd01. *J. Hazard. Mater.* 358,

- 178–186.
- Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C., 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 322–330.
- Lindsay, H., 1973. A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3, 5-dinitrosalicylic acid. *Potato Res.* 16, 176–179.
- Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M.-A., van Endert, P., Edelman, A., Guerrero, I.C., 2016. Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 16, 1852–1857.
- Liu, Z., Yu, W., Nomura, C.T., Li, J., Chen, S., Yang, Y., Wang, Q., 2018. Increased flux through the TCA cycle enhances bacitracin production by *Bacillus licheniformis* DW2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 6935–6946.
- López, M., Quitian, L.-V., Calderón, M.-N., Soto, C.-Y., 2018. The P-type ATPase CtpG preferentially transports Cd²⁺ across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Arch. Microbiol.* 200, 483–492.
- Luque-Garcia, J.L., Cabezas-Sanchez, P., Camara, C., 2011. Proteomics as a tool for examining the toxicity of heavy metals. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 703–716.
- Moosavi, B., Berry, E.A., Zhu, X.-L., Yang, W.-C., Yang, G.-F., 2019. The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 4023–4042.
- Nanjo, Y., Skultety, L., Uváčková, L., Klubicová, K., Hajduch, M., Komatsu, S., 2012. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *J. Proteome Res.* 11, 372–385.
- Niti, C., Sunita, S., Kamlesh, K., Rakesh, K., 2013. Bioremediation: an emerging technology for remediation of pesticides. *Res. J. Chem. Environ.* 17.
- Oziegbe, O., Oluduro, A.O., Oziegbe, E.J., Ahuekwe, E.F., Olorunsola, S.J., 2021. Assessment of heavy metal bioremediation potential of bacterial isolates from landfill soils. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 3948–3956.
- Poirier, I., Kuhn, L., Demortière, A., Mirvaux, B., Hammann, P., Chicher, J., Caplat, C., Pallud, M., Bertrand, M., 2016. Ability of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to counteract the toxicity of CdSe nanoparticles. *J. Proteomics* 148, 213–227.
- Rahman, A., Nahar, N., Nawani, N.N., Jass, J., Hossain, K., Saud, Z.A., Saha, A.K., Ghosh, S., Olsson, B., Mandal, A., 2015. Bioremediation of hexavalent chromium (VI) by a soil-borne bacterium, *Enterobacter cloacae* B2-DHA. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 50, 1136–1147.
- Requejo, R., Tena, M., 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* 66, 1519–1528.
- Roy, P., Bauman, M.A., Almutairi, H.H., Jayawardhana, W.G., Johnson, N.M., Torelli, A.T., 2018. Comparison of the response of bacterial IscU and SufU to Zn²⁺ and select transition-metal ions. *ACS Chem. Biol.* 13, 591–599.
- Sharma, P., Kumar, S., 2021. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: recent advances. *Bioresour. Technol.* 339, 125589.
- Silva, N.D., 2017. Genômica e Proteômica de *Enterobacter cloacae* UENF P7: uma bactéria resistente a estresse isolada de planta aquática.

- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Sinha, S., Mukherjee, S.K., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1, a possible candidate for cadmium bioremediation. *Brazilian J. Microbiol.* 40, 655–662.
- Sun, R., Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y., 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China. *Environ. Pollut.* 263, 114612.
- Tan, P., Zeng, C., Wan, C., Liu, Zhe, Dong, X., Peng, J., Lin, H., Li, M., Liu, Zhixiang, Yan, M., 2021. Metabolic profiles of *Brassica juncea* roots in response to cadmium stress. *Metabolites* 11, 383.
- Tribelli, P., López, N., 2018. Reporting key features in cold-adapted bacteria. *Life* 8, 8.
- Wang, X., Zhang, X., Liu, X., Huang, Z., Niu, S., Xu, T., Zeng, J., Li, H., Wang, T., Gao, Y., Huang, M., Cao, L., Zhu, Y., 2019. Physiological, biochemical and proteomic insight into integrated strategies of an endophytic bacterium *Burkholderia cenocepacia* strain YG-3 response to cadmium stress. *Metallomics* 11, 1252–1264.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359–362.
- Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W., Lu, D., 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU. *Chemosphere* 173, 622–629.
- Zhang, Junhui, Li, Q., Zeng, Y., Zhang, Jian, Lu, G., Dang, Z., Guo, C., 2019. Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition and mechanism analysis at proteome level. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 176, 162–169.
- Zhou, W., Wang, J., Shen, B., Hou, W., Zhang, Y., 2009. Biosorption of copper(II) and cadmium(II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 72, 295–302.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de bactérias resistente ao Cd em processo de biorremediação é uma alternativa para tratar rejeitos industriais e recuperar áreas contaminadas com tal metal. Dessa forma, no presente trabalho foi explorado a resposta molecular, celular e fisiológica de *E. cloacae* UENF P7 ao Cd.

Os resultados mostraram que a cepa estudada apresenta elevada resistência a metais (CIM: 470 mg L⁻¹ Co, 1.200 mg L⁻¹ Cu, 1.600 mg L⁻¹ Fe e 8.000 mg L⁻¹ Cd), especialmente Cd, sendo evidenciado em ensaios de cinética de crescimento na presença do cátion divalente. A bactéria apresentou alta concentração de células durante o cultivo em meios contendo 70 e 140 mg L⁻¹ Cd. Em comparação ao controle, foram verificadas mudanças morfológicas quando exposta ao metal, como redução de tamanho, aumento de diâmetro e aumento de electrón-densidade no compartimento celular.

Na presença da menor concentração de Cd testada (22,5 mg L⁻¹), *E. cloacae* UENF P7 teve alta demanda de nutrientes essenciais, o que pode ser uma adaptação do metabolismo bacteriano para contornar o estresse ocasionado por Cd. Somado a isso, em todas as concentrações de Cd avaliadas, a cepa apresentou capacidade de remover elevada quantidade do metal do meio de cultivo.

A análise proteômica evidenciou os mecanismos adotados por *E. cloacae* UENF P7 para aliviar o estresse causado sobre o crescimento da bactéria e permitir a remoção do metal. Foram identificadas proteínas reguladas positivamente durante o cultivo na presença de Cd atreladas a extrusão do metal, a imobilização por metaloproteínas e a defesa antioxidante. Proteínas relacionadas ao metabolismo energético e ao metabolismo de aminoácidos também tiveram regulação positiva, o que é coerente com as altas concentrações celulares observadas.

O presente trabalho constitui o primeiro relato sobre a capacidade de uma espécie bacteriana produzir elevadas concentrações de células em meios contendo altas concentrações de Cd. Embora ainda sejam necessárias pesquisas no sentido de desafiar a bactéria com concentrações mais elevadas do metal, avaliar a atividade de metalotioneínas, ensaio de difração de raio-x e estudar os níveis de EROs nesta condição, já é possível vislumbrar uma

aplicação biotecnológica. Por ser uma cepa altamente resistente a Cd, no futuro espera-se empregá-la para o tratamento de efluentes industriais contaminados com este metal.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

CAPÍTULO 3 - Tabelas Suplementares

Tab. S1 - Proteínas reguladas positivamente (222) identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 cultivadas na presença de 70 mg L⁻¹, em comparação com o controle (sem adição de Cd).

Accession	Protein name	Sequence coverage	Fold change
A0A267WB28	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	80,46	3,50
A0A157HLE3	16S rRNA (cytosine(1402)-N(4))-methyltransferase RsmH	25,56	1,39
A0A157GPI3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	37,96	1,32
A0A7G3EWX9	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	61,72	3,21
A0A7G3ESF4	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	44,84	2,04
A0A7G3F558	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase	82,03	1,13
A0A7G3ERY5	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	27,47	1,27
A0A7G3EZG1	4-aminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	18,05	1,01
A0A7G3EV08	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	17,95	0,80
A0A7G3EZ06	4'-phosphopantetheinyl transferase AcpT	14,72	2,80
A0A094XHP3	50S ribosomal protein L14	62,60	0,79
A0A7G3EZG3	50S ribosomal protein L25	72,34	0,77
A0A0P8J8J7	50S ribosomal protein L31	65,71	2,19
A0A7G3ETW8	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	56,20	2,84

A0A7G3EUS7	ABC transporter ATP-binding protein	77,74	1,28
A0A7G3EZ60	ABC transporter substrate-binding protein	26,53	1,42
A0A267WCS9	ABC transporter substrate-binding protein	83,93	2,44
A0A7G3EZY7	ABC transporter substrate-binding protein	42,37	1,62
A0A7G3EY84	Acetolactate synthase 3 large subunit	23,52	0,92
A0A7G3F1L2	Acetylglutamate kinase	34,88	4,29
A0A7G3EYN1	AChain A, Cyclic AMP-AMP-GMP synthase	18,37	1,15
A0A7G3ELH1	Acid phosphatase AphA	32,66	1,00
A0A7G3ET73	Aconitate hydratase AcnA	32,01	1,92
A0A7G3EZ28	Aconitate hydratase AcnA	21,46	2,09
A0A7G3ER70	Aconitate hydratase B	89,05	2,25
A0A7G3EMF4	ACT domain-containing protein	50,00	0,64
A0A4Q4AG46	ADP-forming succinate-CoA ligase subunit beta	76,55	2,15
A0A7G3EQ17	Alanine transaminase AlaA	48,25	1,41
A0A157MLC1	Aldehyde dehydrogenase	49,22	3,56
A0A0P8MRJ7	Aldehyde dehydrogenase	18,83	2,49
A0A7G3F527	Alkene reductase	50,82	1,05
A0A7G3F496	Alpha,alpha-phosphotrehalase	40,29	2,68
A0A267WBH6	Alpha/beta hydrolase YcfP	62,22	3,84
A0A7H9JXV7	Amidophosphoribosyltransferase	76,24	0,65
A0A7G3ENY7	Arginine ABC transporter substrate-binding protein	74,49	4,67

A0A7G3F021	Argininosuccinate lyase	52,52	2,50
A0A7G3EYU5	Argininosuccinate synthase	9,92	2,42
A0A157LVF8	AsmA family protein	17,79	1,33
A0A7H9JRQ6	Asparagine synthase B	82,13	3,16
A0A7G3F2P0	Aspartate aminotransferase family protein	64,72	5,18
A0A7G3EUD5	Aspartate ammonia-lyase	63,81	1,17
A0A7G3ELX0	Assimilatory sulfite reductase (NADPH) hemoprotein subunit	60,92	3,83
A0A7G3ERQ2	Assimilatory sulfite reductase (NADPH) hemoprotein subunit	29,18	2,79
A0A7G3ESZ0	ATP-dependent RNA helicase RhlB	43,13	1,59
A0A7G3EXI9	Bifunctional 2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase	54,40	1,25
A0A7G3ETV3	Bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase	72,10	2,72
A0A7G3EXZ4	Bifunctional histidinol-phosphatase/imidazoleglycerol-phosphate dehydratase HisB	25,92	1,58
A0A7G3ET30	Bifunctional UDP-sugar hydrolase/5'-nucleotidase	62,85	2,61
A0A7G3ETB4	Bifunctional UDP-sugar hydrolase/5'-nucleotidase	58,44	2,25
A0A0A6EWH5	Catabolite repressor/activator	48,20	3,06
A0A7G3EYT9	Catalase HPII	50,47	3,74
A0A7G3EUB4	Catalase/oxidase HPI	47,25	1,88
A0A7G3EZE5	Cell division protein DamX	50,26	1,06
A0A157JRY2	Class 1 fructose-bisphosphatase	54,22	1,41
A0A7G3EPT5	Cystathionine gamma-synthase	46,45	2,91

A0A7G3EPR9	Cysteine desulfurase	51,14	1,07
A0A7G3EQ51	Cysteine desulfurase	53,51	1,39
A0A7G3F3I3	Cysteine--tRNA ligase	15,84	0,65
A0A1571R73	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	20,69	2,41
A0A7G3EN52	D-amino acid dehydrogenase	64,84	2,14
A0A7G3EU09	D-amino acid dehydrogenase	95,18	2,55
A0A7G3ESR7	D-amino acid dehydrogenase	40,48	2,42
A0A2U9M5A9	DeoR/GlpR transcriptional regulator	15,79	1,96
A0A7G3EZ75	DgsA anti-repressor MtfA	14,34	2,44
A0A7G3F2L6	DUF1852 domain-containing protein	40,74	4,45
A0A7G3F3W5	DUF2891 domain-containing protein	33,84	1,72
A0A7G3EV27	DUF3313 domain-containing protein	77,68	0,77
A0A0W1YLX6	Envelope stress response regulator transcription factor CpxR	40,95	1,38
A0A7G3F146	FAD-binding protein	55,60	2,71
Q84EY5	Ferric iron uptake transcriptional regulator	73,65	3,00
A0A0M2G5L3	Fe-S cluster assembly scaffold IscU	77,34	0,76
A0A7G3F4C4	FGGY family pentulose kinase	38,88	1,66
A0A7G3EQ32	Flavodoxin-dependent (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	61,05	0,66
A0A7G3EV12	FMN-dependent L-lactate dehydrogenase LldD	67,85	1,72
A0A7G3EV69	Fructosamine kinase family protein	12,24	2,61
A0A7G3EMW3	Fumarate hydratase	84,44	1,23

A0A7G3EXW7	Fumarate hydratase	67,96	2,57
A0A7G3F3Z6	Fumarate hydratase	80,65	2,61
A0A7G3EW52	Galactokinase	38,66	0,94
A0A7G3EMZ5	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	25,93	0,90
A0A156IZN1	Gluconokinase	65,71	0,92
A0A7G3EVI0	Glutamate synthase large subunit	20,82	1,27
A0A7G3EMT5	Glutamate synthase large subunit	23,66	1,34
A0A0A6GK07	Glutamate--ammonia ligase	85,93	0,94
A0A7G3ER00	Glycerol dehydrogenase	41,99	2,03
A0A7G3EVJ1	Glycerol kinase GlpK	34,26	1,98
A0A7G3ET00	Glycine betaine/L-proline ABC transporter substrate-binding protein ProX	31,16	1,38
A0A176X130	Glycine cleavage system protein GcvH	58,91	2,14
A0A7G3F2R4	Glycogen synthase GlgA	27,25	0,82
A0A7G3F4Y8	GTP cyclohydrolase I FoIE	63,51	1,19
A0A267W764	GTPase Era	16,28	1,13
A0A0A6F1X0	Histidine transport ATP-binding protein HisP	39,69	0,99
A0A7G3F0P7	Isochorismatase family protein	81,98	1,22
A0A7G3ETD9	Leu/Ile/Val-binding protein	57,38	0,81
A0A7G3F0Y7	Lipoprotein NlpA	54,14	1,26
A0A7G3ER46	Long-chain fatty acid transporter FadL	78,92	0,60
A0A7G3EZH0	L-threonine 3-dehydrogenase	83,63	0,70

A0A7G3ERM2	Lysine/arginine/ornithine ABC transporter substrate-binding protein ArgT	68,33	2,50
A0A7G3ERP4	Malate dehydrogenase	98,51	1,01
A0A7G3EPI9	Malate dehydrogenase	85,88	1,02
A0A7G3EWZ1	Maltoporin	70,51	7,88
A0A157M4G1	Maltose/maltodextrin ABC transporter ATP-binding protein Malk	26,83	3,12
A0A7G3EUV4	Maltose/maltodextrin ABC transporter substrate-binding protein MalE	71,12	3,57
A0A7G3EXI5	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	50,79	1,09
A0A7H9JV18	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase	23,01	1,06
A0A7G3F1M1	MBL fold metallo-hydrolase	42,08	1,34
A0A7G3EZ51	Membrane protein	15,20	0,71
A0A7G3F254	Methionine synthase	47,66	2,39
A0A7G3EXS4	Multicopper oxidase CueO	27,04	0,99
A0A7G3ER68	Murein tripeptide/oligopeptide ABC transporter ATP binding protein OppF	36,94	3,09
A0A7G3EY70	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	35,33	2,74
A0A7G3EXG7	N-acetyltransferase	17,96	1,39
A0A7G3ERY9	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	80,06	1,04
A0A7G3EU48	NADH:ubiquinone reductase (Na(+)-transporting) subunit F	15,97	0,60
A0A156AQK3	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	31,25	2,17
A0A7G3EV61	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	45,02	1,40
A0A7G3ETG1	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	60,38	1,11

A0A0A5QUB6	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoA	17,12	1,74
A0A094YMR4	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF	62,92	2,11
A0A7G3F050	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoG	68,98	1,60
A0A7G3EP94	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoI	41,92	1,50
A0A7G3EZF8	NADP-dependent oxaloacetate-decarboxylating malate dehydrogenase	68,51	4,28
A0A7G3EPX6	Nitrogen regulation protein NR(I)	39,19	2,79
A0A7G3EYH4	N-succinylarginine dihydrolase	75,28	5,59
A0A7G3EX17	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein OppA	83,22	1,17
A0A7G3EMX2	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein OppA	69,39	1,52
A0A7G3EV04	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein OppA	66,17	3,07
A0A7G3EPH3	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein OppA	87,41	3,63
A0A7G3F481	Ornithine carbamoyltransferase	33,83	3,55
A0A157DMR8	OsmC family protein	48,59	2,01
A0A7G3EMX5	Outer membrane protein OmpW	83,61	2,11
A0A7G3EVJ6	Oxidoreductase	28,18	1,05
A0A7G3EMG4	Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase MsrB	57,61	2,41
A0A267WB26	Phosphate response regulator transcription factor PhoB	30,13	1,52
A0A7G3EXL9	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	71,00	3,70
A0A7G3EZ48	PhzF family phenazine biosynthesis protein	38,15	0,72
A0A7G3ER39	P-II family nitrogen regulator	60,32	4,13

A0A7G3EZN1	Protein CreA	76,86	0,86
A0A7G3EZ30	Protein kinase YeaG	45,65	1,82
A0A7G3EUF2	PTS mannose transporter subunit IIAB	74,84	1,38
A0A0M2G5B4	Ribose ABC transporter substrate-binding protein RbsB	45,61	2,73
A0A7G3EXQ0	Ribosome recycling factor	69,73	0,73
A0A0M2GBF0	Ribosome-associated translation inhibitor RaiA	47,79	1,46
A0A7G3ENE4	Ribulose-phosphate 3-epimerase	87,96	0,69
A0A330GBY9	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	66,89	1,33
A0A7G3F0M7	RpiB/LacA/LacB family sugar-phosphate isomerase	15,51	1,27
A0A7G3EWW4	SAVED domain-containing protein	10,72	1,27
A0A7G3EXK3	SDR family oxidoreductase	84,82	1,48
A0A7G3F0A9	SDR family oxidoreductase	58,26	5,40
A0A7G3EU03	Signal recognition particle protein	55,88	1,54
A0A7G3EZX0	SIR2 family protein	15,63	2,01
A0A4Q4A8U8	Si-specific NAD(P)(+) transhydrogenase	62,45	2,11
A0A7G3EYA5	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein PotF	53,24	4,43
A0A0U1PDU7	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	75,85	4,09
A0A7G3EY32	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	61,76	3,87
A0A7G3F1G8	Succinate--CoA ligase subunit alpha	91,58	1,86
A0A7G3F163	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	52,08	1,51

A0A7G3ETU4	Succinylglutamate-semialdehyde dehydrogenase	53,33	0,88
A0A7G3EWH8	Sugar kinase	27,18	0,96
A0A0A6GRK8	Sulfate ABC transporter substrate-binding protein	43,77	1,92
A0A7G3EZD0	Thymidylate synthase	51,52	0,88
A0A094XPE7	Transcription termination/antitermination protein NusG	66,30	1,61
A0A2U9LZ61	Transcription termination/antitermination protein NusG	54,35	1,88
A0A7G3ET24	Trifunctional transcriptional regulator/proline dehydrogenase/L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	62,12	4,42
A0A7G3EUC8	Trifunctional transcriptional regulator/proline dehydrogenase/L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	38,67	2,99
A0A7G3EST2	tRNA 5-hydroxyuridine modification protein YegQ	11,04	1,18
A0A7G3F2G4	Two-component system response regulator OmpR	34,73	0,96
A0A7G3ET54	Uncharacterised protein	51,15	1,59
A0A4V1VAR0	Uncharacterised protein	65,83	0,99

Tab. S2 - Proteínas reguladas negativamente (169) identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 cultivadas na presença de 70 mg L⁻¹, em comparação com o controle (sem adição de Cd).

Accession	Protein name	Sequence coverage	Fold change
A0A7G3ESB9	(2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate synthase	36,58	-3,16
A0A157HKM9	16S rRNA (adenine(1518)-N(6)/adenine(1519)-N(6))-dimethyltransferase RsmA	48,35	-0,82
A0A7G3EVM4	16S rRNA (guanine(1516)-N(2))-methyltransferase RsmJ	12,88	-1,52
A0A7G3EWU9	16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase RsmG	45,89	-1,25
A0A7G3EYV0	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	29,60	-4,67

A0A4Q4A7C7	23S rRNA (adenine(2030)-N(6))-methyltransferase RImJ	71,07	-1,77
A0A7G3EXE5	23S rRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RImB	44,03	-1,53
A0A094YAE5	30S ribosomal protein S7	58,33	-0,79
A0A7G3EPT4	30S ribosomal protein S9	52,78	-1,10
A0A7G3EWW2	30S ribosomal protein S9	25,38	-1,12
A0A7G3EZF7	3-deoxy-8-phosphooctulonate synthase	96,34	-0,62
A0A7G3F3Q8	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	25,00	-2,01
A0A7G3ESZ1	50S ribosomal protein L11 methyltransferase	55,60	-0,61
A0A094XG80	50S ribosomal protein L2	51,28	-0,65
A0A094XFG4	50S ribosomal protein L4	54,73	-0,62
A0A0U1PH05	50S ribosomal protein L7/L12	88,43	-0,80
A0A7G3EYQ9	5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase YigB	34,45	-1,40
A0A2U9M2K4	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	81,47	-1,01
A0A4Q4A948	6-phosphofructokinase	59,06	-1,24
A0A157H4J4	7-carboxy-7-deazaguanine synthase QueE	20,63	-1,74
A0A7G3EZK8	7-cyano-7-deazaguanine synthase QueC	30,74	-0,79
A0A7G3EQI8	AAA family ATPase	76,84	-0,79
A0A7G3EWU7	ABC-F family ATPase	43,31	-0,80
A0A267W8S3	Acetate kinase	79,50	-1,17
A0A7G3ETI7	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein	92,23	-0,97
A0A7G3ER17	ACP S-malonyltransferase	84,79	-0,92
A0A094X0I1	Adenine phosphoribosyltransferase	46,45	-1,33
A0A7G3F3P9	Adenosine deaminase	70,48	-0,96
A0A7G3EYN8	ADP-glyceromanno-heptose 6-epimerase	85,78	-0,99
A0A7G3F1H6	Aerobactin synthase lucA	46,21	-2,12
A0A7G3F368	Aerobactin synthase lucC	39,83	-4,70
A0A7G3EMK2	Alanine racemase	27,48	-0,95
A0A7G3ETH2	Aldo/keto reductase	8,28	-1,29

A0A157FPD2	Alkene reductase	38,08	-2,00
A0A7G3EPA9	Alpha-acetolactate decarboxylase	70,66	-1,09
A0A157FVM0	Ammonia-dependent NAD(+) synthetase	85,82	-1,06
A0A7G3F435	Aspartate aminotransferase family protein	21,37	-1,56
A0A7G3EP42	ATP-dependent Clp endopeptidase proteolytic subunit ClpP	60,47	-1,17
A0A0F1QD95	ATP-dependent protease subunit HslV	25,00	-1,09
A0A7G3F1Y3	ATP-dependent RNA helicase DbpA	57,99	-0,68
A0A7G3F3F3	Autoinducer 2 ABC transporter ATP-binding protein LsrA	25,05	-1,75
A0A7G3EQF2	Beta-aspartyl-peptidase	38,59	-0,69
A0A7G3EU18	Beta-ketoacyl-ACP synthase I	73,09	-0,61
A0A7G3EV57	Bifunctional biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase/biotin operon repressor BirA	25,00	-0,64
A0A7G3EXV9	Bifunctional D-glycero-beta-D-manno-heptose-7-phosphate kinase/D-glycero-beta-D-manno-heptose 1-phosphate adenyltransferase HldE	57,35	-0,64
A0A0A6GN66	Bifunctional NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase/3-hydroxypropionate dehydrogenase YdfG	83,06	-0,69
A0A7G3EZ32	Bifunctional UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose formyltransferase/UDP-glucuronic acid oxidase ArnA	42,73	-3,17
A0A7G3EXH8	Carbonic anhydrase	59,72	-0,63
A0A7G3ETF5	Carboxypeptidase M32	21,55	-0,84
A0A7G3EV28	Carboxypeptidase M32	55,56	-0,83
A0A7G3EZQ1	Chemoreceptor protein	16,76	-0,79
A0A7G3ENT3	Chemotaxis protein CheA	33,10	-1,72
A0A7G3ERH6	Chemotaxis protein CheA	19,79	-1,97
A0A7G3ESA1	Chemotaxis protein CheW	43,11	-1,67
A0A0A6IHR0	Chemotaxis protein CheY	84,50	-1,35
A0A7G3ESJ2	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	38,05	-2,01
A0A7G3EZM7	Class II fumarate hydratase	54,09	-1,36

A0A179PJP2	CoA-binding protein	45,99	-2,10
A0A267WG74	Co-chaperone YbbN	52,82	-1,07
A0A267W5A4	Cold-shock protein	81,01	-0,95
A0A7G3EXZ7	Conjugal transfer protein TraF	22,98	-1,41
A0A7G3EZI7	Cupin domain-containing protein	32,17	-1,06
A0A7G3EZ61	Cysteine synthase CysM	30,03	-1,06
A0A7G3F211	D-alanine--D-alanine ligase	67,97	-0,73
A0A7H9JQ96	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase dacA	74,19	-0,94
A0A7G3EP88	Deferrochelataase/peroxidase EfeB	24,66	-2,41
A0A7G3F2P2	Deoxyribonuclease IV	17,54	-1,52
A0A7G3ESS2	Deoxyribose-phosphate aldolase	50,66	-1,39
A0A7G3EZ36	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	71,62	-0,83
A0A7G3EXW5	Dihydroorotase	68,30	-1,04
A0A7G3F196	Dihydropteroate synthase	64,54	-1,35
A0A7G3EUX6	DNA mismatch repair protein MutS	32,81	-0,62
A0A7G3ERE1	DNA-binding ATP-dependent protease La	62,65	-0,94
A0A7G3EST1	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	33,33	-0,98
A0A7G3EPK8	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	98,57	-0,73
A0A7G3EVN4	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	34,29	-0,88
A0A7G3ET74	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	38,87	-0,88
A0A7G3F1J4	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	33,48	-1,23
A0A7G3EW12	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	39,53	-1,01
A0A7G3ET13	DUF1795 domain-containing protein	22,60	-0,72
A0A7G3EZX6	DUF2884 domain-containing protein	47,90	-0,71
A0A7G3F5A8	dUTP diphosphatase	49,67	-1,35
A0A7G3EZY0	Elongation factor Ts	90,81	-1,08
A0A7G3EVV0	Endopeptidase La	21,46	-0,98
A0A7G3EMT2	Envelope stress response activation lipoprotein NlpE	63,44	-1,51

A0A7G3EUS3	Fe ²⁺ -enterobactin ABC transporter substrate-binding protein	55,17	-4,31
A0A7G3EUB7	Ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE	47,68	-4,08
A0A330GQB1	Fe-S biogenesis protein NfuA	56,02	-0,78
A0A094Y5Q2	Flagellar basal body L-ring protein FlgH	10,78	-1,53
A0A7G3ETE8	Flagellar hook protein FlgE	64,93	-1,95
A0A7G3F043	Flagellin FliC	98,16	-0,82
A0A7G3EX74	FliC/FliJ family flagellin	96,54	-1,20
A0A270US74	FMN-binding protein MioC	51,68	-0,95
A0A157L4R7	Fructose-1-phosphate/6-phosphogluconate phosphatase	35,11	-1,36
A0A7G3ES77	Galactose-1-epimerase	20,17	-0,79
A0A7G3EVW1	GalU regulator GalF	35,94	-1,85
A0A7G3ES30	GalU regulator GalF	18,54	-0,94
A0A7G3ER27	Glucose/quininate/shikimate family membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase	21,90	-0,69
A0A7G3F2Q7	Glutamine ABC transporter ATP-binding protein GlnQ	69,52	-1,00
A0A7G3EP46	Glutathione reductase	79,13	-0,67
A0A7G3F3C9	Glutathione synthase	72,38	-1,21
A0A7G3EZ67	Hematin-forming heme oxygenase ChuS	71,35	-5,32
A0A7G3EMD6	Hydrolase	66,67	-1,78
A0A157HP29	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	47,19	-2,25
A0A0M2G9Q8	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	48,84	-1,55
A0A267WI06	Inorganic diphosphatase	87,50	-1,11
A0A7G3ET38	Insulinase family protein	61,90	-0,69
A0A7G3EQS6	Iron uptake system protein EfeO	73,91	-1,41
A0A7G3ERE5	Iron/manganese ABC transporter ATP-binding protein SitB	50,19	-3,87
A0A7G3EX53	Isochorismate synthase EntC	69,00	-5,59
A0A7G3EUD9	Ketoacyl-ACP synthase III	64,66	-0,66
A0A7G3EWJ4	Ketol-acid reductoisomerase	86,49	-1,82
A0A7G3ENU6	Ketol-acid reductoisomerase	74,94	-1,64
A0A157FPF2	Lactoylglutathione lyase	37,78	-0,89
A0A7G3ETV4	Leucyl aminopeptidase	55,56	-0,71

A0A7G3F1A0	Ligand-gated channel protein	70,50	-6,32
A0A7G3F291	Lipoprotein	53,28	-1,05
A0A7G3ESV5	Low-specificity L-threonine aldolase	36,05	-0,78
A0A7G3EXW3	LPS O-antigen chain length determinant protein WzzB	48,77	-0,84
A0A4Q4A5K6	MBL fold metallo-hydrolase	53,26	-1,34
A0A7G3EQD3	Metal ABC transporter substrate-binding protein	90,73	-5,71
A0A7G3ES83	Metalloprotease TldD	70,82	-0,64
A0A7G3EWR4	Methyl-accepting chemotaxis protein	52,89	-2,20
A0A7G3F1K6	Methyl-accepting chemotaxis protein II	50,70	-1,88
A0A7G3ES00	Molybdate ABC transporter ATP-binding protein ModF	27,55	-1,65
A0A7G3EQJ4	Multidrug efflux MFS transporter periplasmic adaptor subunit EmrA	52,50	-1,44
A0A7G3EPU7	Multidrug efflux MFS transporter periplasmic adaptor subunit EmrA	31,58	-1,28
A0A7G3ETD3	NAD(P)H nitroreductase	88,52	-1,45
A0A0A6H5Q2	NAD(P)H-dependent oxidoreductase	92,02	-0,93
A0A7G3EZM6	NAD(P)H-dependent oxidoreductase	36,79	-0,63
A0A7G3EXQ6	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	59,00	-0,67
A0A6B9XYP0	NADP-dependent phosphogluconate dehydrogenase	95,09	-0,89
A0A7G3ERL3	Nicotinamide-nucleotide amidase	51,06	-0,77
A0A0A5RFZ2	Nucleoside diphosphate kinase regulator	73,53	-1,23
A0A0P8L7I3	Nucleoside-diphosphate kinase	55,94	-0,96
A0A7G3ETN5	Nucleoside-specific channel-forming protein Tsx	51,02	-0,69
A0A7G3EMS9	Nucleotide 5'-monophosphate nucleosidase	64,29	-1,46
A0A7G3F067	Nucleotide 5'-monophosphate nucleosidase PpnN	82,61	-1,20
A0A7G3EMB5	Nucleotide exchange factor GrpE	75,66	-0,83
A0A7G3ENT7	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	29,76	-2,08
A0A7G3EUW3	Outer membrane lipid asymmetry maintenance protein MlaD	44,51	-1,68
A0A7G3ETT7	Outer membrane protein assembly factor BamC	72,09	-0,84
A0A7G3F186	Outer membrane protein assembly factor BamD	13,47	-1,27
A0A7G3ETB0	Outer membrane receptor protein	61,46	-5,00

A0A7G3EWW3	ParA family protein	57,49	-1,03
A0A7G3EQP1	Penicillin-binding protein activator	33,52	-0,75
A0A7G3EQB5	Penicillin-binding protein activator	83,78	-1,29
A0A7G3F1W4	Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase MsrA	51,17	-1,05
A0A7G3ERK2	Peptidylprolyl isomerase	51,38	-1,49
A0A7G3EYJ6	Periplasmic protein	61,65	-6,21
A0A0A6GRF4	Peroxiredoxin C	84,50	-0,61
A0A157G4I5	Phosphatase	70,61	-1,25
A0A7G3EQX9	Phosphate acetyltransferase	71,20	-0,69
A0A7G3EW77	Phosphatidylserine decarboxylase	34,16	-0,99
A0A7G3EQ06	Phosphodiesterase	38,27	-1,46
A0A7H9JZY4	Phosphoglycolate phosphatase	70,75	-0,92
A0A157KLX9	Phosphoribulokinase	16,61	-2,11
A0A7G3EZV2	Porin	81,22	-3,27
A0A0P8LCL3	Preprotein translocase subunit SecG	52,73	-0,91
A0A7G3ERM3	Proline--tRNA ligase	94,86	-0,75
A0A7G3ETP4	Proline--tRNA ligase	56,27	-0,88
A0A7G3EX69	Protein kinase	48,75	-0,93
A0A7G3EUL4	Pyridoxal phosphatase	24,32	-1,16
A0A7G3ETI1	Quinone oxidoreductase	49,85	-1,11
A0A7G3EK12	Recombinase A	46,88	-0,88
A0A7G3EN31	Riboflavin synthase	100,00	-0,81
A0A7G3ER49	Ribonuclease D	16,40	-1,29
A0A7G3EX49	Ribonuclease T	32,06	-0,71
A0A7G3ESP6	Ribosome maturation factor RimM	47,49	-1,86
A0A7G3ETW1	RNA polymerase-associated protein RapA	5,55	-0,80
A0A7G3F217	SDR family oxidoreductase	31,05	-1,24
A0A7G3EQK5	Serine/threonine protein kinase	33,96	-1,05
A0A7G3F118	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	22,64	-0,64

A0A7G3ERB5	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	75,00	-1,01
A0A7G3EUK1	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase DacD	18,73	-1,83
A0A7G3EX83	S-formylglutathione hydrolase	50,91	-0,93
A0A7G3F1U7	Siderophore-interacting protein	22,83	-3,78
A0A0M3F425	Single-stranded DNA-binding protein SSB1	57,95	-1,35
A0A7G3EUG8	S-ribosylhomocysteine lyase	97,08	-0,80
A0A0A6E9W5	Stringent starvation protein A	70,28	-1,26
A0A7G3EQI4	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	47,62	-0,71
A0A7G3ESR0	Sulfate ABC transporter substrate-binding protein	64,39	-1,08
A0A7G3F0P4	Tar ligand binding domain-containing protein	35,15	-1,81
A0A7G3EV71	TDP-N-acetylfucosamine:lipid II N-acetylfucosaminyltransferase	11,42	-1,01
A0A7G3ETT3	Thiamine ABC transporter substrate binding subunit	15,84	-1,17
A0A157LF04	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	59,90	-1,54
A0A0A6GPP4	Thioredoxin	58,72	-0,64
A0A7G3ERA7	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	64,67	-1,22
A0A2U9M6B6	Tol-pal system-associated acyl-CoA thioesterase	31,69	-2,38
A0A7G3F482	TonB-dependent hemoglobin/transferrin/lactoferrin family receptor	76,36	-4,81
A0A7G3EQT5	TonB-dependent siderophore receptor	19,13	-1,48
A0A7G3F1J1	TonB-dependent siderophore receptor	45,86	-2,35
A0A7G3F122	TonB-dependent siderophore receptor	66,99	-4,12
A0A7G3F0D2	TonB-dependent siderophore receptor	58,61	-5,85
A0A7G3EXS7	TonB-dependent siderophore receptor	59,10	-5,43
A0A7G3F2T5	Transaldolase	91,48	-0,93
A0A157JND8	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex ATPase subunit type 1 TsaE	30,07	-1,03
A0A7G3F0U7	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex transferase subunit TsaD	22,55	-0,91
A0A7G3ERG2	tRNA (cytidine/uridine-2'-O-)-methyltransferase TrmJ	52,58	-1,07
A0A7G3EUY8	tRNA preQ1(34) S-adenosylmethionine ribosyltransferase-isomerase QueA	28,37	-2,11
A0A7G3ESP7	tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl(34) synthesis enzyme MnmG	19,69	-1,31
A0A157IBH8	tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl(34) synthesis GTPase MnmE	8,81	-1,22

A0A7G3F544	tRNA-modifying protein YgfZ	62,58	-0,71
A0A7G3EPN0	Tryptophan synthase subunit alpha	62,83	-1,05
A0A7G3EWP7	Two-component system response regulator PhoP	43,95	-0,79
A0A0F1QPG6	Type 1 fimbrial major subunit FimA	75,40	-0,64
A0A7G3ER13	Type 2 GTP cyclohydrolase I	48,18	-0,76
A0A267WF49	Type B 50S ribosomal protein L31	74,42	-2,95
A0A7G3F510	UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose aminotransferase	65,70	-1,99
A0A7G3EZ88	UDP-glucose 6-dehydrogenase	73,97	-1,12
A0A7G3EZA7	UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase	27,49	-1,01
A0A7G3EQW2	Uncharacterised protein	34,27	-1,01
A0A7G3ESN4	Uncharacterised protein	15,97	-0,93
A0A7G3EYR8	Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	40,05	-1,38
A0A7G3EST3	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase GalU	76,32	-1,28
A0A7G3EVF3	Valine--pyruvate transaminase	29,61	-0,87
A0A7G3F0K0	VOC family protein	25,81	-0,75
A0A7G3EUU4	Xaa-Pro dipeptidase	75,65	-0,84
A0A7G3EZF5	YggS family pyridoxal phosphate-dependent enzyme	15,28	-1,52
A0A7G3F0S0	YncE family protein	82,15	-6,30
A0A7G3F480	YqgE/AlgH family protein	57,53	-1,41
A0A7G3ERP5	Zinc ABC transporter substrate-binding protein ZnuA	68,75	-1,58

Tab. S3 - Proteínas únicas identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 cultivadas na presença de 70 mg L⁻¹ ou controle (sem adição de Cd).

Accession	Protein name	Reported Peptides	Sequence coverage
Unique control proteins (4)			
A0A7G3EQW3	Esterase family protein	4	31,3
A0A7G3EX24	Isochorismatase	10	41,9
A0A7G3EYE6	SidA/lucD/PvdA family monooxygenase	6	16,8
A0A7G3EZQ7	Salmochelin biosynthesis C-glycosyltransferase IroB	6	26,5
Unique treatment proteins (22)			
A0A0A6H9A1	(4S)-4-hydroxy-5-phosphonooxypentane-2,3-dione isomerase	3	52,58
A0A7G3ERT8	30S ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	4	14,29
A0A7G3EXF1	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	5	33,22
A0A7G3F2Z9	ABC transporter ATP-binding protein	3	14,63
A0A7G3EV58	ABC transporter substrate-binding protein	15	55,29
A0A7G3EXH5	Biotin synthase BioB	4	23,12
A0A0A6FH83	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	3	22,25
A0A7G3F0C7	D-allose transporter substrate-binding protein	2	9,32
A0A7G3F1R1	DUF1883 domain-containing protein	3	68,35
A0A7G3EYV4	Fatty acid oxidation complex subunit alpha FadB	3	7,54
A0A0A6EK98	Galactose/methyl galactoside ABC transporter ATP-binding protein MglA	2	7,11
A0A7G3EQD9	Histidine ammonia-lyase	6	30,79
A0A7G3F410	L-fucose isomerase	9	33,78
A0A7G3ES87	Maltoporin	5	53,17

A0A7G3F0X4	N-acetylneuraminate lyase	4	31,65
A0A7G3EVD1	Pyrimidine utilization protein B	5	39,74
A0A7G3EYF9	Pyrimidine utilization protein C	2	51,56
A0A7G3EQK3	Transketolase family protein	2	55
A0A7G3F111	Urea ABC transporter substrate-binding protein	3	21,51
A0A7G3EQB8	Urease subunit alpha	6	24,17
A0A7G3ESS7	Urocanate hydratase	14	58,72
A0A7G3EQ67	Zn(II)/Cd(II)/Pb(II) translocating P-type ATPase ZntA	6	34,67

9. APÊNDICE A

PREMIAÇÕES CIENTÍFICAS E DE INOVAÇÃO

➤ **Melhores Trabalhos na Sessão de Microbiologia Ambiental**, no 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia (2021)

➤ **2º Lugar na Maratona de Inovação: HackAçu** (2021)

Inovador, o projeto “Caiapé - Jardins Flutuantes” obteve o segundo lugar no HackAçu, dentre as 53 soluções apresentadas. A maratona promovida pelo Porto do Açu, complexo portuário no município de São João da Barra, teve como objetivo encontrar ideias que auxiliem no desenvolvimento socioeconômico e sustentável de Campos dos Goytacazes e São João da Barra, ambos municípios do Norte Fluminense. A maratona, que aconteceu no final de outubro de 2021, propôs desafios nas áreas do meio ambiente; pessoas e comunidade e negócios sustentáveis.

O projeto Caiapé – Jardins Flutuantes consegue abranger os aspectos socioambientais e econômicos de forma harmônica, propondo uma solução para remediar corpos hídricos contaminados, controlar o crescimento de plantas aquáticas e transformá-la em um recurso para o processo de compostagem. Uma solução que alia o paisagismo à recuperação ambiental.

Link do Pitch: <https://portodoacu.paniclobster.com/equipe/1>



Equipe:



Entrevistas de divulgação do trabalho:

TV Globo - Inter TV Planície: <https://globoplay.globo.com/v/10139472/>

FAPERJ: <http://www.faperj.br/?id=4393.2.8>

UENF: <https://uenf.br/portal/noticias/pesquisadores-da-uenf-se-destacam-com-projeto-de-jardins-flutuantes/>

NOTICIA 1: <https://noticia1.com.br/porto-do-acu-anuncia-vencedores-de-maratona-de-inovacao-online/>

➤ **Menção Honrosa**, no Congresso Online Internacional de Sustentabilidade: Um olhar sobre os ODS (2020)

➤ **Primeiro Lugar nas Apresentações Orais**, no 9º Simpósio de Gestão Ambiental e Biodiversidade (SIGABI) (2020)

10. APÊNDICE B

CAPÍTULO DE LIVRO SUBMETIDO

Constructed Wetlands: a Sustainable Technology for Wastewater Treatment and Reuse in Agriculture of the 21st Century

Gabriela Petroceli Mota^{1*}, Glacielen Ribeiro de Souza^{1*}, Gabriel Quintanilha-Peixoto², Analyse Villanueva Gaete¹, Vânia Vieira Estrela³, Aline Chaves Intorne^{1,4**}

¹ Laboratory of Physiology and Biochemistry of Microorganisms, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602, Brazil.
gabrielapetroceli@gmail.com; glacielenribeirosouza@gmail.com; an4lyse@gmail.com

² Laboratory of Molecular and Computational Biology of Fungi, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.
gabrielqpx@ufmg.br

³ Department of Telecommunications, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 24220-900, Brazil.
vania.estrela.phd@ieee.org

⁴ Laboratory of Chemistry and Biology, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Volta Redonda, RJ, 27213-100, Brazil.
aline.intorne@ifrj.edu.br

*These authors contributed equally to this work.

**Corresponding author

Abstract: The population increase and the consequent demand for food have resulted in water pollution and 25% of the world population being affected by the water deficit. South America is the region with the greatest availability of freshwater. However, periods of severe drought and water rationing are increasingly frequent. The agricultural sector is the largest consumer of water, requiring the application of innovative technologies to optimize the use of the resource. The use of wastewater in agriculture is an alternative to reduce consumption and ensure sustainable use. In this context, biotechnological possibilities, such as constructed wetlands, stand out for their energy efficiency and economic and socio-environmental feasibility compared to conventional treatments. The chapter reviews the biotechnology involved in water reuse in the Agriculture 4.0 (Agri4.0) era, explores the importance of effluent treatment by phytoremediation, and presents the feasibility of harnessing water from wetlands built-in agricultural environments. This study's importance hinges on two thought-provoking notions as follows: Agri4.0 information technology and environmental management (sustainable growth).

Keywords: Agri4.0; Agribusiness; Sustainability; Phytoremediation; Aquatic Macrophytes; Remote sensing.

1 Introduction

Water is an essential natural resource for producing food and energy, besides other vital functions in living organisms [1,2]. As the human population increases, so does water consumption, thus reducing the amount of available freshwater, which is also aggravated by climate change [3]. Currently, 3.6 billion people suffer from water shortages for at least one month a year [4]. The United Nations (UN) estimates that the world population will exceed 9.5 billion people before 2050 and reach 11 billion by the end of the century. Consequently, the pressure on water supplies will increase even more (Figure 1) [5].

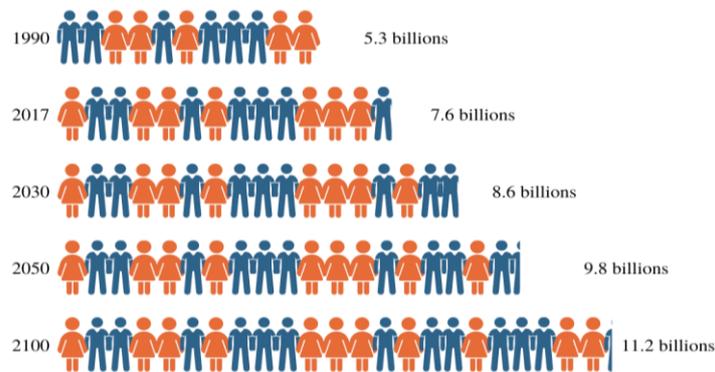


Figure 1. World population projection until 2100. Source: Adapted from UN 2017.

The demand for drinking water is ever-growing, and in many cases, water supplies are not sufficient [1]. Even South America, the region with the greatest availability of freshwater – 26%, with only 6% of the world's population – has suffered from periods of severe drought and increasingly frequent water rationing in some countries. Inequality in drinking water distribution in Latin America hinders approximately 30 million people [6]. In this regard, the Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Water Council (WWC) have already issued warnings about the reduction in the availability of freshwater, especially in developing countries, due to the impact of overuse, climate change, and environmental degradation [7].

The availability of water resources for human populations and ecosystem management depends on evaporation and precipitation [8]. Nonetheless, variations in seasonal characteristics resulting from climate change can interfere with the hydrological cycle and result in rainfall scarcity [9]. Climate projections highlight the hydrological variability in South America, with changes in precipitation, evapotranspiration, and surface runoff, as well as changes in the flow of some river basins [10]. Brazil, for example, has suffered from the negative impacts of extreme hydrological events. Studies suggest an increase in the country's mean temperature, as well as the greater intensity and frequency of droughts [11]. Future scenarios also predict changes in water quality due to higher concentrations of pollutants [12].

The decrease in the quality of available water resources is an element of concern [13]. Over the past 100 years, water consumption has increased by 600%. Estimations point toward the rising water demand of the coming decades to meet the intensive agricultural activity due to population growth and industrial development [14]. In addition, the contamination of water bodies is mainly attributed to the addition of anthropogenic inputs, which can cause water eutrophication due to a large amount of effluent rich in the organic matter [13].

The sources of contaminants deriving from human activities include domestic, industrial, and agricultural effluents [15]. Industries consume large amounts of water and employ varying toxicity levels in production processes. When untreated, the discharge of these effluents into water bodies represents a crucial pollution factor [16]. In the case of Brazil, the disposal of untreated effluent is considered an environmental crime provided for in the National Environmental Council resolution (CONAMA 430/2011) and Federal Law 9.605/1998 [17,18].

Worldwide, the agricultural sector demands around 70% of freshwater supplies in rivers, lakes, and aquifers, reaching more than 90% in less developed countries, possibly due to the low technology used in irrigation [19]. The agricultural sector has intensified production through pesticides and chemical fertilizers [20] to meet the population's needs. Nonetheless, these substances are often applied in excess. Since plants do not absorb all the product, residues are leached by rainwater and irrigation to water bodies, contaminating the aquatic ecosystem [21]. Consequences include the overpopulation of algae and plants, foul smell, turbidity, reduction in oxygen availability (hypoxia), mortality of fauna, and reduction of biodiversity through eutrophication [22,23]. For this reason, nitrogen fertilizers are considered the most significant cause of contamination of surface and groundwater [24]. Thus, maintaining freshwater availability and quality are challenging demands for humanity in the 21st century [25].

The 17 Sustainable Development Goals (SDGs) were proposed in 2015, supporting a global agenda concerned with the planet's sustainability. Among the 169 goals included in the 2030 Agenda, the need for agriculture to redefine its use, conserve and protect the environment emerges. SDG 2, which refers to ensuring food security and eradicating hunger, highlights the need for a sustainable and resilient food production chain [19]. At the same time, ODS 6 regards improving water quality, reducing pollution, eliminating effluent discharges, and minimizing hazardous chemicals and materials release to halve the proportion of untreated wastewater and substantially increase its recycling and safe reuse.

Industry 4.0 (I4.0) technologies (I4Ts) can effectively support digital transformations to accomplish UN sustainable development goals (SDGs) [26]. It is worth examining how I4.0 adoption can help boost advanced manufacturing/processing capabilities and meet their SDGs. I4.0 has become a wide-ranging research topic and brought progress in digital technologies, which will ultimately change traditional agrarian practices. However, I4Ts pose a challenge since they are novel, and corporations face skills gaps, financial limitations, and operational difficulties in I4.0 projects. These caveats become overwhelming within rural contexts. Cyber-physical systems (CPSs) can respond to intelligent wastewater and reuse management needs. A CPS is an emerging framework and paradigm to control physical and virtual systems via digital tools built on information and communication

technologies (ICT) [26-28]. This paradigm allows key technologies, comprising sensors, actuators, wireless communications/networking, hydrodynamic modeling, data exploration, and control, to assist cleverly wireless networked water CPSs to sense and work together with the water treatment plants.

In this context, Nature-Based Solutions (NbS) is a promising alternative for conserving water resources, ecological restoration, and sustainable use of water in agriculture [29]. The International Union defines NbS for the Conservation of Nature (IUCN) as "actions to protect, sustainably manage, and restore natural or modified ecosystems that address societal challenges effectively and adaptively, simultaneously providing human well-being and biodiversity benefits" [30]. Therefore, technologies for wastewater treatment and its reuse are often recognized for their potential to manage water availability and demand in agriculture [31], and, when added to biotechnological advances brought by Microbiology, Molecular Biology, and Bioinformatics, NbS can contribute to a more sustainable Agri4.0.

This study's theoretical relevance relies on its focus on two thought-provoking concepts as follows: domain of information technology (Agri4.0) and eco-friendly management (sustainable development). Herein, we highlight constructed wetlands as an alternative for wastewater treatment and explore the application of wetland-treated water in agriculture to foster the circular economy and increase the quality and productivity of this sector.

2 Water Reuse for a More Sustainable Agriculture

Large volumes of wastewater from homes and industries are generated daily. Europe treats 71% of wastewater, while in Latin America, this percentage revolves around only 20% [32]. These waters generally consist of 99% water and 1% suspended, colloidal, and dissolved solids [33]. They can hold organic matter, nutrients (mainly nitrogen and phosphorus), metals, emerging contaminants (antibiotics, hormones, personal care products, pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, phenolic compounds, and volatile organic compounds), and pathogenic microorganisms (viruses, antibiotic-susceptible and resistant bacteria, protozoan, and parasitic worms) [33–35]. The pollution load of these waters and the types of pollutants may vary among different sectors (urban, industrial, agriculture, etc.) and between countries and sub-regions [32]. Therefore, the safe use of wastewater as an alternative source of fresh water requires thorough processing [36]. On the other hand, the recovery of wastewater represents an opportunity to face the pressures on water supplies from a circular economy, which requires adopting a closed-loop system. Such design entails reusing resources, energy, and materials several times (for the same or different purposes) with minimal processing required for subsequent use [37,38]. The principles of the circular economy contrast with the traditional linear economic model, which depends on the availability of materials and energy [39]. In this perspective, the nutrients present in wastewater are reused as fertilizers in agriculture, turning the agricultural production system circular, without waste, replacing the traditional linear system.

Water reuse protects freshwater sources as it reduces the exploitation of aquatic ecosystems and the discharge of effluents in water bodies [40]. Global water

reuse capacity is estimated to have increased from 33.7 GL/day in 2010 to 54.5 GL/day in 2015. The highest growth appears in China, the United States, the Middle East, North Africa, Europe, and West South Asia [41]. Currently, 91% of recycled water goes to cultivate fruits, vegetables, cotton, and grain crops [42]. The source of most of this wastewater used for irrigation is urban or municipal [43], from industries and agro-industries [44]. However, the potential is more significant since some effluents currently go for water reuse.

Another relevant aspect is that wastewater production is constant, and its availability does not depend on climatic conditions. Climate change scenarios project spatial and temporal variations in the water cycle dynamics, exacerbating water supply and demand discrepancies [41,45]. Considering this, the reuse of wastewater for agriculture is essential in meeting the high irrigation demand [42].

2.1 Municipal Wastewaters

In some regions of the world, municipal water use for agricultural irrigation is already a reality [46]. About 20 million hectares of land have been irrigated with untreated or partially treated wastewater in 50 countries, corresponding to approximately 10% of total global irrigation practices [36]. In addition to being a sustainable practice, the reuse of municipal wastewater also promotes soil fertility and productivity due to the added nutritional load, reducing the need for synthetic fertilizers and decreasing the release of contaminants into the environment [36,46]. In Latin America, the production of municipal effluents is approximately 30 km³/year. These data make it possible to estimate these wastewaters' potential nitrogen, phosphorus, and organic carbon content, proving its applicability to agriculture (Table 1) [47].

Table 1. Potential nutrient content in municipal wastewater produced in Latin America. *Tg = Teragram = 10⁹ kg. It should be considered that the values obtained correspond to the theoretical maximum value that could be recovered and that only municipal sewage and not rural or industrial sewage outside cities were considered. On the other hand, the calculations rely on 100% resource recovery efficiencies without evaluating other technical or economic factors limiting such efficiencies. Source: FAO, 2017.

Resources	Concentration (Tg/year)*		
	Low	Medium	High
Total Nitrogen	0.6	1.2	2.55
Total Phosphorus	0.12	0.24	0.45
Total Organic Carbon (TOC)	2.4	4.8	8.7

A successful experiment in the reuse of municipal water took place in the city of Tacna, Peru, in which water presenting minimum quality parameters for reuse was applied. Farmers who irrigated with treated wastewater in stabilization tanks obtained

crops 50 to 250% larger than those who used well water and fertilizers, which is an advantage in the prices of the products they offer in the market [48].

2.2 Recycled Waters Quality Parameters

The wastewater treatment must occur properly for agricultural irrigation to ensure the desired water quality. Such needs stem from changes in physicochemical and microbiological properties that can harm the soil while damaging both human health and the environment [24,46]. Commonly controlled physical parameters for irrigation waters are total dissolved solids, electrical conductivity, temperature, color/turbidity, hardness, and sediment. Chemical parameters include pH, concentrations of anions and cations, calcium, magnesium, sodium, carbonates, bicarbonates, chlorides, sulfates, metals, nitrogen, phosphorus, and potassium. The microbiological parameters control the presence of bacteria, such as *Escherichia coli* and *Legionella*, viruses, and protozoa like *Giardia* and *Cryptosporidium* [49,50].

Each country has a set of laws, regulations, policies, and guidelines to control recycled water quality in crop irrigation. In Latin America, some countries already have specific regulations and guidelines [48,51,52]. There are also recommendations stipulated by international organizations [53]. The manual entitled “Minimum Quality Requirements for Water Reuse in Agricultural Irrigation and Aquifer Recharge” of the European Union [50] and the FAO guidelines for wastewater treatment and use in agriculture [49] and the World Health Organization [54] are some examples of recognized references.

Considering all the quality parameters listed, the treatment of wastewater using traditional chemical and physical approaches has a high cost of implementation and maintenance, using methods that are not eco-friendly [55]. For this, sustainable and low-cost technologies represent a strategy to ensure quality and protect water availability [56,57].

3 Constructed Wetlands

Constructed wetlands are artificially designed water treatment systems that use aquatic plants - also known as aquatic macrophytes - as renewable resources to filter water through the phytoremediation process. This biotechnological approach has been increasingly gaining prominence due to its economic and socio-environmental viability, with continually improving systems [37,56].

The specialized literature shows the effectiveness of wastewater treatment by constructed wetlands. These systems use different species of aquatic macrophytes capable of improving the physicochemical and biological characteristics of water through:

- Removal of suspended solids [58,59];
- Reduction of biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) [59,60];

- Removal of nitrogen and phosphorus [61];
- Removal of metals and emerging organic contaminants [58,60];
- Removal of pathogenic organisms (bacteria, viruses, helminths, protozoa) [60].

The bibliometric analysis presented herein was performed using the keyword “Constructed Wetlands” in the Scopus Elsevier database, analyzing verified documents published in the referring area from the first article in 1985 to the present day. A significant increase in production was verified, mainly in the last 20 years (Figure 2). In total, 10,560 articles were found related to constructed wetlands, the year of greatest publication in 2020, with 815 productions available.

Several countries have adopted constructed wetlands, especially in China, which ranks 3,104 publications, followed by the United States (2045) and the United Kingdom (538). Among the 15 countries with the highest production related to the theme, Brazil is the only one in Latin America, reaching 11th position with 280 works (Figure 2). This shows that there is potential in the region to develop such treatment systems, particularly if we consider the tropical climate, the abundance of water bodies, and aquatic macrophyte species to be explored biotechnologically. In addition, agriculture is one of the bases of the Latin American economy, especially in Brazil, which has large arable areas, requiring a large volume of water for irrigation [62].

Wastewater treated by wetlands is an interesting alternative for agricultural irrigation. In this context, we performed a search with the keywords “wastewater” and “irrigation” in the Scopus Elsevier publications database, considering the literature since the first publication. A total of 9,207 publications were identified between 1966 and 2021. We can see that since 2013, more than 400 publications/year related to the theme have been carried out, reaching the highest level in 2021 with 700 publications (Figure 3).

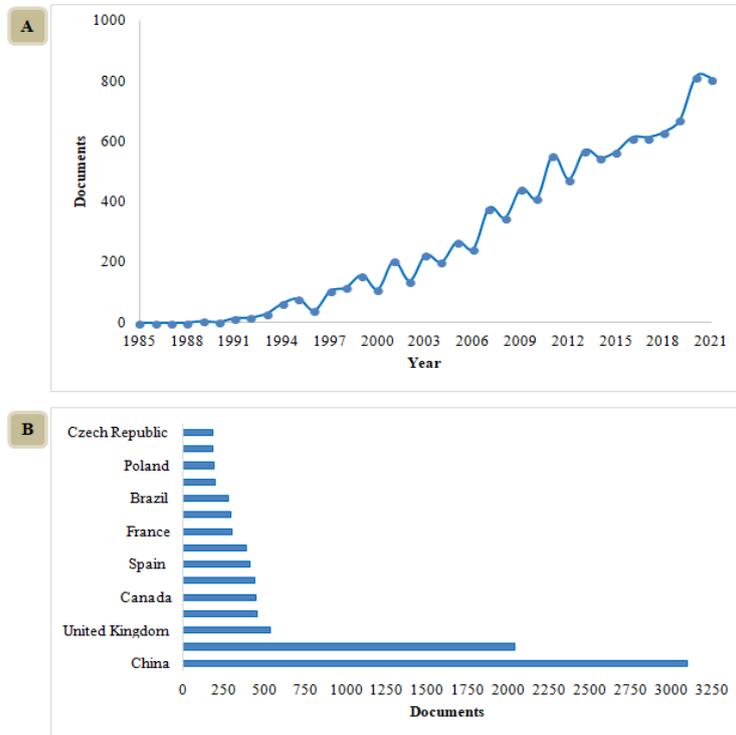


Figure 2. Publication of documents by year (A) and by country (B), between 1985 and 2021, searching for “Constructed Wetlands” in the title, abstract, and keyword. Source: Scopus Elsevier, accessed on: 22 November 2021.

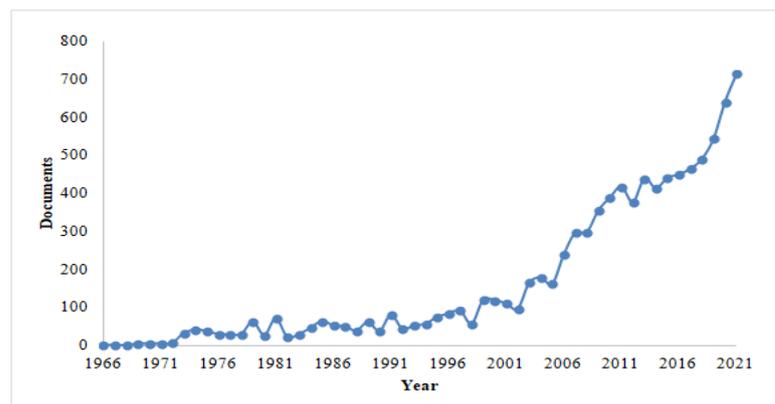


Figure 3. Publication of documents between 1966 and 2021 using the words "wastewater" and "irrigation" in the title, abstract, and keyword. Source: Scopus Elsevier, accessed on: 22 November 2021.

The increase in publications over the years reinforces the capacity of wastewater treatment by constructed wetlands and their viability of employment for irrigation in agriculture. Compared to conventional treatment, this technology stands out for its potential to remove pollutants, lower cost, and eco-friendliness [63].

3.1 Water Treatment in Constructed Wetlands

The main advantages of phytoremediation using constructed wetlands include sustainability, the possibility of process escalation, low installation and maintenance costs, the conservation of soil structure and fertility increase, the prevention of erosion and metal leaching [64], in addition to being a sun-powered technique. The disadvantages include a longer period compared to traditional methods and the efficiency, which might be reduced depending on the contaminant's concentration, toxicity, and bioavailability, resulting in a slow growth rate and decrease in the biomass of the plants in the system [64]. In addition, the destination of plant material after remediation of the environment can generate additional costs, and the risk of incorporating metals into the food chain must also be considered [64,65]. In this sense, there are biotechnological strategies that can help to mitigate or completely overcome such difficulties. An example of such a scheme is the use of microbial inoculants developed to accelerate the treatment, resist and degrade possible toxic substances [66], besides the production of fertilizers from the aquatic macrophytes [67,68]. Thus, it is possible to generate another product with added value and high nutritional content, which can also help agriculture.

Wastewater treatment by constructed wetlands takes steps similar to conventional handling, which involves preliminary, primary, secondary, and tertiary treatment (Figure 4). In the prior treatment, the solid residue elimination happens by grating, and the effluent goes later to the primary treatment in an aeration pond. Then, the effluent enters secondary treatment in a sedimentation pond. Finally, the tertiary step uses aquatic macrophytes in plant-mediated purification [68]. In this step, macrophytes and microorganisms [69], which occur in both free-living and associated forms [70], metabolize nutrients and contaminants. The prospect for plant species is not random, considering that such plant should absorb (adhere to internal tissues) and/or adsorb (adhere to the external surface) [71], or incorporate nutrients and wastewater toxins in some other form [72], or even decrease wind speed over the water surface, which is critical for wastewater sedimentation [73].



Figure 4. Water treatment process model in constructed wetlands. 1- Primary treatment. 2- Secondary treatment. 3- Tertiary treatment.

In general, the choice of plants for constructed wetlands mainly include aquatic macrophytes, which meet the following requirements [74]:

1. Tolerance to local climatic conditions, pests, and diseases;
2. Tolerance to pollutants and hypertrophic conditions;
3. Greater relative ability to absorb contaminants by direct assimilation or storage;
4. Rapid establishment, dissemination, and growth.

Aquatic macrophytes have a high purification capacity due to direct contact with contaminated water [75], enabling their use in effluent treatment and as bioindicators of environmental quality [76]. In general, these plants have very thin cuticles and can remove contaminants in water all over the plant surface [77].

The genera *Typha* [73], *Eichhornia*, *Salvinia*, and *Lemna* [78] have been widely studied and used for contaminant removal (Table 2). These plants differ in some ways, especially in their choice of substrate (Figure 5). *Typha* is rooted in the sediment, while the other examples are free-floating macrophytes. Vymazal (2013)

[73] highlights that *Typha* species tend to outcompete other plant species in constructed wetlands and even in natural environments, where it occurs mainly as an invasive species. For this reason, we highlight the importance of physical barriers between the different treatment steps in a constructed wetland, which is also reviewed by Stefanakis (2020) [79] and Li et al. (2021) [80], and recommend *Typha* to be applied early in the treatment, considering it does not have specific requirements. The reduction in wind speed contributes to better sedimentation of particulates.

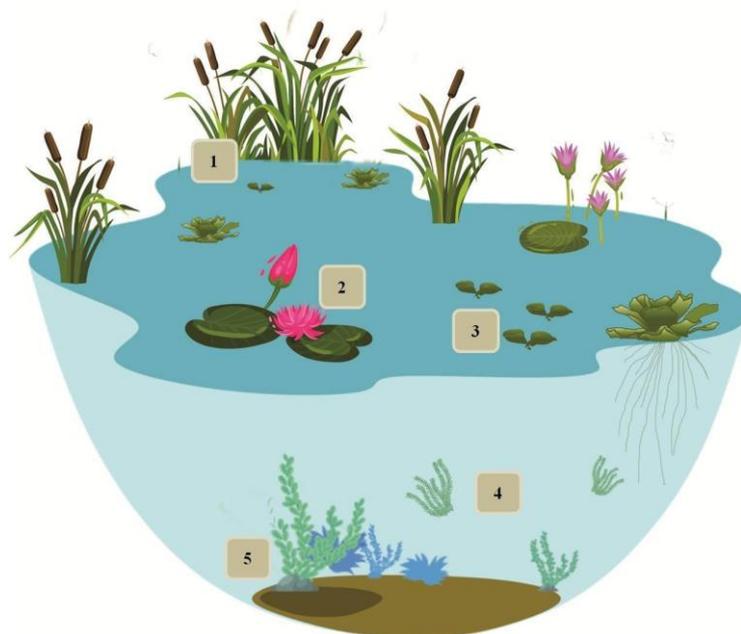


Figure 5. Significant groups of aquatic macrophytes. 1- Emerged aquatic macrophytes: rooted in the sediment with leaves out of the water (e.g., *Typha*). 2- Emergent with floating leaves rooted in the sediment and other leaves floating on the water surface (e.g., *Nymphaea*). 3- Floating macrophytes: float freely on the water surface (e.g., *Pistia*, *Salvinia*). 4- Free submersed aquatic macrophytes: floating underwater (e.g., *Ceratophyllum*). 5- Rooted submersed aquatic macrophytes: grow entirely underwater (e.g., *Egeria*).

Table 2. Removal of contaminants by different species of aquatic macrophytes.

Macrophytes	Contaminants	References
<i>Typha</i> sp.	Fe; Al; Mn; Zn; Co; Pb; Ni; Cr; Cd; Hg; As; Sulphates; Nitrogen; Phosphorus	Klink et al., 2013 [81] Rana et al., 2018 [82] Jeke et al., 2019 [83] Hejna et al., 2020 [84] Singh et al., 2021 [85] Bonanno, 2013 [86] Mufarrege et al., 2015 [87]
<i>Eichhornia</i> sp.	S; Cd; Pb; Zn; Cr; Ag; Cu; Ni; Hg; Fe; Al; Tetracycline	Mishra et al., 2017 [88] Sricoth et al., 2018 [89] Malar et al., 2015 [90] Zahoor et al., 2018 [91] Chakrabarty et al., 2017 [92] Melnigani et al., 2015 [93] Suryandari et al., 2017 [94] Jayaweera et al., 2007, 2008 [95,96]
<i>Salvinia</i> sp.	Mn; Pb; Cd; Ni; Cu; Cr; Drugs (amoxicillin, caffeine, dipyron, ibuprofen, and omeprazole); Phosphates; Nitrates; Ammonia	Estrella-Gómez et al., 2012 [97] Wolff et al., 2012 [98] Bizzo et al., 2014 [99] Ng et al. 2018 [100] Otomo et al., 2021 [101]
<i>Lemna</i> sp.	Phenol; Phosphates; Nitrates; Sulphates; Ammonia; As; Cu; Cd	Jayasri et al., 2017 [102] Ng et al., 2018 [100] Ceschin et al., 2019 [103] Radulović et al., 2020 [104] Seifi et al., 2021 [105]

Precisely for being rooted to the sediment, the management of *Typha* is more delicate and labor-consuming, which translates into a slower plant turnover. For this reason, free-floating, faster-growing aquatic macrophytes can complement the wastewater treatment in constructed wetlands. The aforementioned *Eichhornia*, *Lemna*, and *Salvinia* are also known as hyperaccumulators [106]. Even though they can be applied separately in constructed wetlands, in cases where the contaminants are not fully known, using these plants might present an advantage, as described by Kodituwakku and Yatawara (2020) [107]. This work considers that these plants have different affinities for metallic ions in suspension (the authors tested the remediation of Zn, Fe, Cu, Cr, Ni, Cd, and Pb).

Eichhornia crassipes survives in environments contaminated by As, in concentrations of up to 2 mg.L⁻¹, removing up to 20% of the metal from the environment [108]. The use of *E. crassipes* in the remediation of other metals has also

been described (Table 2). *Eichhornia* has also worked for the phytoremediation of Ibuprofen and caffeine, two emerging contaminants that harm drinking water quality and have a very expensive cost when chemical removal is applied [109].

Several studies with macrophytes of the *Salvinia* genus have highlighted their resistance and ability to remove metals and drugs. *Salvinia natans* is capable of accumulating Al, Cr, Cu, Ni, and Zn [110,111], with high efficiency in removing Zn and Cu (85 and 74%, respectively) [110]. *Salvinia auriculata* also tolerates a high concentration of metal such as Cu [99,112]. These characteristics reinforce the use of free-floating macrophytes after *Typha*-assisted sedimentation since the presence of large particles could harm the phytoremediation of smaller contaminants. In some cases, ornamental plant species can also work in constructed wetlands, such as *Heliconia* and *Zantedeschia*, which, according to Sandoval et al. (2019) [113], are common plants in Latin America.

3.2 The Role of Beneficial Microbes in Constructed Wetlands

Like aquatic macrophytes, microorganisms have developed strategies to survive and resist stresses in contaminated environments [55]. They are present in constructed wetlands, promoting purification reactions and degrading substances in the wastewater. Some microbe groups also improve plant growth, and this association plays a vital role in removing contaminants from wastewater [114,115].

Recently, our research group isolated and identified bacteria and yeasts associated with the aquatic macrophytes *S. auriculata* and *T. domingensis* [116,117]. Studies have shown that the microbiota improves plant development, with a significant gain in fresh biomass (FB), even in the presence of high amounts of metal ions [116-118]. When inoculating the bacterium *Bacillus toyonensis* 3.1.3.0.X.14 into *S. auriculata*, there was a 12% increase in FB, compared to the control. Under Pb stress, the inoculated plant had a 20.3% increase in FB compared to the treatment without the inoculant in the presence of Pb, suggesting protection of the plant by the bacteria during metal stress [118]. A similar result was found when inoculating *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 in *S. auriculata*. The bacteria promoted a 29.6% gain in FB. In the presence of Cu, the inoculated plants showed a 51% increase in FB when compared to the non-inoculated treatment, showing that the bacteria protected the plant from stress [117]. Plants inoculated with the yeast *Yarrowia lipolytica* showed a significant increase of 20.9% in FB. In the presence of Cu, the yeast also showed a protective effect on *S. auriculata*, which showed a 28.3% increase in FB when compared to the non-inoculated treatment [116]. Therefore, microorganisms associated with aquatic macrophytes might protect these plants under stress, maintaining plant growth promotion traits, and thus, can act as inoculants in wetlands systems.

Nonetheless, the microbial network in constructed wetlands is complex and not entirely associated with the host plants. This network includes bacteria, fungi, archaea [119,120], and even protozoans and small metazoans [121]. These organisms might possess incredibly different metabolisms, which might favor the use of additional carbon and nitrogen sources, the presence or absence of oxygen, and act on other

steps of nutrient cycles (mainly carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, and sulfur) [122].

The presence of microbial species empirically known to improve water quality can be enriched with microbial inoculants [123] and other techniques [124]. However, microbial metabolism works in an intricate network (including microorganisms in symbiosis). The study of consortia and their formulation is a challenge that requires modern tools involving different fields of action, such as Ecology, Microbiology, Molecular Biology, and Bioinformatics.

Metagenomic studies, for example, allow us to know the genomes of microbial communities in an environmental sample, including non-cultivable microorganisms [125]. Zhen et al. (2020) [126] verified the presence of arsenic (As) metabolism genes, with resistance (*arsR*), transport (*pstB*, *glpF*, *arsB*, *arsA*, *pst* (S, A, and C), and *arc3*), and metal transformation functions (*arsT*, *aioAB*, *arsC*, and *arsM*) in bacteria associated with the aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata*. Analyzes in a wastewater treatment plant showed the prevalence of resistance genes to 21 metals in a bacterial population predominantly belonging to the Phylum Proteobacteria (90%), especially in the genera *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Acinetobacter*, *Sphingobium*, and *Enhydrobacter* [34]. Metagenomics also encompasses the characterization of enzymes likely produced by microorganisms, which can be used in bioremediation processes. The use of enzymes might present a simpler alternative to the use of microorganisms themselves, especially in extreme environments [127]. Nonetheless, the heterologous production of enzymes depends on a deep knowledge of the structure and function of that given gene and respective protein.

Investigations based on genomic and proteomic analysis helped elucidate issues related to microbial identification, cellular mechanisms, metabolic pathways, and key proteins responsible for the physiological response to environmental stresses [64,128]. For example, in the search to find potential microorganisms for metal remediation, many researchers have isolated strains from samples collected in contaminated areas [129].

Knowing the relationships established between aquatic macrophytes and microorganisms at the molecular level can control the wastewater treatment process in constructed wetlands, which increases the potential for removing contaminants. This is because this strategy can increase plant biomass, improve nutritional status, and promote stress tolerance, intensifying the phytoremediation potential of macrophytes [130]. Nonetheless, more studies are required to understand this relationship better.

3.3 Constructed Wetlands in Latin America

Several countries have adopted wastewater treatment with constructed wetlands due to economic and environmental benefits in line with the 2030 Agenda. However, this movement is still not as frequent in Latin America and the Caribbean, even with the ideal conditions for the implementation of this technology (especially the high availability of low-cost marginal lands, tropical and temperate climate with mild winters, and high availability of climate-adapted macrophytes) [131,132]. It has been estimated that constructed wetlands treat only 0.22% of the total wastewater flow in this region. Simultaneously, stabilization ponds, activated sludge, and upflow

anaerobic sludge blanket (UASB) reactors provide treatment for about 81% of the total flow [133].

In Mexico, the government has adopted constructed wetlands in its local guidelines for wastewater treatment [51]. This structure has had a positive effect as these systems tend to be more resilient and require less maintenance than traditional systems – pressing issues responsible for most wastewater treatment failures in developing countries [53]. However, the National Inventory of Municipal Water and Effluent Treatment Plants in Operation of Mexico (2019) [134] reports that of the 2,642 treatment plants installed in the country, 278 use constructed wetlands as a complement to other treatment systems such as septic tanks, sedimentation tanks, or Inhoff tank, that is, less than 10%, and only 77 stations use wetlands as the main treatment method. Interestingly, irrigation of crops with untreated municipal water is a common practice, which can pose risks to the population's health and the environment [135]. On the other hand, irrigation of crops with recycled water is safe and provides added nutrients to the soil, reducing the need for chemical fertilizers.

In Brazil, the Ponte dos Leites Sewage Treatment Plant, located in the municipality of Araruama, Rio de Janeiro, is a successful case in treating effluents by constructed wetlands, considered the largest in Latin America. After its implementation, regional flora and fauna were recovered, with animal species returning to the area due to lack of food and favorable environmental conditions. In addition, it reduced the operating costs of effluent treatment, and currently, all the solid waste generated in the process goes into composting [136,137].

In countries like Colombia, Chile, Peru, Argentina, Uruguay, and Paraguay, constructed wetlands for effluent treatment have been implemented in experimental or small-scale systems to purify sanitary effluents from communities, industrial and farm effluents [132,138–140]. Regarding the reuse of effluents treated in wetlands in agriculture in Latin America, further studies and research are still required, in addition to a specific regulatory framework [131]. One possibility to accelerate the advancement of the application of this technology is the automation of processes, working on the concept of Agri4.0 and sustainability.

4. Agri4.0 Technologies in Water Reuse

Agri 4.0 consists of essential technologies to optimize agricultural production sustainably. The use of cutting-edge technologies, such as the Internet of Things (IoT), transforms traditional farming practices, such as irrigation, into modern solutions for agriculture. Digital technological advances enable producers to monitor each production phase and determine the best treatments for their properties, for example [62]. IoT plays a crucial role in modern agriculture, using intelligent sensors that process data and store it in the cloud. These sensors can monitor and diagnose the development of crops, resources, and soil properties (pH, moisture, and salinity) in real-time, which allows optimizing the irrigation process and performing physical-chemical analysis of the water [141,142].

Another extremely relevant approach is remote sensing using satellites and/or drones [143]. These devices allow for a panoramic assessment of large areas, optimizing the conditions for monitoring the crop.

Using these technologies in wastewater management can help achieve sustainable and more efficient agriculture. In this context, smart sensors can monitor the quality of recycled water [144,145] to ensure that it is within agricultural irrigation standards [146]. Likewise, it is possible to analyze the remaining nutrients of these wastewaters and the soil, allowing better management of the application of fertilizer doses and, consequently, reducing costs and environmental contamination [147].

4.1 Agri4.0

Globally, agribusiness faces a scarcity of resources due to unsustainable practices and poor utilization. In recent times, manufacturers engaged in international markets are adopting various green initiatives for sustainability outcomes to attract more customers [148]. Manufacturers are trying to return something useful to society through corporate social responsibility programs. However, most companies fail to achieve SDGs due to their challenges to sustain remanufacturing, recycling and reusing operations. These failures are due to their lack of flexibility, visibility, and poor resilience.

Applying I4.0 principles to agribusiness is deemed as Agri4.0. A proper I4.0 delivery system needs careful development to overcome these challenges. Administrators can access supply-and-demand-correlated real-time data from a supply chain network through the I4.0 CPS dashboards [28]. This could provide an excellent opportunity for organizational learning and the ability to run production lines using recycled, refurbished, and remanufactured components. Operations can easily be optimized by implementing I4.0 systems and a standard operating process aligned with I4.0, providing alternatives to optimize business processes and significantly fewer resources and lead times.

Agriculture that successfully adopt I4Ts can simultaneously improve their top and bottom lines [149]. Wastewater treatment plants can also expect an operations cost reduction when they adopt smart technologies, which can integrate planning and scheduling activities. We expect that wastewater treatment facilities with a high degree of I4.0 adoption when applying front-end and base technologies will attain operational flexibility, operational efficiency, and operational effectiveness.

Companies play a vast part in sustainable development practices. However, it is also a considerable apprehension for high technology-oriented firms. The proper selection of product design, services, and transportation can lower global warming while becoming internationally competitive markets. The 10-R-based development employing manufacturing methodologies such as refuse, rethink, reduce, reuse, repair, refurbish, remanufacture, repurpose, recycle and recover options. These approaches can provide opportunities for cleaner production in the circular economy-based model, and aid agribusiness attain a competitive edge over their rivals. Therefore it is required to analyze different aspects of sustainability.

Additionally, large companies face several challenges, ranging from SDG

procedures for final products to the real-time manufacture scheduling of production-related resources. Few studies exist about the 10-R scheme sustainability while also considering the I4.0 potential to foster emerging sustainability research is premature and entails more attention from prospective researchers. This study attempts to raise awareness about the second question.

4.2. Main Aspects and Discussions

Main I4Ts that help in water reuse in Brazilian agribusiness follow. This section intends to clarify the Agri4.0 technologies that contribute to water reuse and how it happens.

4.2.1 Sensors

They allow monitoring the water path, whether drinking water or wastewater within the processes, and measuring temperature, conductivity, and pH standards, from the inlet to the outlet of the process. Hence, any waste or deviation from acceptable standards quickly prompts problems' detection and correction, guaranteeing waste water quality. Installed sensors send real-time information on the amount of wastewater discarded, the quality of this water, and the generating source. The sensors can quickly detect water pollution by evaluating and monitoring the real-time presence of contaminants in the water, including ions, bacteria, and metals. Sensors can alleviate the amount of water discarded during washing processes, control the used water volume and identify wastewater standards. Intelligent sensors can be appropriately integrated into control systems to monitor the treatment of wastewater systems. Digitization in the management and reuse of water within agriculture brings numerous advances and advantages. Among them, one can cite increasing the security of supply and disposal, as it avoids shortages and ensures correct reuse, contributing to the effective protection of aquatic systems, resource efficiency, and encouraging circular and green economies [27,28].

4.2.2 Actuators

They (e.g., pumps, intelligent membranes, valves, alarms, drones) can regulate the water path, whether for drinking water or wastewater within processes or control parameters, e.g., temperature, pH, and conductivity, from the inlet up to the water reuse. Therefore, they correct waste or abnormalities from established standards, ensuring waste water quality. Actuators receive real-time sensors' information on the amount of discarded wastewater, this water quality, and the producing source. Actuators can quickly remediate water pollution/waste by decision-making stages that process real-time sensor' info about the contaminants' presence, like ions, bacteria, besides metals, to solve anomalies early [27,28].

4.2.3 Drones

They can map the region of interest, check aquatic systems impacted by the activities developed and monitor crops sites. This movement begins with I4Ts already in use in some nations, e.g., for water monitoring drones with automatic functions for pumping and scrutinizing samples. These schemes can work with coupled remotely activated peristaltic pumps to analyze the watercourse region. Brazil already perceives drones as a competitive enhancement, and this technology search has augmented, but it is still somewhat unrealistic in practice. Drones can help insert remote sensing and surveillance to wastewater facilities while working with other machines to handle information remotely, combining smartphones and cloud databases [150].

4.2.4 Nanotechnology

Nanoparticles aligned to wetlands can help clean pollutants and provide a higher quality reuse water for agriculture application. Wastewater treatment can use membrane technologies to manipulate atoms and molecules and thus treat the water. The UN perceives excellent potential in nanotechnology for water decontamination. For instance, graphene-coated membranes can get rid of more than 90% of anionic dyes and reuse water in staining processes. Silver nanoparticles, through pressure pumps, help filtrate waste water and improve the reuse water quality [151].

4.2.5 Artificial Intelligence (AI)

AI optimizes the performance of filtration systems in reuse applications [152,153]. It will transform wastewater treatment by increasing the water treatment efficiency in line with the analysis of waste or substances contained in this water and automatically activate the adequate cleaning protocol to improve quality and reduce resources and energy used. When effluent conditions vary, AI software adjusts to filtration conditions in real-time, ensuring stable performance with maximum water retrieval. AI can predict supply network water consumption based on analyzing a large amount of data from past events like water usage in the last days, months, or years and use these datas for decision-making. An attempt determines cyclical patterns to estimate the occurrence of higher water consumption or lack of water through wastewater control, reprocess, verification, and quality.

Digital tools can benefit wastewater systems and develop a sustainable and intelligent approach. Still, one needs more studies about the economic, environmental, and social compensations resulting from adopting AI in dam maneuvers. These operations' primary results can save the effluent treatment, with quality equal to or better than houses' faucets. They may involve digitalized and automated wastewater management with real-time tracking via sensors that transmit information to visualization platforms.

4.2.6 Internet of Things (IoT)

The IoT systems optimization in the primary layer of the internet (edge computing) helps to monitor properties with a large number of sensors and actuators to control waste, reuse, in addition to checking water quality. Therefore, technological advances such as sensors to optimize irrigation and real-time soil diagnosis can help agriculture to ameliorate water expenditure and management systems [152,153]. IoT-based applications seamlessly integrate the virtual and physical worlds. IoT combines devices to produce data, send it to other devices, and then send it to the cloud. This data is helpful for management resolutions and data mining. Machine-to-machine communication technology enables wireless data interchange among IoT equipment and gateways.

Further, data flows from the gateway to a distant repository in the control room with the internet. Yet, machine-to-machine communications have different traffic features and specific problems. I4Ts like forward-thinking engineering structures, progressive process control, and machine control can monitor and control intelligent production lines in the agribusiness. The central I4T focus enablement in manufacturing enriches flexibility, efficiency, and effectiveness to augment performance.

4.2.7 Big Data (BD)

Wastewater treatment facilities (WWTFs) use large workforces and resources to meet the regulatory limits without errors. The ICT advancement allowed collecting large data amounts from plentiful sources using sophisticated sensors. Due to the lack of specialized tools and knowledge, operators and engineers cannot effectively extract meaningful and valuable information from large datasets. Unfortunately, the data are often stored digitally and then underutilized. Various data analytics techniques have been developed in the past few years. The methods are efficient for analyzing vast datasets.

Nonetheless, no wholly developed study applies these techniques to assist wastewater treatment operation. Data analytics processes can immensely transform a large dataset into informative knowledge, e.g., hidden data, operational caveats, or even a predictive model. Big data (BD) analytics will allow operators to clearly understand the functional status while saving the operation and maintenance costs and reducing the human resources required. Ultimately, the method can enhance the operating wastewater treatment framework performance [154,155]. The unstructured data generated from various sources, such as intelligent digital sensors (temperature, pressure, flow, weight, density, and power utilization) connected via wireless networks and mobile devices with special applications, can generate a high data volume for a central control room analysis to extract key knowledge for quality decision making. This can improve the accuracy of forecasts, supplying a greater degree of visibility, higher resource efficiency, asset utilization, and improved throughput times.

Decision-making is one function of data quality and stakeholder commitment. This is why BD research is gaining prominence as supply chains see an

increasing complexity. Methods for scrutinizing and managing data quality in supply chain management are essential while investigating the BD role and analytics in sustainable agriculture enhancement. BD, predictive analytics, and social/environmental performance can be combined.

4.2.8 Cloud/Fog/Edge Computing

Cloud Computing (CC) is a deep-rooted model for service-centric systems. Nevertheless, ultra-low latency, high bandwidth, safety, and real-time analytics limit CC when examining and outputting results for a large data amount. Fog (FC) and Edge Computing (EC) offer solutions to CC restrictions. The number of agricultural applications combining CC, FC, and EC increased in the last decades in the Agri4.0 domain. It is vital to identify all relevant research on new computing paradigms for intelligent agriculture to better work with CC, FC, and EC blends. Likewise, it also analyses and examines the agricultural application domains, research methodologies, and combinations of them. Additionally, the architecture models' components can explore the communication protocols within layers and those relating one layer to another. Finally, new challenges in smart agriculture, the intense usage of mobile devices, and future research directions will require access to remote databases [156].

4.2.9 Blockchain

Blockchain is a technology that is independent of central authorities. Powered by its ability to permit transparent, fraud-proof, and auditable digital asset handling, blockchain has continued evolving in public and private models. The evolution became more significant by mixing smart contracts with blockchain, like Ethereum. Smart contracts are the most transformative application of blockchain in the current digital world. Research showed some ways blockchain could fuel the shift toward a smart city. A smart city means a town that uses ICT to enable a premium lifestyle at a reduced cost and resource utilization. Blockchain and smart contracts can lead to decentralized, automatic, transparent, and secure smart city management [28,157,158].

A reward-based blockchain framework can afford an efficient flow of liquid waste to the proper disposal areas. Such expedient helps maintain adequate cleanliness and hygiene of the environment. Controlled and auto-enforced activities utilize smart contracts for system integrity, sustainability, and real-time management, thus creating open, transparent, and decentralized surroundings. Wastewater management (WWM) can be fourfold: (i) storage, (ii) collection, (iii) disposal, and (iv) recycling. The suggested smart WWM system is a step toward synchronizing these four steps.

I4.0 research in operations management is gaining momentum as corporations consider digitalization a priority. Agri4.0 technologies would lead to more competitive global supply chain operations. I4Ts can integrate all critical functions to share common data, records, and knowledge all over the supply chain. They can also be applied to automate necessary operations activities. However, the I4.0 key impact is its ability to yield and access real-time information to permit enriched visibility and

mitigate risks in the supply chain network.

4.3 Sustainable Development

The UN 2030 agenda for SDGs focuses primarily on people, the planet, and prosperity. There are 169 goals and 231 indicators where each country establishes its objectives on a national level to achieve a better quality of life for its population.

As the current sources of competitive advantages deplete, agribusiness must focus increasingly on new sources of competitive advantage for sustainability. Actually, this concept integrates environmental and social parameters to allow long-term financial viability. The present literature lacks sustainability-related studies focusing on an integrated approach. Cultural and economic factors also considerably influence sustainability developments in any country.

Therefore, identifying key sustainable supply chain drivers and understanding their inter-relationships can be helpful for managers to use as a guide for integrating sustainability aspects in business operations. Supply chain transparency can improve social and ecological parameters, reinforcing the ESG (Environmental, Social and Governance) ideas and compliance practices.

The literature points out that lean practices can help directly and indirectly achieve supply chain sustainability. Businesses are gradually adopting circular economy principles by recycling and remanufacturing. Building trust is essential in a sharing economy. It is clear that without complying with SDGs, firms are likely to perish on this planet.

5. Final Considerations

Considering the increase in world population and the projected growth by 2100 by the UN, water supplies will become even more critical and there will also be a greater demand on food production, however, agriculture already consumes (and wastes) the largest amount of the resource. In addition, the decrease in water quality is another factor of concern, and it is urgent to adopt sustainable measures for decontamination and optimization of the use of water, seeking to conserve water resources.

Therefore, as large volumes of wastewater are generated daily, its reuse in agriculture is an alternative not only to protect resources but also to save the costs of fertilizers, stimulating the circular economy and meeting the high demand. For the application of recycled water in agriculture, adequate treatment must be carried out to meet the physical-chemical parameters according to each country's legislation, to guarantee the aimed quality.

The wastewater treatment process by constructed wetlands is a promising, sustainable, and low-cost technology, which is already in use, bringing positive results. As discussed in this chapter, this technique can decontaminate wastewater, even with high loads of nutrients and contaminants. Even in eutrophic or severely contaminated environments, macrophytes and microorganisms have efficient mechanisms and strategies to survive. Together, these organisms can be used as a

biotechnological tool to promote effluent purification reactions and remove organic and inorganic contaminants present in the water.

Wetland-mediated effluent purification has been implemented in some Latin American countries. In Brazil, the wetland sewage treatment plant built in Araruama, State of Rio de Janeiro, is the largest of its kind in Latin America. Its implementation has reduced operating costs compared to the conventional method and feeds the circular economy, since solid waste is destined for the composting process and not to landfills. On the other hand, the use of treated wastewater in constructed wetlands for agricultural irrigation is a strategy with great potential mas ainda pouco utilizada.

In addition, the literature indicates the use of different 10R-based primary- and advanced-level I4Ts to explore sustainable development outcomes in wastewater treatment and its application in agriculture. The use of these technologies in wastewater monitoring offers greater productivity and economic, social, and environmental advantages.

This review examined the significance of the adoption of I4.0 in Agri4.0. Research indicates that the more robust the delivery system is, the better the degree of implementation and the more encouraging the results of operations are. The I4.0 delivery system comprises senior management support, preparation, and design resources, provision to research organizations and universities, simplifying the adoption of I4Ts. The works collected also indicate that there is a significant demand for the adaptation of ICT among small, medium, and large companies, and agriculture should be no different; I4Ts coupled with biotechnology can fill this gap by connecting the phases of the process in order to consolidate the circular economy.

6. References

1. Srivastava, J., Gupta, A., Chandra, H.: Managing water quality with aquatic macrophytes. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 7(3):255–66 (2008)
2. Nations U: UN World Water Development Report, Nature-based Solutions for Water (2018)
3. Yoon, J., Klassert, C., Selby, P., Lachaut, T., Knox, S., Avisse, N., et al.: A coupled human-natural system analysis of freshwater security under climate and population change. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118 (14) (2021)
4. Boretti, A., Rosa, L.: Reassessing the projections of the World Water Development Report. *npj Clean Water* 2(1) (2019)
5. United Nations: Population Facts, How certain are the United Nations global population projections?, n. 6 (2019)
6. Silva-Rodríguez de San Miguel, J.A.: Water management in Europe and Latin America. *Manag Environ Qual An Int J.* 29(2):348–67 (2018)
7. FAO & WWC. Towards a water and food secure future: Critical Perspectives for Policy-makers. Rome and Marseille (2015)
8. Konapala, G., Mishra, A.K., Wada, Y., Mann, M.E.: Climate change will affect global water availability through compounding changes in seasonal precipitation and evaporation. *Nat Commun* 11(1):1–10 (2020)
9. Liu, J., Yang, H., Gosling, S.N., Kummu, M., Flörke, M., Pfister, S., et al.:

- Water scarcity assessments in the past, present, and future. *Earth's Future* 5(6):545–59 (2017)
10. Brêda, J.P.L.F., de Paiva, R.C.D., Collischon, W., Bravo, J.M., Siqueira, V.A., Steinke, E.B.: Climate change impacts on South American water balance from a continental-scale hydrological model driven by CMIP5 projections. *Clim Change* 159(4):503–22 (2020)
 11. Zilli, M., Scarabello, M., Soterroni, A.C., Valin, H., Mosnier, A., Leclère, D., et al.: The impact of climate change on Brazil's agriculture. *Sci Total Environ* 740:139384 (2020)
 12. Niemi, L., Landová, P., Taggart, M., Boyd, K., Zhang, Z., Gibb, S.: Spatiotemporal trends and annual fluxes of pharmaceuticals in a Scottish priority catchment. *Environ Pollut* 292(October 2021) (2022)
 13. Wang, B., Stirling, E., He, Z., Ma, B., Zhang, H., Zheng, X., et al.: Pollution alters methanogenic and methanotrophic communities and increases dissolved methane in small ponds. *Sci Total Environ* 801:149723 (2021)
 14. Wada, Y., Flörke, M., Hanasaki, N., Eisner, S., Fischer, G., Tramberend, S., et al.: Modeling global water use for the 21st century: The Water Futures and Solutions (WFaS) initiative and its approaches. *Geosci Model Dev.* 9(1):175–222 (2016)
 15. Ryciewicz-Borecki, M., McLean, J.E., Dupont, R.R.: Bioaccumulation of copper, lead, and zinc in six macrophyte species grown in simulated stormwater bioretention systems. *J Environ Manage* 166:267–75 (2016)
 16. Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Ismail, N., Lalung, J.: Isolation, identification, characterization, and evaluation of cadmium removal capacity of *Enterobacter* species. *J Basic Microbiol* 54(12):1279–87 (2014)
 17. Brasil, Lei nº. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, art. 33. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm
 18. CONAMA, Resolução nº 430/11, 2011. Available from: http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=627
 19. Jägermeyr, J.: Agriculture's Historic Twin-Challenge Toward Sustainable Water Use and Food Supply for All. *Front Sustain Food Syst.* 4(April):0–5 (2020)
 20. Kebede, E.: Competency of rhizobial inoculation in sustainable agricultural production and biocontrol of plant diseases. *Front Sustain Food Syst* 5(August):1–22 (2021)
 21. Sharma, S., Rana, V.S., Pawar, R., Lakra, J., Racchapannavar, V.K.: Nanofertilizers for sustainable fruit production: a review. *Environ Chem Lett* 19(2):1693–714 (2021)
 22. Khan, M.N., Mohammad, F.: Eutrophication: Challenges and Solutions. In: *Eutrophication: Causes, Consequences and Control* 2:1–262 (2014)
 23. Scherer, L., Pfister, S.: Modelling spatially explicit impacts from phosphorus emissions in agriculture. *Int J Life Cycle Assess* 20(6):785–95 (2015)
 24. Khan, N.: Natural ecological remediation and reuse of sewage water in agriculture and its effects on plant health. *Sewage* (2018)
 25. Harguinteguy, C.A., Cofré, M.N., Fernández-Cirelli, A., Pignata, M.L.: The macrophytes *Potamogeton pusillus* L. and *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. as potential bioindicators of a river contaminated by heavy metals.

- Microchem J 124:228–34 (2016)
26. Monteiro, A.C., França, R.P., Estrela, V.V., Fernandes, S.R., Khelassi, A., Aroma, J., Raimond, K., Iano, Y., Arshaghi, A: UAV-CPSs as a test bed for new technologies and a primer to Industry 5.0, in imaging and sensing for unmanned aircraft systems. Volume 2: Deployment and Applications, Estrela V.V. et al., IET (2020)
 27. Estrela, V.V., Saotome, O., Loschi, H.J., Hemanth, J.D., Farfan, W.S., Aroma, J., Saravanan, C.B., Grata, E.G.H.: Emergency response cyber-physical framework for landslide avoidance with sustainable electronics, MDPI, Technologies 6(2), 42 (2018)
 28. Kerin, M., Pham, D.T.: A review of emerging industry 4.0 technologies in remanufacturing. J Clean Prod 237 (2019)
 29. Vörösmarty, C.J., Osuna, V.R., Cak, A.D., Bhaduri, A., Bunn, S.E., Corsi, F., et al.: Ecosystem-based water security and the Sustainable Development Goals (SDGs). Ecohydrol Hydrobiol 18(4):317–33 (2018)
 30. Cohen-Shacham, E., Walters, G., Janzen, C., Maginnis, S.: Nature-based Solutions to address global societal challenges. Nature-based solutions to address global societal challenges pp.1–32 (2016)
 31. Slobodiuk, S., Niven, C., Arthur, G., Thakur, S., Ercumen, A.: Does irrigation with treated and untreated wastewater increase antimicrobial resistance in soil and water: A systematic review. Int J Environ Res Public Health 18(21) (2021)
 32. Turcios, A.E., Miglio, R., Vela, R., Sánchez, G., Bergier, T., Włodyka-Bergier A., et al.: From natural habitats to successful application - Role of halophytes in the treatment of saline wastewater in constructed wetlands with a focus on Latin America. Environ Exp Bot 190(July) (2021)
 33. Ungureanu, N., Vlăduț, V., Voicu, G.: Water scarcity and wastewater reuse in crop irrigation. Sustain 12(21):1–19 (2020)
 34. Gupta, S.K., Shin, H., Han, D., Hur, H.G., Unno, T.: Metagenomic analysis reveals the prevalence and persistence of antibiotic- and heavy metal-resistance genes in wastewater treatment plant. J Microbiol 56(6):408–15 (2018)
 35. Melendez-Marmolejo, J., Garcia-Saavedra, Y., Galvan-Romero, V., de Leon-Martinez, L., Vargas-Berrones, K., Mejia-Saavedra, J., et al.: 14 Emerging contaminants. Environmental problems associated with antibiotic use. New detection and remediation techniques and legislative perspectives in Latin America. Rev Salud Ambient 20(1):53–61 (2020)
 36. Jaramillo, M.F., Restrepo, I.: Wastewater reuse in agriculture: A review about its limitations and benefits. Sustain 9(10) (2017)
 37. Masi, F., Rizzo, A., Regelsberger, M.: The role of constructed wetlands in a new circular economy, resource oriented, and ecosystem services paradigm. J Environ Manage 216:275–84 (2018)
 38. Sgroi, M., Vagliasindi, F.G.A., Roccaro, P.: Feasibility, sustainability and circular economy concepts in water reuse. Curr Opin Environ Sci Heal 2:20–5 (2018)
 39. Fortunati, S., Morea, D., Mosconi, E.M.: Circular economy and corporate social responsibility in the agricultural system: Cases study of the Italian agri-food industry. Agric Econ (Czech Republic) 66(11):489–98 (2020)
 40. Colella, M., Ripa, M., Cocozza, A., Panfilo, C., Ulgiati, S.: Challenges and

- opportunities for more efficient water use and circular wastewater management. The case of Campania Region, Italy. *J Environ Manage* 297(July):113171 (2021)
41. Voulvoulis, N.: Water reuse from a circular economy perspective and potential risks from an unregulated approach. *Curr Opin Environ Sci Heal* 2:32–45 (2018)
 42. Shoushtarian, F., Negahban-Azar, M.: World wide regulations and guidelines for agricultural water reuse: A critical review. *Water (Switzerland)* 12(4) (2020)
 43. Janeiro, C.N., Arsénio, A.M., Brito, R.M.C.L., van Lier, J.B.: Use of (partially) treated municipal wastewater in irrigated agriculture: potentials and constraints for sub-Saharan Africa. *Phys Chem Earth* 118–119:102906 (2020)
 44. Libutti, A., Gatta, G., Gagliardi, A., Vergine, P., Pollice, A., Beneduce, L., et al.: Agro-industrial wastewater reuse for irrigation of a vegetable crop succession under Mediterranean conditions. *Agric Water Manag* 196:1–14 (2018)
 45. Goonetilleke, A., Vithanage, M.: Water resources management: Innovation and challenges in a changing world. *Water (Switzerland)* 9(4):1–5 (2017)
 46. Fito, J., Van Hulle, S.W.H.: Wastewater reclamation and reuse potentials in agriculture: towards environmental sustainability. *Environ Dev Sustain* 23(3):2949–72 (2021)
 47. FAO: Reutilización de aguas para agricultura en América Latina y el Caribe: Estado, principios y necesidades. Santiago de Chile (2017)
 48. Moscoso, J.: Manual de buenas prácticas para el uso seguro y productivo de las aguas residuales domésticas. Autoridad Nacional del Agua (ANA) y Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2016)
 49. FAO: Wastewater treatment and use in agriculture - FAO irrigation and drainage paper 47. Rome (1992)
 50. Alcalde-Sanz, L., Gawlik, B.M.: Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge - Towards a legal instrument on water reuse at EU level. EU Science Hub - European Commission. 57 p. (2017)
 51. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua): Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. Diseño de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales: zonas rurales, periurbanas y desarrollos ecoturísticos. México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2018)
 52. Pinzón, G.L.A.: El reúso de aguas residuales en Colombia. *Derecho aguas Tomo VII* (2017)
 53. Salgot, M., Folch, M.: Wastewater treatment and water reuse. *Curr Opin Environ Sci Heal* 2:64–74 (2018)
 54. World Health Organization (WHO): Planificación de la seguridad del saneamiento. Manual para el uso y la disposición seguros de aguas residuales, aguas grises y excretas. ISBN 978 92 4 354924 8 OMS (2006)
 55. Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H.A., Khalil, H.P.S.A.: A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *Int J Environ Sci Technol* 15(1):243–62 (2018)
 56. Liu, F., Zhang, S., Luo, P., Zhuang, X., Chen, X., Wu, J.: Purification and reuse of non-point source wastewater via *Myriophyllum*-based integrative biotechnology: A review. *Bioresource Technology* 248:3–11 (2018)
 57. Vymazal, J.: Constructed wetlands for wastewater treatment: Five decades of experience. *Environ Sci Technol* 45(1):61–9 (2011)

58. Riggio, V.A., Ruffino, B., Campo, G., Comino, E., Comoglio, C., Zanetti, M.: Constructed wetlands for the reuse of industrial wastewater: A case-study. *J Clean Prod* 171:723–32 (2018)
59. Omidinia-Anarkoli, T., Shayannejad, M.: Improving the quality of stabilization pond effluents using hybrid constructed wetlands. *Sci Total Environ* 801:149615 (2021)
60. Odinga, C.A., Swalaha, F.M., Otieno, F.A.O., Ranjith, K.R., Bux, F.: Investigating the efficiency of constructed wetlands in the removal of heavy metals and enteric pathogens from wastewater. *Environ Technol Rev.* 2(1):1–16 (2013)
61. Ruan, W., Cai, H., Xu, X., Man, Y., Wang, R., Tai, Y., et al.: Efficiency and plant indication of nitrogen and phosphorus removal in constructed wetlands: A field-scale study in a frost-free area. *Sci Total Environ* 799:149301 (2021)
62. Grimblatt V.: IoT for Agribusiness: An overview. *IEEE 11th Lat Am Symp Circuits Syst LASCAS* 1–4. (2020)
63. Zheng, Y., Sun, Z., Liu, Y., Cao, T., Zhang, H., Hao, M., et al.: Phytoremediation mechanisms and plant eco-physiological response to microorganic contaminants in integrated vertical-flow constructed wetlands. *J Hazard Mater* 424:127611 (2021)
64. Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C.: Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol* 32(11):1–18 (2016)
65. Pandey, P.K., Sharma, S.K., Sambhi, S.S.: Removal of lead(II) from waste water on zeolite-NaX. *J Environ Chem Eng* 3(4):2604–10 (2015)
66. Imran, M., Zulfiqar, S., Saeed, H., Shakoori, F.R.: Multi metal resistant *Klebsiella pneumoniae* KW is an efficient copper accumulator and bioremediator of industrial wastewater maimoona. *Pakistan J Zool.* 53(6):2175–82 (2021)
67. Han, S., Li, J., Zhou, Q., Liu, G., Wang, T.: Harmless disposal and resource utilization of wastes from the lake in China: dewatering, composting and safety evaluation of fertilizer. *Algal Res* 43:101623 (2019)
68. Gonçalves, E.C.B.M., Moura, F.J., Teixeira, M.A.: *Cyperus giganteus* pruning residues from constructed wetlands: potential for energy production. *J Clean Prod* 325:129319 (2021)
69. Sultana, M.Y., Akrotos, C.S., Pavlou, S., Vayenas, D.V.: Chromium removal in constructed wetlands: A review. *Int Biodeterior Biodegrad* 96:181–90. (2014)
70. Wang, Q., Hu, Y., Xie, H., Yang, Z.: Constructed wetlands: a review on the role of radial oxygen loss in the rhizosphere by macrophytes. *Water* 10(6). (2018)
71. Sharma, S., Singh, B., Manchanda, V.K.: Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environ Sci Pollut Res* 22(2):946–62. (2015)
72. Bi, R., Zhou, C., Jia, Y., Wang, S., Li, P., Reichwaldt, E.S., et al.: Giving water bodies the treatment they need: a critical review of the application of constructed floating wetlands. *J Environ Manage* 238:484–98 (2019)
73. Vymazal, J.: Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. *Ecol Eng* 61:582–92 (2013)
74. Sundaravadivel, M., Vigneswaran, S.: Constructed wetlands for wastewater

- treatment. *Crit Rev Environ Sci Technol* 31(4):351–409 (2001)
75. Dhote, S., Dixit, S.: Water quality improvement through macrophytes - a review. *Environ Monit Assess* 152(1–4):149–53 (2009)
 76. Pang, S., Zhang, S., Lv, X.Y., Han, B., Liu, K., Qiu, C., et al.: Characterization of bacterial community in biofilm and sediments of wetlands dominated by aquatic macrophytes. *Ecol Eng* 97:242–50 (2016)
 77. Rezania, S., Taib, S.M., Md Din, M.F., Dahalan, F.A., Kamyab, H.: Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *J Hazard Mater* 318:587–99 (2016)
 78. Ansari, A.A., Naeem, M., Gill, S.S., AlZuaibr, F.M.: Phytoremediation of contaminated waters: an eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. *Egypt J Aquat Res* 46(4):371–6 (2020)
 79. Stefanakis, A.I.: Constructed wetlands for sustainable wastewater treatment in hot and arid climates: opportunities, challenges and case studies in the Middle East. *Water* 12(6) (2020)
 80. Li, X., Yang, L., Xu, K., Bei, K., Zheng X, Lu S, et al.: Application of constructed wetlands in treating rural sewage from source separation with high-influent nitrogen load: a review. *World J Microbiol Biotechnol* 37(8):1–8 (2021)
 81. Klink, A., Macioł, A., Wisłocka, M., Krawczyk, J.: Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L. (cattail) and their potential use in bioindication. *Limnologica* 43(3):164–8 (2013)
 82. Rana, V., Maiti, S.K.: Municipal wastewater treatment potential and metal accumulation strategies of *Colocasia esculenta* (L.) Schott and *Typha latifolia* L. in a constructed wetland. *Environ Monit Assess* 190(6) (2018)
 83. Jeke, N.N., Zvomuya, F., Cicek, N., Ross, L., Badiou, P.: Nitrogen and phosphorus phytoextraction by Cattail (*Typha* spp.) during wetland-based phytoremediation of an end-of-life municipal lagoon. *J Environ Qual* 48(1):24–31 (2019)
 84. Hejna, M., Moscatelli, A., Stroppa, N., Onelli, E., Pilu, S., Baldi, A., et al.: Bioaccumulation of heavy metals from wastewater through a *Typha latifolia* and *Thelypteris palustris* phytoremediation system. *Chemosphere* 241:125018 (2020)
 85. Singh, S., Chakraborty, S.: Bioremediation of acid mine drainage in constructed wetlands: aspect of vegetation (*Typha latifolia*), loading rate and metal recovery. *Miner Eng* 171:107083 (2021)
 86. Bonanno, G.: Comparative performance of trace element bioaccumulation and biomonitoring in the plant species *Typha domingensis*, *Phragmites australis* and *Arundo donax*. *Ecotoxicol Environ Saf* 97:124–30 (2013)
 87. Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Di Luca, G.A., Maine, M.A.: Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicol Environ Saf* 105(1):90–6 (2014)
 88. Mishra, J., Singh, R., Arora, N.K.: Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Front Microbiol* 8:1–7 (2017)
 89. Sricoth, T., Meeinkuir, W., Pichtel, J., Taeprayoon, P., Saengwilai, P.: Synergistic phytoremediation of wastewater by two aquatic plants (*Typha angustifolia* and *Eichhornia crassipes*) and potential as biomass fuel. *Environ*

- Sci Pollut Res 25(6):5344–58 (2018)
90. Malar, S., Sahi, S.V., Favas, P.J.C., Venkatachalam, P.: Mercury heavy-metal-induced physiochemical changes and genotoxic alterations in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. Environ Sci Pollut Res 22(6):4597–608 (2015)
 91. Zahoor, A., Ahmad, F., Hameed, M., Basra S.M.A.: Structural and functional aspects of photosynthetic response in *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms under cadmium stress. Pakistan J Bot 50(2):489–93 (2018)
 92. Chakrabarty, T., Afrin, R., Mia, M.Y., Hossen, M.Z.: Phytoremediation of chromium and some chemical parameters from tannery effluent by using water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). Res Agric Livest Fish 4(3):151–6 (2017)
 93. Melignani, E., de Cabo, L.I., Faggi, A.M.: Copper uptake by *Eichhornia crassipes* exposed at high level concentrations. Environ Sci Pollut Res 22(11):8307–15 (2015)
 94. Suryandari, M.K., Hariati, A.M., Mahmudi, M.: Removal of lead from water by *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. Imp J Interdiscip Res. 3:2387–92 (2017)
 95. Jayaweera, M.W., Kasturiarachchi, J.C., Kularatne, R.K.A., Wijeyekoon, S.L.J.: Removal of aluminium by constructed wetlands with water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutritional conditions. J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng 42(2):185–93 (2007)
 96. Jayaweera, M.W., Kasturiarachchi, J.C., Kularatne, R.K.A., Wijeyekoon, S.L.J.: Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. J Environ Manage 87(3):450–60 (2008)
 97. Estrella-Gómez, N.E., Sauri-Duch, E., Zapata-Pérez, O., Santamaría, J.M.: Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. Environ Exp Bot 75:188–94 (2012)
 98. Wolff, G., Pereira, G., Castro, E., Louzada, J., Coelho, F. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. Brazilian J Biol 72(1):71–7 (2012)
 99. Bizzo, A.L.T., Intorne, A.C., Gomes, P.H., Suzuki, M.S., Esteves, B. dos S.: Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. Acta Limnol Bras 26(3):268–77 (2014)
 100. Ng, Y.S., Chan, D.J.C.: Phytoremediation capabilities of *Spirodela polyrhiza*, *Salvinia molesta* and *Lemna* sp. in synthetic wastewater: a comparative study. Int J Phytoremediation 20(12):1179–86 (2018)
 101. Otomo, J.I., de Jesus, T.A. Coelho, L.H.G., Monteiro, L.R., Hunter, C., Helwig, K., et al.: Effect of eight common Brazilian drugs on *Lemna minor* and *Salvinia auriculata* growth. Environ Sci Pollut Res 28(32):43747–62 (2021)
 102. Jayasri, M.A., Suthindhiran, K.: Effect of zinc and lead on the physiological and biochemical properties of aquatic plant *Lemna minor*: its potential role in phytoremediation. Appl Water Sci 7(3):1247–53 (2017)
 103. Ceschin, S., Sgambato, V., Ellwood, N.T.W., Zuccarello, V.: Phytoremediation performance of *Lemna* communities in a constructed wetland system for wastewater treatment. Environ Exp Bot 162:67–71 (2019)
 104. Radulovic, O., Stankovic, S., Uzelac, B., Tadic, V., Trifunovic-Momcilov, M.,

- Lozo, J., et al.: Phenol removal capacity of the common duckweed (*Lemna minor* L.) and six phenol-resistant bacterial strains from its rhizosphere: in vitro evaluation at high phenol concentrations. *Plants* 9(5991–17) (2020)
105. Seifi, A., Dehghani, M.: Influence of nano-titanium dioxide particles (TiO₂ NPs) on improving phytoremediation efficiency of As/Cu/Cd from copper mine wastewaters using *Lemna minor*. *Arab J Geosci* 14(6) (2021)
 106. Anand, S., Bharti, S.K., Kumar, S., Barman, S.C., Kumar, N.: Phytoremediation of heavy metals and pesticides present in water using aquatic macrophytes 89–119 p (2019)
 107. Kodituwakku, K.A.R.K., Yatawara, M.: Phytoremediation of industrial sewage sludge with *Eichhornia crassipes*, *Salvinia molesta* and *Pistia stratiotes* in batch fed free water flow constructed wetlands. *Bull Environ Contam Toxicol* 104(5):627–33 (2020)
 108. Jasrotia, S., Kansal, A., Mehra, A.: Performance of aquatic plant species for phytoremediation of arsenic-contaminated water. *Appl Water Sci* 7(2):889–96 (2017)
 109. de Oliveira, M., Atalla, A.A., Frihling, B.E.F., Cavalheri, P.S., Migliolo, L., Filho, F.J.C.M.: Ibuprofen and caffeine removal in vertical flow and free-floating macrophyte constructed wetlands with *Heliconia rostrata* and *Eichhornia crassipes*. *Chem Eng J* 373:458–67 (2019)
 110. Dhir, B., Srivastava, S.: Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. *Ecol Eng* 37(6):893–6 (2011)
 111. Mandal, C., Bera, S., Dey, N., Adak, M.: Physiological alterations of *Salvinia natans* L. exposed to aluminium stress and its interaction with polyamine. *Plant Sci Today* 3(2):195 (2016)
 112. Panfili, I., Bartucca, M.L., Ballerini, E., Del Buono, D.: Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. *Sci Total Environ* 601–602:1263–70 (2017)
 113. Sandoval, L., Zamora-Castro, S.A., Vidal-Álvarez, M., Marín-Muñiz, J.L.: Role of wetland plants and use of ornamental flowering plants in constructed wetlands for wastewater treatment: a review. *Appl Sci* 9(4):1–17 (2019)
 114. Ohore, O.E., Qin, Z., Sanganyado, E., Wang, Y., Jiao, X., Liu, W., et al.: Ecological impact of antibiotics on bioremediation performance of constructed wetlands: microbial and plant dynamics, and potential antibiotic resistance genes hotspots. *J Hazard Mater* 424:127495 (2022)
 115. Mothé, G.P.B., Quintanilha-Peixoto, G., Souza, G.R., Ramos, A.C., Intorne, A.C.: Overview of the role of nitrogen in copper pollution and bioremediation mediated by plant-microbe interactions. In: *Soil Nitrogen Ecology*. Springer p. 249–64 (2021)
 116. Barroso, L.M.: Interação de planta aquática e microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre, (2018)
 117. Silva, J.T. de S.: Promoção do crescimento de *Salvinia auriculata* Aublet mediada por *Enterobacter* sp. sob estresse por cobre, (2019)
 118. Orozimbo, K.B. da S.: Bactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas da planta aquática *Salvinia auriculata* com resistência a chumbo, (2020)
 119. Wang, D., Bai, Y., Qu, J.: The *Phragmites* root-inhabiting microbiome: a critical review on its composition and environmental application. *Engineering* 2021

120. Knapp, S., Schmauck, S., Zehnsdorf, A.: Biodiversity impact of green roofs and constructed wetlands as progressive eco-technologies in urban areas. *Sustain* 11(20) (2019)
121. Yozzo, D.J., Osgood, D.T.: Invertebrate communities of low-salinity wetlands: overview and comparison between *Phragmites* and *Typha* marshes within the hudson river estuary. *Estuaries and Coasts* 36(3):575–84 (2013)
122. Meng, P., Pei, H., Hu, W., Shao, Y., Li, Z.: How to increase microbial degradation in constructed wetlands: influencing factors and improvement measures. *Bioresour Technol* 157:316–26 (2014)
123. Qiu, Z., Egidi, E., Liu, H., Kaur, S., Singh, B.K.: New frontiers in agriculture productivity: optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnol Adv* 37(6) (2019)
124. Lee, D.J., Show, K.Y., Wang, A.: Unconventional approaches to isolation and enrichment of functional microbial consortium - a review. *Bioresour Technol* 136:697–706 (2013)
125. Datta, S., Rajnish, K.N., Samuel, M.S., Pugazhendhi, A., Selvarajan, E.: Metagenomic applications in microbial diversity, bioremediation, pollution monitoring, enzyme and drug discovery. a review. *Environ Chem Lett* 18(4):1229–41 (2020)
126. Zhen, Z., Yan, C., Zhao, Y.: Influence of epiphytic bacteria on arsenic metabolism in *Hydrilla verticillata*. *Environ Pollut* 261:114232 (2020)
127. Pandey, A., Tripathi, P.H., Tripathi, A.H., Pandey, S.C., Gangola, S.: Omics technology to study bioremediation and respective enzymes smart bioremediation technologies: microbial enzymes. Elsevier Inc. 23–43 p. (2019)
128. Chandran, H., Meena, M., Sharma, K.: Microbial biodiversity and bioremediation assessment through omics approaches. *Front Environ Chem* 1:1–22 (2020)
129. Marzan, L.W., Hossain, M., Mina, S.A., Akter, Y., Chowdhury, A.M.M.A.: Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: bioremediation viewpoint. *Egypt J Aquat Res* 43(1):65–74 (2017)
130. Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., et al.: The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol Biochem* 60:182–94 (2013)
131. Rodriguez-Dominguez, M.A., Konnerup, D., Brix, H., Arias, C.A.: Constructed wetlands in Latin America and the Caribbean: a review of experiences during the last decade. *Water* 12(6) (2020)
132. Maine, M.A., Sánchez, G.C., Hadad, H.R., Caffaratti, S.E., Pedro, M.D.C, Luca, G.A.D, et al.: Humedales construidos para tratamiento de efluentes de industrias metalúrgicas en Santa Fe, Argentina. *Tecnol y Ciencias del Agua* 7(1):5–16 (2016)
133. Noyola, A., Padilla-Rivera, A., Morgan-Sagastume, J.M., Güereca, L.P., Hernández-Padilla, F.: Typology of municipal wastewater treatment technologies in Latin America. *Clean - Soil, Air, Water* 40(9):926–32 (2012)
134. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación.

- México D. F. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2019)
135. FAO: Reutilización del agua en la agricultura: ¿Beneficios para todos?. Informe sobre temas hídricos. Roma, Italia (2014)
 136. Curty, A.F.: Recovery of urban landscape and biodiversity through phytoremediation I:61–7 (2021)
 137. de Souza, F.P., Azevedo, J.P.S.: An overview of urban lagoons in Rio de Janeiro: relevant aspects in the management of Rodrigo de Freitas and Araruama lagoons and the Jacarepaguá lagoon system. *Eng Sanit e Ambient* 25(1):197–204 (2020)
 138. García, J.A., Paredes, D., Cubillos, J.A.: Effect of plants and the combination of wetland treatment type systems on pathogen removal in tropical climate conditions. *Ecol Eng* 58:57–62 (2013)
 139. Avellán, C.T., Rousseau, D.P.L., Lens, P.N.L.: Adapting to socioeconomic, operational and environmental challenges of dairy farm effluent purification in Uruguay through the use of surface flow constructed wetlands. *Water Pract Technol* 6(3) (2011)
 140. Maine Hrhma: Memorias de la III conferencia panamericana de sistemas de humedales para el tratamiento y mejoramiento de la calidad del agua. In: Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua (2016)
 141. Boursianis, A.D., Papadopoulou, M.S., Gotsis, A., Wan, S., Sarigiannidis, P., Nikolaidis, S., et al.: Smart irrigation system for precision agriculture - the AREThOU5A IoT Platform. *IEEE Sens J* 21(16):17539–47 (2021)
 142. Gagliardi, G., Lupia, M., Cario, G., Gaccio, F.C., Angelo, V.D., Cosma, A.I.M., et al.: An Internet of Things Solution for smart agriculture. *Agronomy* 11(2140):1–18 (2021)
 143. Winkler, R.: MeteoMex: open infrastructure for networked environmental monitoring and agriculture 4.0. *PeerJ Comput Sci* 7:1–23 (2021)
 144. Sharma, N., Chandrasekar, S., Sundar, K.: Suitability of ANN and GP for predicting soak pit tank efficiency under limited data conditions. *MATEC Web Conf.* 203 (2018)
 145. Nanda, I., Shukla, V.K., Dhanekula, V.J, Gadipudi, M., Penugonda, V., Maloji, S.: Design and real time implementation of smart water management using LabVIEW and IoT. *Proc 2nd IEEE Int Conf Comput Intell Knowl Econ* 524–8 (2021)
 146. Ramesh, M.V., Nibi, K.V., Kurup, A., Mohan, R., Aiswarya, A., Arsha, A., et al.: Water quality monitoring and waste management using IoT. *GHTC 2017 - IEEE Glob Humanit Technol Conf Proc* 1–7 (2017)
 147. Rotondi, D., Straniero, L., Saltarella, M., Balducci, F., Impedovo, D., Pirlo, G.: Semantics for wastewater reuse in agriculture. *Conf Proc - IEEE Int Conf Syst Man Cybern* 598–603 (2019)
 148. Ar, I.M.: The impact of green product innovation on firm performance and competitive capability: the moderating role of managerial environmental concern. *Procedia Soc Behav Sci*, 62:854-864 (2012)
 149. Muthukrishnan, L.: An overview on the nanotechnological expansion, toxicity assessment and remediating approaches in Agriculture and Food industry. *Environ Technol Innov*, 102136 (2021)

150. Estrela, V.V., Hemanth, J., Saotome, O., Nikolakopoulos G., Sabatini, R.: Imaging and Sensing for Unmanned Aircraft Systems: Deployment and Applications, 2, ISBN 978-1-78561-6440 (2020)
151. Pal, P.: Nanotechnology in water treatment. *Industrial Water Treatment*, 513-536 (2017)
152. Razmjoooy, N., Estrela, V.V.: Applications of image processing and soft computing systems in agriculture. IGI Global (2019)
153. Hemanth J., Estrela V.V.: Deep learning for image processing applications. *Advances in Parallel Computing*, IOS Press, Amsterdam, Netherlands, 31, ISSN 978-1-61499-822-8 (2017)
154. Wongburi, P., Park, J.K.: Big Data analytics from a wastewater treatment plant. *Sustainability*. 13, 12383 (2021)
155. Estrela, V.V., Hemanth J., Loschi, H.J., Nascimento, D.A., Iano, Y., Razmjoooy, N.: Computer vision and data storage in UAVs. In: *Imaging and sensing for unmanned aircraft systems*, 2(1):23-46, IET, London, UK, (2020)
156. Estrela, V. V., Andreopoulos, N., Sroufer, R., de Jesus, M.A., Mamani, W.D.H., Peixoto, A.: Transmedia Ecosystems, Quality of Experience and Quality of Service in Fog Computing for Comfortable Learning. Em: 2021 IEEE Global Engineering Education Conference (EDUCON). pp. 1003–1009. IEEE (2021)
157. Sen Gupta, Y., Mukherjee, S., Dutta, R., Bhattacharya, S.: A blockchain-based approach using smart contracts to develop a smart waste management system. *Int J Environ Sci Techno*, 1-24 (2021)
158. Khan, A.A., Laghari, A.A., Shaikh, A.A., Dootio, M.A., Estrela, V. V., Lopes, R.T.: A blockchain security module for brain-computer interface (BCI) with Multimedia Life Cycle Framework (MLCF). *Neurosci. Informatics*, 2, 100030 (2022)