

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

***Serratia marcescens* resistente ao manganês e estratégias para
biorremediação de ambientes contaminados**

Pollyana Santos Queiroz

Dezembro-2018

Ouro Preto- Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

***Serratia marcescens* resistente ao manganês e estratégias para
biorremediação de ambientes contaminados**

Orientador (a): Prof^a Dra Renata Guerra de Sá

Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Genômica e Proteômica.

Dezembro-2018

Ouro Preto- Minas Gerais

Q32s Queiroz, Pollyana Santos.
Serratia marcescens resistente ao manganês e estratégias para
biorremediação de ambientes contaminados [manuscrito] / Pollyana Santos
Queiroz. - 2018.
97f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Guerra-Sá.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Serratia marcescens. 2. Manganês - Remoção. 3. Proteômica. I. Guerra-Sá,
Renata. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 546.71-048.38

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 17 dias do mês de dezembro do ano de 2018, às 13:30 horas, nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (Iceb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Pollyana Santos Queiroz, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Renata Guerra de Sá Cola (Presidente - UFOP), pelo Prof. Aristóteles Góes Neto (Membro - Externo), pelo Prof. Elio Hideo Baba (Membro - Externo), pelo Prof. Milton Hercules Guerra de Andrade (Membro - UFOP), pela Profa. Patricia de Abreu Moreira (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Pollyana Santos Queiroz 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Serratia Marcescens Resistente ao Manganês e Estratégias para Biorremediação de Ambientes Contaminados", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 17 de dezembro de 2018.

Presidente: Renata Guerra de Sá Cola

Membro: Patricia de Abreu Moreira

Membro: Milton Hercules Guerra de Andrade

Membro: ce. he s.c.

Membro: Aristóteles Góes Neto

Doutorando: Pollyana Santos Queiroz

Dedico este trabalho a minha mãe, Ana Maria, que foi meu apoio, minha fonte de amor e sabedoria, que me ajudou a superar as adversidades nessa trajetória com suas sábias palavras, positividade e carinho, e me ensinou antes de tudo a ser grata em todas as situações. Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ser minha fonte de força, fé e esperança na vida. Sem Ele nada disso seria possível;

A minha família, meus pais Werton e Ana Maria, e meus irmãos Fernando e Ana Flávia, pelo amor e por acreditar em mim e nas minhas escolhas;

A minha orientadora prof.^a Dr. Renata Guerra pela oportunidade de realizar esse trabalho e por confiar a mim essa responsabilidade. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, pelos bons papos sobre a vida, pelas cobranças, broncas que certamente contribuíram para o meu amadurecimento e comprometimento profissional;

A Nat, por dividir seus conhecimentos comigo para a realização desse trabalho, por não ser somente uma colega e parceira de laboratório, mas ter se tornado uma grande amiga. A sua dedicação, compromisso e cuidado com tudo que faz foi uma inspiração. Obrigada por tudo;

Ao prof. Dr. Versiane pela oportunidade e por ter concedido o seu laboratório para a realização de alguns experimentos desse trabalho. Assim, como os demais laboratórios da UFOP, o laboratório de Enzimologia e Proteômica, no qual foi realizada uma boa parte desse trabalho. Obrigada prof. William e o técnico Bruno pelo suporte;

Aos colegas do laboratório LBBM, Ester, Viviano, Victor, Luiza, Débora, Regina, Grazi, Talita, Thales, Luciene e Daiane pelos conhecimentos compartilhados e por dividir tantos momentos comigo. Agradeço especialmente, as amigas France e Isabela pelo companheirismo e amizade fora do laboratório e Mônica pelo carinho;

Aos queridos colegas do laboratório LabGiba, prof. Dr. Leandro, Érika, Camila, Washington, Natasha e Angélica; do laboratório de Hidrometalurgia, Renatinha, Angel, Felipe, Andreia, Lili e demais alunos, e ao prof. Dr. Elísio. Obrigada por terem me recebido tão bem;

A minha amiga Sú por ter sido minha companheira em mais uma jornada dessa vida; a Pat, pelo carinho e amizade. Além disso, minhas queridas amigas de Moc que mesmo distante se fizeram presentes.

Aos amigos que ganhei nessa linda cidade, Ouro Preto: Gustavo, Jéssica, Isabela, Gilson, Diogo e Françoise (casa verde e vermelha); Gleise, Dani, Eliza (in memoriam), Lud, Maria e Milede pelo companheirismo e amizade. Aos demais amigos da pós, Ana, Laís, Priscila, Glenda, Elisa e Emília por compartilhar tantos momentos bons e divertidos.

Ao CNPq, FAPEMIG, Vale e UFOP, pelo financiamento e apoio oferecido;

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Olhar para trás após uma longa caminhada pode fazer perder a noção da distância que percorremos, mas se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos de quanto nos custou chegar até o ponto final, e hoje temos a impressão de que tudo começou ...”

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Contaminação ambiental por metais pesados.....	3
2.2 Manganês.....	4
2.2.1 Aspectos gerais, estados de oxidação e fontes de manganês.....	4
2.2.2 Manganês no Brasil e impactos do manganês na água e toxicidade.....	5
2.3 Métodos de remoção de Mn.....	6
2.3.1 Remoção físico-química.....	6
2.3.2 Remoção biológica.....	7
2.3.2.1 Bactérias e seus mecanismos na oxidação do Mn (II).....	9
2.3.2.1.1 Biosorção.....	9
2.3.2.1.2 Biomineralização: via direta e indireta.....	9
2.3.2.2 Bactérias do gênero <i>Serratia</i>	12
2.4 Análises proteômicas para verificação de alterações moleculares causadas pela presença de metais.....	15
3. Relevância e hipótese.....	17
4. Objetivos.....	18
4.1 Objetivo geral.....	18
4.1.1 Objetivos específicos.....	18

5. CAPÍTULO I Meio de crescimento rico promove aumento na remoção de Mn (II) e na produção de óxido de manganês por cepas de <i>Serratia marcescens</i> isoladas de efluentes.....	19
I.1 Introdução.....	20
I.2 Materiais e métodos.....	22
I.2.1 Cepas bacterianas.....	22
I.2.2 Identificação da cepa LG1: Sequenciamento do rDNA 16S bacteriano.....	22
I.2.3 Tolerância e influência de Mn (II) no crescimento bacteriano.....	23
I.2.3.1 Avaliação da tolerância ao Mn (II).....	23
I.2.3.2 Influência do Mn (II) no crescimento bacteriano.....	24
I.2.4 Experimentos de oxidação e adsorção.....	24
I.2.4.1 Ensaio de remoção de Mn (II).....	24
I.2.4.2 Ensaio de oxidação de Mn (II).....	25
I.2.4.3 Biosorção de metal pesado por células microbianas mortas.....	25
I.2.4.4 Oxidação de Mn (II) pelo filtrado livre de células.....	25
I.2.5 Microscopia eletrônica: análises de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) e espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS).....	26
I.2.6 Análise estatística.....	26
I.3 Resultados.....	26
I.3.1 Identificação da cepa LG1 e caracterização molecular.....	26
I.3.2 Tolerância e influência de Mn (II) no crescimento bacteriano.....	27
I.3.3 Experimentos de oxidação e adsorção.....	30
I.3.4 Microscopia eletrônica: análises de EDX e EELS.....	34
I.4 Discussão.....	37
I.5 Conclusão.....	40

6. CAPÍTULO II- Alterações na composição proteômica da <i>Serratia marcescens</i> em resposta ao manganês (II).....	41
II.1 Introdução.....	42
II.2 Materiais e métodos.....	43
II.2.1 Amostra bacteriana.....	43
II.2.2 Curva de crescimento LG1 e remoção de Mn (II).....	44
II.2.3 Experimentos proteômicos <i>shotgun bottom-up</i>.....	44
II.2.3.1 Extração de proteínas e eletroforese “short run” em gel 1D.....	44
II.2.3.2 Digestão das proteínas e análise no LC-MS /MS.....	45
II.2.4 Processamento de dados e análise bioinformática.....	46
II.2.5 Análise estatística.....	47
II.3 Resultados.....	48
II.3.1 Bio-oxidação de Mn (II) pela cepa LG1.....	48
II.3.2 Proteínas identificadas no proteoma total obtido na ausência e presença de Mn (II): enzima MCO identificada.....	49
II.3.3 Proteínas diferencialmente expressas em ambos os grupos.....	50
II.4. Discussão.....	53
II.5. Conclusão.....	56
7. Capítulo III- Caracterização da prodigiosina produzida pela cepa LG1 e o impacto da concentração do Mn (II) na sua produção.....	57
III.1 Introdução.....	58
III.2 Materiais e Métodos.....	59
III.2.1 <i>Serratia marcescens</i> LG1 e extração da prodigiosina.....	59
III.2.2 Quantificação e caracterização do pigmento por LC-MS/MS.....	60
III.2.3 Avaliação da influência do Mn (II) na produção de prodigiosina.....	60

III.3 Resultados e Discussões.....	61
III.3.1 Caracterização da prodigiosina.....	61
III.3.2 Avaliação da influência do Mn (II) na produção de prodigiosina.....	63
III.4 Conclusão.....	64
8. Conclusão geral.....	66
9. Contribuição ao conhecimento.....	67
10. Referências Bibliográficas.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1-** Molécula de prodigiosina caracterizada por apresentar um esqueleto comum com três anéis tipo pirrole (Williams, 1973).....13
- Figura I.1-** Identificação filogenética da cepa LG1 com número de acesso do GenBank MG855665.....28
- Figura I.2-** Tolerância ao Mn (II) das cepas LG1 e CL11 nos meios NB e K (A-D)....29
- Figura I.3-** Influência do Mn (II) no crescimento de LG1 e CL11 nos meios NB e K. A: LG1 em meio NB; B: LG1 em meio K; C: CL11 em meio NB; D: CL11 em meio K...30
- Figura I.4-** Remoção de Mn (II) pelos isolados LG1 e CL11 em meio NB e K. A: LG1 em meio NB; B: LG1 em meio K; C: CL11 em meio NB; D: CL11 em meio K (▲ - pH; ● - remoção de Mn (II); ■ - crescimento bacteriano).....31
- Figura I.5-** Experimento de remoção de Mn (II) utilizando células mortas das cepas LG1 e CL11 em meio NB e K. A: LG1 em meio NB; B: LG1 em meio K; C: CL11 em meio NB; D: CL11 em meio K.....33
- Figura I.6-** Experimento de remoção de Mn (II) utilizando filtrados livres de células dos isolados LG1 e CL11 em meio NB e K. A: LG1 em meio NB; B: LG1 em meio K; C: CL11 em meio NB; D: CL11 em meio K.....34
- Figura I.7-** Microscopia eletrônica do isolado LG1 cultivado em meio NB (A) e K (B) na presença ou ausência de 40 mg L^{-1} Mn (II) por oito dias. Não foram encontradas diferenças estruturais nas células LG1 através da análise de MEV e MET e a análise de EDX não detectou Mn dentro ou fora das células LG1 crescidas em meio NB e K.....35
- Figura I.8-** Microscopia eletrônica do isolado CL11 cultivado em meio NB (A) e K (B) na presença ou ausência de 40 mg L^{-1} Mn (II) por oito dias. Não foram encontradas diferenças estruturais nas células CL11 através da análise MEV e MET, mas a análise MET / EDX encontrou uma precipitação extracelular de uma fase mineral contendo Mn no isolado CL11 cultivado em meio K.....35
- Figura I.9-** Espectro de EELS (A) e mapa de Mn (B) revelado das células LG1 cultivadas em meio NB. O espectro de EELS mostrou um pico em uma região entre os valores de energia de oxigênio (532 eV) e Mn (651 eV), que pode ser atribuída a uma espécie de Mn oxidada representada pelo mapa de Mn. A cor branca representa manganês e a cor preta representa o oxigênio.....36
- Figura I.10-** Resultado da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) dos isolados de CL11 cultivados em meio K com 40 mg L^{-1} de Mn (II).....36
- Figura II.1-** Crescimento de *S. marcescens* LG1 na ausência e presença de alta concentração de Mn (II) (40 mg/L) por 48 h. A cepa LG1 cresceu igualmente bem sob ambas as condições, demonstrando tolerância ao Mn (II).....48

Figura II.2- Remoção de Mn (II) por <i>S. marcescens</i> LG1 durante 48 h. À medida que o número de células aumentou, a taxa de remoção de Mn (II) também aumentou.....	49
Figura II.3- Categorização das proteínas totais de <i>S. marcescens</i> LG1 pelo Blast2GO em componente celular (A), função molecular (B) e processo biológico (C).....	50
Figura II.4- Mapa de calor das proteínas de <i>S. marcescens</i> LG1 upreguladas e downreguladas na ausência (controle) e presença de Mn (II). Vermelho indica maior expressão e verde menor expressão das proteínas.....	52
Figura III.1- Procedimento de extração do pigmento prodigiosina.....	60
Figura III.2- Espectro de massas MS1 da cepa <i>Serratia marcescens</i> LG1 (aquisição de m/z de 100.0000a 500.0000).....	61
Figura III.3- Espectro de massas MS2 da cepa <i>Serratia marcescens</i> LG1 (aquisição de m/z de 100.0000a 500.0000, precursor m/z: 324.2070 ± 3.0000 Da).....	62
Figura III.4- Principais vias de fragmentação da prodigiosina e seus valores m/z. MS1 324; MS2 309 e MS3 149. (Fonte: Chen et al., 2008).....	62
Figura III.5- Crescimento da <i>Serratia marcescens</i> LG1 em placas contendo Mn (II) e Pb. A: LG1 nas concentrações 0, 50 e 100 mg/L de Mn (II); B: LG1 nas concentrações 0; 0,025; 50 e 100 mg/L de Pb.....	63
Figura III.6- Influência das concentrações 0, 50 e 100 mg. L ⁻¹ de Mn (II) na produção de prodigiosina.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 - Remoção de Mn (II) e concentrações médias de óxido de Mn apresentadas pela cepa LG1 em meio NB e K em triplicata.....	32
Tabela I.2 - Remoção de Mn (II) e concentrações médias de óxido de Mn apresentadas pela cepa CL11 em meio NB e K em triplicata.....	32
Tabela II.1 - Proteínas identificadas como upreguladas na presença de Mn (II) e informações sobre acesso do Uniprot, nome da proteína, gene, função, localização subcelular e massa (Da).....	51

RESUMO

O manganês (II) solúvel que tem sido associado a uma crescente contaminação de corpos aquáticos e problemas de saúde humana devido à sua toxicidade. Na busca por estratégias ecologicamente adequadas para a sua remoção, podemos destacar os isolados de *Serratia marcescens*, que teve seu potencial demonstrado na remoção de altas concentrações desse metal. Como forma de melhorar a eficiência de remoção de Mn (II) dessa espécie, um meio de cultura rico em nutrientes (meio NB) suplementado com Mn (II) foi comparado com um meio pobre em nutrientes (meio K) para avaliar a sua influência no processo de remoção por duas diferentes cepas, uma não pigmentada (CL11) e outra pigmentada (LG1) que ainda não tinha sido estudada. Uma vez que um meio rico pode favorecer um maior crescimento bacteriano, uma maior remoção de Mn (II) pode ocorrer. No meio NB, a cepa LG1 e a cepa CL11 exibiram um melhor crescimento e maior tolerância ao Mn (II) (0-2000 mg L⁻¹). Além disso, uma melhor remoção de Mn (II) (64,25%) e o aumento da formação de óxidos de Mn foram observados neste meio, especialmente para o isolado LG1. A análise de EELS revelou Mn no interior da célula de LG1 e a análise de EDX revelou Mn fora da célula de CL11, indicando que as duas cepas removem Mn (II) através de mecanismos distintos. A biooxidação de Mn pelo isolado CL11 parece envolver mecanismos indiretos que alteram o pH do meio, enquanto o isolado LG1 parece usar um mecanismo direto para a biooxidação mediada por componentes celulares, como proteínas intracelulares. É a primeira vez que o alto potencial do meio NB para remoção de Mn é demonstrado. Este meio influenciou em uma melhor remoção de Mn e na formação de óxidos, especialmente no caso do isolado LG1 pigmentado. Como a cepa LG1 apresentou um potencial diferenciado na bio-oxidação de Mn (II), o seu proteoma foi analisado na ausência e presença de Mn (II) através da abordagem *shotgun*, para obter informações sobre como as bactérias respondem a esse metal e identificar as proteínas envolvidas na sua oxidação. A cepa LG1, que cresceu igualmente bem nas duas condições, expressou um conjunto de proteínas relacionadas aos processos celulares vitais para a sobrevivência, bem como proteínas envolvidas na adaptação e tolerância ao Mn (II). A multicobre oxidase CueO foi identificada, indicando sua provável participação na biooxidação de Mn (II), no entanto, sua expressão não foi modulada pela presença desse metal. Um conjunto de proteínas relacionadas aos processos celulares e metabólicos vitais para as células foram reguladas negativamente na presença de Mn (II), enquanto as proteínas relacionadas à membrana celular envolvidas na manutenção da integridade celular e sobrevivência sob estresse foram upreguladas sob essa condição. Este estudo permitiu obter o primeiro proteoma total dessa espécie nas condições de ausência de presença de Mn (II). O pigmento prodigiosina sintetizado pela cepa LG1 foi caracterizado e foi possível observar o efeito de elevadas concentrações de Mn (II) na sua produção e o seu efeito protetor para a cepa nessas condições. Entretanto é necessário estudar a relação direta da prodigiosina com a remoção de Mn (II). Em conjuntos, estes resultados demonstram o potencial biotecnológico de isolados de *S. marcescens* na biorremediação de Mn (II) e sugerimos a sua utilização juntamente com o meio NB em grandes biorreatores contínuos para o tratamento de efluentes contaminados com Mn. Além disso, a lista de proteínas expressas identificadas pela análise proteômica pode ser usada como uma ferramenta em experimentos futuros para validar esses achados.

ABSTRACT

Soluble manganese (II) has been associated with increasing contamination of aquatic bodies and human health problems due to its toxicity. In the search for ecologically adequate strategies for their removal, we can highlight the isolates of *Serratia marcescens*, which had its potential demonstrated in the removal of high concentrations of this metal. As a way of improving the Mn (II) removal efficiency of this species, a nutrient rich medium (NB medium) supplemented with Mn (II) was compared with a medium low in nutrients (K medium) to evaluate its influence in the process of removal by two different strains, one non-pigmented (CL11) and one pigmented (LG1) which had not yet been studied. Since a rich medium may favor increased bacterial growth, further removal of Mn (II) may occur. In the NB medium, LG1 strain and CL11 strain exhibited better growth and greater tolerance to Mn (II) (0-2000 mg L⁻¹). In addition, better removal of Mn (II) (64.25%) and increased Mn oxide formation were observed in this medium, especially for LG1 strain. EELS analysis revealed Mn within the LG1 cell and EDX analysis revealed Mn outside the CL11 cell, indicating that the two strains remove Mn (II) through distinct mechanisms. The Mn biooxidation by the CL11 strain seems to involve indirect mechanisms that alter the pH of the medium, while the LG1 strain seems to use a direct mechanism for biooxidation mediated by cellular components, such as intracellular proteins. It is the first time that the high potential of the NB medium for removal of Mn is demonstrated. This medium influenced in better removal of Mn and in the formation of oxides, especially in the case of the pigmented LG1 strain. As the great potential of the LG1 strain in the Mn (II) biooxidation was evident, its proteome was analyzed in the absence and presence of Mn (II) through the shotgun approach, for get information on how the bacteria respond to this metal and identify the proteins involved in its oxidation. The LG1 strain, which grew equally well under both conditions, expressed a set of proteins related to cellular processes vital for survival, as well as proteins involved in adaptation and tolerance to Mn (II). The multi-oxidase CueO was identified, indicating its probable participation in the Mn (II) biooxidation; however, its expression was not modulated by the presence of Mn (II). A set of proteins related to cellular and metabolic processes vital to cells were down-regulated in the presence of Mn (II), while cell membrane-related proteins involved in maintaining cell integrity and survival under stress were upregulated under this condition. This study allowed to obtain the first total proteome of this species in the conditions of absence of presence of Mn (II). The prodigiosin pigment synthesized by LG1 strain was characterized and it was possible to observe the effect of high concentrations of Mn (II) on its production and its protective effect for the strain under these conditions. However, it is necessary to study the direct relation of prodigiosin with the Mn (II) removal. In conclusion, these results demonstrate the biotechnological potential of *S. marcescens* isolates in the Mn (II) bioremediation and we suggest their use together with the NB medium in large continuous bioreactors for the treatment of contaminated Mn effluents. In addition, the list of expressed proteins identified by proteomic analysis can be used as a tool in future experiments to validate these findings.

1 **1. Introdução geral**

2 O manganês (II) é um metal pesado solúvel em água que tem sido associado com
3 o aumento da contaminação dos corpos aquáticos e problemas de saúde humana devido
4 à sua toxicidade (Li et al., 2013; Kornblith et al., 2018; Kafaei et al., 2017). A maneira
5 convencional para removê-lo envolve a utilização de agentes químicos, como oxigênio
6 molecular, cloro e permanganato de potássio que são utilizados para oxidar o Mn (II)
7 solúvel em Mn (III/IV) insolúvel que por sua vez, é removido por filtração. Porém esses
8 métodos físico-químicos podem gerar uma remoção incompleta e subcompostos tóxicos
9 (Di Bernardo e Di Bernardo, 1993; Wang e Han, 2012). Uma alternativa
10 ecologicamente mais adequada é a biorremediação realizada por microrganismos que
11 podem degradar contaminantes tóxicos (Gaylard et al., 2005), promovendo uma
12 remoção cinco vezes mais eficiente (Das et al., 2011) e sem subprodutos nocivos
13 (Gallard e Guten, 2002).

14 Os microrganismos imobilizam os metais principalmente através dos
15 mecanismos de biossorção e biomineralização (Gadd, 2004 e 2010). Na biossorção os
16 metais são captados de forma passiva pelas células microbianas através da formação de
17 complexos com constituintes da parede celular microbiana ou por polímeros
18 extracelulares sintetizados e secretados pelos microrganismos (Gavrilescu, 2004). Na
19 biomineralização, o metal pode ser removido de forma direta mediada por componentes
20 celulares, como enzimas (Brouwers et al., 2000; Tebo et al., 2004 e 2005), e indireta, no
21 qual metabólitos bacterianos e/ou crescimento microbiano alteram as condições de pH e
22 redox do ambiente, resultando na oxidação de Mn (II) (Learman et al., 2011; Nealson,
23 2006). Na via enzimática pode-se destacar as enzimas hemeperoxidase e as do tipo
24 multicobre oxidases (MCO) na oxidação de Mn (II) (Geszvain et al., 2012; Su et al.,
25 2013) que são expressas por algumas bactérias. Essas proteínas podem ser identificadas
26 através de abordagens proteômicas que permite compreender também como as bactérias
27 respondem a presença desse metal.

28 Bactérias do gênero *Serratia* são capazes de remover o Mn e outros metais
29 pesados como níquel, rádio, crômio e cobre tanto por vias diretas envolvendo enzimas
30 quanto por mecanismos indiretos, como a biossorção (Kannan e Ramteke, 2002; Zakeri

31 et al., 2010; Zhang e Li, 2011; Andrezza et al. 2012; Cristani et al., 2012; Barboza et
32 al., 2017). Essas bactérias gram negativas pertencem à família Enterobacteriaceae e são
33 geralmente isoladas no meio ambiente da água, solo, plantas ou insetos. Algumas
34 espécies, como a *S. plymuthica*, *S. rubidaea* e alguns biogrupos de *S. marcescens*
35 (Williamson et al., 2006; Grimont e Grimont, 2006) são capazes de
36 produzirem um pigmento vermelho chamado de prodigiosina, conhecido pelas suas
37 propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoários, e atividades
38 imunossupressoras e anticancerígenas (Li et al., 2015). Esse pigmento também tem sido
39 relacionado com a absorção de metais pesados e elementos radioativos em alguns
40 trabalhos de biorremediação envolvendo espécies de *Serratia* (Kannan e Ramteke,
41 2002; Cristani et al., 2012; Zakeri et al., 2010). A função fisiológica da prodigiosina nos
42 organismos produtores ainda é pouco discutida, mas é sabido que a sua presença pode
43 conferir uma vantagem ecológica (Williamson et al. 2006; Haddix e Shanks, 2018).

44 Os mecanismos utilizados por cepas não pigmentadas de *S. marcescens* na
45 remoção de Mn foram estudados pela primeira vez pelo nosso grupo (Barboza et al.,
46 2017). Neste estudo, duas cepas de *S. marcescens* foram capazes de tolerar e oxidar esse
47 metal de forma biológica através de algum produto do metabolismo microbiano que
48 aumentou o pH do meio e promoveu a oxidação do Mn (II) por um mecanismo indireto.
49 No entanto, não se sabe se isolados pigmentados de *S. marcescens* apresentam um
50 melhor desempenho, e os possíveis mecanismos e proteínas envolvidas na remoção e
51 tolerância ao Mn (II).

52 Uma vez que a expansão da biotecnologia industrial aumentou
53 consideravelmente a necessidade de buscar uma superprodução de cepas microbianas
54 para melhorar a produção e obter melhor rendimento, os resultados encontrados nesse
55 trabalho servirão para demonstrar a promissora aplicabilidade das cepas de *S.*
56 *marcescens* em processos de biorremediação de Mn (II), e seu potencial em produzir
57 enzimas e pigmentos de importância industrial.

58

59

60 **2. Revisão bibliográfica**

61 **2.1 Contaminação ambiental por metais pesados**

62 Os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais preocupantes e
63 frequentes, principalmente pelo desmedido crescimento populacional e pelo aumento
64 das atividades industriais que produzem e fornecem grandes volumes de resíduos de
65 natureza diversa, como espécies químicas de caráter tóxico (Brito et al., 2004). Em
66 consequência disso, os problemas de origem antrópica têm atingido dimensões
67 catastróficas, podendo ser observado no meio ambiente, alterações na qualidade do solo,
68 ar e água (Freire et al., 2000).

69 Dentre os resíduos tóxicos que são produzidos, podem-se destacar os metais
70 pesados que são definidos como elementos com densidade relativa maior que 5g/cm^3 no
71 meio ambiente (Bertolazi et al., 2010). A sua ocorrência na natureza acontece pela sua
72 presença em grandes concentrações em rochas, em áreas com adição de rejeitos
73 industriais, biossólidos e em alguns agroquímicos (Baker et al., 1994). Os problemas
74 por contaminação de metais pesados causados pelo homem tiveram início na idade
75 média com as atividades mineradoras, mas foi acelerado no início do século XIX com o
76 processamento de metais em fundições (Bertolazi et al., 2010). O impacto do excesso
77 dos metais nos ecossistemas tem sido bastante discutido pela possibilidade da
78 contaminação da cadeia alimentar animal e humana (Bisinoti et al. 2004).

79 Segundo Dellamatrice (2005), águas contendo alta carga de metais não tratadas
80 de maneira eficiente têm sido descartadas no meio ambiente de forma errônea
81 ocasionando uma série de distúrbios ambientais (Pereira e Freitas, 2012). Nos últimos
82 anos, a legislação brasileira tornou-se restritiva quanto ao tratamento de efluentes
83 lançados em corpos aquáticos. Segundo as resoluções nº 357/2005 e 430/2011 do
84 Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), os efluentes de qualquer fonte
85 poluidora somente poderão ser lançados direta ou indiretamente nos corpos de água,
86 após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, aos padrões e às
87 exigências propostas.

88 A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da
89 sociedade moderna. E devido ao grande valor que tem sido atribuído a este bem, através

90 de princípios incorporados em nossa legislação (Kunz e Zamora, 2002), ela exige que
91 áreas contaminadas devam ser remediadas, para reduzir a interferência ambiental e
92 recuperar os ecossistemas. Para isto, é necessário o diagnóstico, a análise e o
93 monitoramento do impacto e medidas remediadoras (Cetesb, 2009).

94 **2.2 Manganês**

95 **2.2.1 Aspectos gerais, estados de oxidação e fontes de manganês.**

96 Dentre os diversos metais pesados presentes na natureza, o Mn pode ser
97 caracterizado como um quando presente em elevadas concentrações. Normalmente, esse
98 metal é requerido em pequenas quantidades pelos organismos e quando em excesso
99 pode ser extremamente tóxico (WHO, 2011).

100 O Mn é o segundo metal de transição mais abundante na crosta terrestre e o
101 quinto elemento mais abundante na superfície da Terra (Su et al., 2013). Ele pode ser
102 encontrado na atmosfera, nos solos, águas subterrâneas, marinhas e doces, e em diversos
103 estados de solubilidade (Nealson e Myers, 1992; Neculita e Rosa, 2019). Geralmente,
104 apresenta três estados de oxidação relevantes em termos ambientais, Mn (II), Mn (III) e
105 Mn (IV) (Tebo et al., 2004). Quando o Mn está presente em corpos d'água, a forma
106 reduzida Mn (II) é termodinamicamente favorecido a um pH e Eh baixos (condição de
107 ausência de O₂), sendo encontrado na forma solúvel e invisível nessa condição. Em
108 situações de pH e Eh elevados (condição de presença de O₂), as formas oxidadas Mn
109 (III) e Mn (IV) são favorecidas, sendo encontradas na forma de óxidos estáveis, menos
110 insolúveis e que conferem uma coloração escura à água (Tebo et al., 2010 e Hoyland et
111 al., 2014).

112 Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM, 1976), o Mn
113 pode ser encontrado na forma de hidróxidos, silicatos, carbonatos e óxidos, sendo este o
114 mais importante economicamente. O Mn (II) pode apresentar-se como Mn⁺⁺ e MnOH⁺.
115 Além disso, outros complexos são possíveis como: complexos inorgânicos com
116 bicarbonato, sulfato ou fosfato.

117 A forma solúvel de Mn (II) serve como um micronutriente essencial para
118 diversos organismos, incluindo o ser humano, enquanto que a forma insolúvel de óxidos

119 de Mn (III/IV) é caracterizada pela sua forte reatividade e capacidade de oxidar os
120 metais, moléculas orgânicas e compostos fenólicos (Tebo et al., 2004). Além da
121 natureza oxidante forte dos óxidos de Mn (IV), a sua estrutura conduz à adsorção e
122 sequestro de diversos metais pesados (cobre, cobalto, cádmio, zinco, níquel e chumbo)
123 permitindo aplicações potenciais dos óxidos de Mn (IV) em processos de
124 biorremediação (Tebo et al., 2004).

125 A erosão do solo é uma das mais importantes fontes naturais de Mn nas águas,
126 porém diversas fontes antrópicas como atividades industriais, lodo de esgoto, resíduos
127 de produtos comerciais da agricultura e de combustíveis, água de rejeito de minas,
128 dejetos urbanos e fertilizantes são responsáveis por sua emissão no solo e nas águas
129 (Martins e Lima 2001). O Mn é o principal contaminante de águas de drenagem (Favas
130 et al., 2016) e é frequentemente encontrado em maiores concentrações nesses locais do
131 que em córregos poluídos e nas águas subterrâneas (Banks et al., 1997).

132 **2.2.2 Manganês no Brasil e impactos na água e toxicidade**

133 O Brasil possui reservas de Mn distribuídas em diversas regiões e podem-se
134 destacar os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo na região sudeste; o
135 Pará e o Amapá na região norte; o Ceará e a Bahia no nordeste; e os Estados do Mato
136 Grosso do Sul e Goiás no centro-oeste (Costa e Figueiredo, 2011).

137 O Estado de Minas Gerais é um produtor tradicional de minério de Mn e a partir
138 deste metal, a gussa e a ferroliga que são conhecidos como seus principais produtos, são
139 feitos e destinados ao mercado interno (Costa e Figueiredo, 2011). Os solos e águas
140 desse Estado são naturalmente constituídos por esse metal, porém o seu excesso tem
141 sido associado a desconformidades com os limites estabelecidos nas resoluções
142 CONAMA 357/05 e 430/2011 que estipula que o padrão de lançamento de efluentes
143 seja de 1,0 mg/L e, para águas de classe II, 0,1mg/L de Mn dissolvido (CONAMA,
144 2005 e 2011).

145 O excesso de Mn pode desencadear intoxicação, com consequentes patologias
146 associadas. Em humanos, pode causar convulsão mesmo presente em concentrações
147 insuficientes no sangue, ou ser uma substância tóxica quando presente em

148 concentrações excessivas no ar, água e alimentos (US DHHS, 2012). A inalação de Mn
149 transportado pelo ar, que muitas vezes é transportado diretamente para o cérebro antes
150 de ser metabolizado no fígado, pode resultar em distúrbios neurológicos permanentes,
151 como o manganismo (conhecido como “locura mangânica” nas minas da América do
152 Sul, onde o manganismo é endêmico), bem como efeitos respiratórios, reprodutivos e de
153 desenvolvimento (US DHHS, 2012; Rose et al., 2017). Comprometimento intelectual
154 em crianças em idade escolar expostas ao Mn da água potável (Bouchard et al., 2011),
155 bem como a ligação entre Mn e comportamentos hiperativos de crianças expostas
156 através da água da torneira também foram documentados (Bouchard et al. , 2006).

157 Além do seu potencial tóxico, a remoção deste metal de superfície e subterrâneo
158 é desejável, pois altos teores desse metal contribuem para acidez total de águas minerais
159 de minas e tornam-se indesejáveis também ao consumo humano por conferir um sabor
160 metálico à água (Hallberg e Johnson, 2005). O Mn, juntamente com o ferro e alumínio,
161 representa um importante desafio ambiental em todo o mundo (Favas et al., 2016).
162 Muitas pesquisas têm recebido investimento para desenvolvimento de métodos eficazes
163 para controlar e tratar os efeitos da drenagem de minas (Neculita e Rosa, 2019).

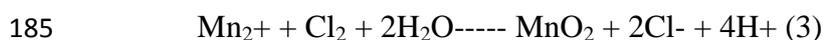
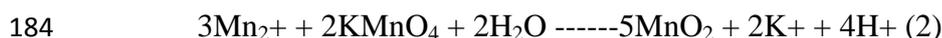
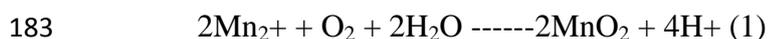
164 **2.3 Métodos de remoção do Mn**

165 **2.3.1 Remoção físico-química**

166 O conhecimento dos fundamentos que envolvem os processos de remoção de
167 Mn, nas suas diferentes formas e concentrações, é fundamental para aplicação segura e
168 eficiente de tecnologias destinadas à remoção desses metais. A sua remoção de
169 efluentes líquidos industriais pode ser conduzida por meio de diferentes processos e o
170 conhecimento do estado de oxidação desse elemento, o pH e Eh da água que encontram,
171 é importante para a escolha do tratamento adequado de efluentes que o contém
172 (Clearinghouse, 1988).

173 Segundo Di Bernardo e Di Bernardo (1993) existem muitos processos utilizados
174 na remoção de Mn, os quais normalmente envolvem o uso do oxigênio molecular, do
175 cloro e do permanganato de potássio como agentes oxidantes. A maneira mais utilizada
176 envolve a oxidação das formas mais solúveis de Mn (II) e subsequente remoção dos
177 precipitados formados presentes na forma de Mn (III/IV) por filtração. A aeração para

178 remoção de Mn é um processo ineficiente e lento em valores de pH em torno do neutro.
179 Comumente são requeridos oxidantes fortes como o permanganato de potássio
180 (KMnO₄) em valores de pH maiores que 7,5, cloro (Cl₂) em valores de pH maiores que
181 8,5-9,0 e dióxido de cloro (ClO₂) em valores de pH maiores que 7,0. As equações de 1 a
182 3 apresentam as reações de oxidação do Mn na presença de O₂, KMnO₄ e Cl₂.



186 A elevação do pH promove também a precipitação de ambos os íons de ferro e
187 Mn, porém esse processo é geralmente caro quando aplicado isoladamente (Di Bernardo
188 e Di Bernardo, 1993).

189 Outra forma de remover Mn quimicamente é através da adsorção. A adsorção
190 pode ser realizada por resinas de troca-iônica (Zainol e Nicol, 2009), carvão ativado
191 quimicamente modificado (Savova et al., 2003), calcário (Silva et al., 2010) e zeólitas
192 naturais (Rajic et al., 2009) e modificados (Dimirkou e Doula, 2008). Os óxidos de Mn
193 também podem adsorver o íon Mn (II), promovendo sua oxidação. Nessa oxidação,
194 primeiramente o Mn (II) é adsorvido na superfície do óxido-hidróxido de Mn e então é
195 oxidado a Mn (III). Em seguida, este último se converte a Mn (IV) (Morgan 1964).

196 As maiores desvantagens destes processos físico-químicos são a remoção
197 incompleta dos metais, a geração de subcompostos tóxicos e os altos custos
198 operacionais associados aos produtos químicos requeridos. Em alguns casos o cloro é
199 utilizado em associação com o permanganato de potássio para reduzir os custos com
200 produtos químicos (Di Bernardo e Di Bernardo, 1993; Wang and Han, 2012).

201 **2.3.2 Remoção biológica**

202 A remoção biológica (biorremediação) do Mn é considerada uma alternativa
203 ecologicamente mais adequada e eficaz quando comparada aos processos físico-
204 químicos (Gaylard et al., 2005, Tang et al., 2014). É um processo que pode ser realizado
205 por meio de um ou mais consórcios microbianos, nativos ou não, para a degradação de

206 contaminantes poluentes (Gaylard et al., 2005), e quando comparado a oxidação
207 abiótica, pode ser cinco vezes mais eficiente (Das et al., 2011), além de ter custo mais
208 baixo e não gerar poluição secundária e subprodutos tóxicos (Gallard e Guten, 2002).

209 Uma variedade de microrganismos que são capazes de catalisar a oxidação de
210 Mn (II) a Mn (III)/(IV) (Ehrlich, 1999; revisto por Nealson, 2006) são conhecidas na
211 biorremediação do Mn, e diferentes mecanismos têm sido propostos para entender esse
212 processo. Microrganismos com esse potencial fazem parte de um grupo
213 filogeneticamente diverso que compreende bactérias, fungos e algas, que foram isolados
214 de diversos ambientes, tais como nódulos de Mn nas profundezas de oceanos, filmes
215 ricos em Mn nas superfícies de lagos rasos, sedimentos de lagos de água doce e
216 depósitos de ferromanganês (Das et al., 2011).

217 A presença desses microrganismos oxidantes de Mn (II) acelera bastante a
218 oxidação desse íon no meio. Em muitos ambientes com pH em torno de 6,0 a 8,5,
219 enquanto a oxidação química de Mn (II) pelo O₂ ocorre a um nível baixo, na presença
220 desses organismos a taxa de oxidação pode ser acelerada consideravelmente (Santelli et
221 al. 2010). Os processos microbianos são considerados os principais responsáveis pela
222 formação de óxidos de Mn nos solos, sedimentos e ambientes aquáticos (Su et al., 2013;
223 Tang et al., 2016).

224 Alguns fungos já foram descritos na literatura capazes de oxidar o íon Mn (II)
225 através das enzimas peroxidase (Das et al., 2011) e lacase (Gorbacheva et al., 2009), e
226 também por promover a oxidação do Mn por mecanismo indireto através da produção
227 de superóxido (Hansel et al., 2012). Bactérias também mostraram capacidade de oxidar
228 o íon Mn (II) via produção de superóxido (Learman et al., 2011a e Learman et al.,
229 2011b) e também por enzimas pertencentes à família multicobre oxidase (MCO) (Tebo
230 et al, 2004 e Tebo et al., 2005). Entretanto, apesar de diversos trabalhos terem associado
231 à participação de tais enzimas à oxidação do íon Mn (II), não existe um mecanismo
232 único bem estabelecido para as espécies bacterianas já identificadas como oxidantes de
233 Mn (II) (Tebo et al, 2004 e Tebo et al., 2005).

234

235 **2.3.2.1 Bactérias e seus mecanismos na oxidação do Mn (II)**

236 Os principais mecanismos utilizados pelos microrganismos na imobilização dos
237 metais no processo de biorremediação são a biossorção e biomineralização (Gadd, 2004
238 e 2010 e Gavrilesu, 2004; Barboza et al., 2016). A biossorção é um processo passivo
239 que permite a adsorção de metais pelas células microbianas, através da formação de
240 complexos com a parede celular ou pela formação de polímeros extracelulares
241 sintetizados e secretados pelos microrganismos (Gavrilesu, 2004). E a
242 biomineralização possibilita a precipitação dos metais como compostos orgânicos, tais
243 como oxalatos, sulfetos, hidróxidos e óxidos (Gadd, 2004 e 2010).

244 **2.3.2.1.1 Biossorção**

245 No processo de biossorção várias bactérias relacionadas já foram caracterizadas.
246 Pode-se destacar *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces sp.* e *Bacillus sp.*, sendo este último
247 identificado como a espécie com melhor potencial nesse processo. Estudos com *Bacillus*
248 *sp.* HAH1, mostraram que esse isolado adsorveu Mn (II) (13.2 mg Mn (II)/g biomassa)
249 numa faixa de pH entre 5- 8 (Hasan et al, 2010). Hasan et al. (2012) também
250 demonstraram adsorção de Mn (II) por esse isolado (43,5 mg Mn(II)/g-biomassa)
251 através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de
252 infravermelho, e identificaram os grupos funcionais que participaram desse processo –
253 C=O, –OH, –NH₂ e –C-O.

254 O processo de biossorção é dependente do pH do meio, uma vez que à presença
255 de grupos ácido-base tais como aminas, amidas e ácido carboxílico nas paredes das
256 células pode ter sua interação com o metal afetada devido ao pH. Quando o pH
257 aumenta, tais grupos funcionais são desprotonados, o que aumenta a carga negativa na
258 superfície da célula, facilitando as interações entre parede celular e os cátions (Hasan et
259 al, 2010; Javanbakht et al., 2014).

260 **2.3.2.1.2 Biomineralização: via direta e indireta**

261 Dentro do processo de biomineralização, a oxidação biológica do Mn (II) à Mn
262 (III) e/ou Mn (IV) pode ocorrer por duas vias diferentes, as quais podem ocorrer
263 simultaneamente (Learman et al., 2011a e Su et al., 2013). Existe a via direta realizada

264 por componentes celulares, tais como enzimas (Tebo et al., 2004 e Tebo et al., 2005); e
265 a via indireta na qual, produtos do metabolismo microbiano (ex: superóxidos) e / ou o
266 crescimento microbiano altera o pH e as condições redox do meio, resultando na
267 oxidação do Mn (II) (Learman et al., 2011a; Tebo et al. 2004).

268 Na via direta, as enzimas MCOs e as peroxidases são as mais estudadas no
269 processo de oxidação. As MCOs são uma classe de proteínas de cobre que utilizam o
270 cobre como um cofator para catalisar oxidações de vários substratos concomitantemente
271 com a redução de O₂ à água (Nealson, 2006 e Das et al., 2011). Elas foram identificadas
272 em bactérias que oxidam o Mn e que pertencem a diferentes filos, como Firmicutes,
273 Actinobacteria e Proteobacteria (Tebo et al., 2005). Entretanto, as espécies mais
274 discutidas na literatura são *Pseudomona putida*, *Leptothrix discophora* (cepas SS1 e SP-
275 6) e *Bacillus sp.* SG-1 que apresentam os respectivos genes que parecem estar
276 relacionados com a codificação das MCOs: *cumA*, *mofA*, *mnxG* (Tebo et al., 2004).

277 As bactérias *P. putida* e *L. discophora* são heterotróficas e oxidam o Mn (II)
278 durante a fase estacionária de crescimento com a participação de enzimas MCO. Cepas
279 de *P. putida* (MnB1 e GB-1) depositam óxidos de Mn na superfície celular indicando
280 que um ou mais componentes do aparato de oxidação estão localizados na membrana
281 externa (Brouwers et al., 2000). Já a cepa *L. discophora* SP-6 deposita óxidos de Mn
282 numa estrutura de bainha, e a cepa *L. discophora* SS-1 no meio extracelular, uma vez
283 que perdeu a capacidade de formação dessa mesma estrutura (Brouwers et al., 2000). A
284 *P. putida* também pode oxidar Mn (II) à Mn (III) seguindo uma via não enzimática
285 (Parker et al., 2004).

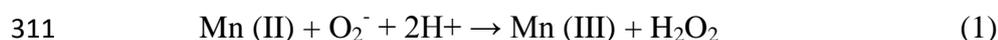
286 *Bacillus sp* SG-1 é uma bactéria marinha, gram positiva e a oxidação do Mn (II)
287 a Mn (IV) por essa espécie acontece no envoltório de esporos dormentes onde se
288 encontra a MCO responsável pela oxidação. A oxidação realizada por *Bacillus sp* SG-1
289 ocorre através de duas reações de transferência de elétrons sequenciais via formação de
290 um intermediário, o Mn (III) (Soldatova et al., 2012).

291 Na oxidação do Mn (II) catalisada pelas enzimas peroxidases, os mecanismos de
292 oxidação via essa enzima foi demonstrado nas espécies bacterianas *Erythrobacter sp.*
293 cepa SD21 e *Aurantimonas manganoxydans* cepa SI85-9A1 (Anderson et al., 2009) e

294 em certos fungos basidiomicetos (enzimas peroxidases extracelulares) (Das et al.,
295 2011). A enzima manganês peroxidase (MnP) promove a oxidação do Mn (II) à Mn
296 (III), o qual é estabilizado por metabólitos derivados de ácidos orgânicos (Perez e
297 Jeffries, 1992). O ciclo catalítico das MnP é similar a outras heme peroxidases, mas MnP
298 usa preferencialmente o Mn (II) como doador de elétron.

299 Na via indireta da oxidação biológica do Mn (II) à Mn (III) e/ou Mn (IV), as
300 enzimas MCO e peroxidases não estão propriamente relacionadas à oxidação do Mn
301 mesmo que algumas espécies de microrganismos tenham genes que codificam essas
302 enzimas. Exemplo disso ocorre na bactéria *Bacillus subtilis* que tem uma proteína CotA
303 similar a uma MCO e promove a oxidação do Mn (II) pelas mudanças de pH e Eh do
304 meio. Não foi observada relação entre a presença dessa proteína e a oxidação do Mn (II)
305 (Hullo et al., 2001).

306 Alguns microrganismos oxidam o Mn (II) através da produção de superóxidos
307 extracelularmente. Pela equação abaixo, inicialmente o Mn (II) é oxidado pelo O_2^-
308 formando H_2O_2 e Mn (III) (reação 1). Embora H_2O_2 possa ser reduzido de volta à Mn
309 (II) (reação 2), a enzima catalase catalisa a decomposição da H_2O_2 à H_2O e O_2 (reação
310 3), inibindo a reação 2



314 A bactéria *Roseobacter sp.* AzwK-3b é um exemplo de microrganismo que
315 oxida Mn (II) através da produção de superóxido (Learman et al., 2011a e 2011b, e
316 Andeer et al. 2015). Utilizando-se filtrados livre de células provenientes de culturas de
317 *Roseobacter sp.* foi observado que a adição de protease inibiu a oxidação do Mn (II) e
318 foi sugerido que o superóxido produzido pela bactéria seria responsável pela oxidação
319 (Learman et al., 2011a e Learman et al., 2011b). Andeer et al., (2015) mostraram que a
320 produção do superóxido por essa bactéria é promovida por uma enzima localizada na
321 membrana externa da bactéria e que a oxidação do Mn (II) segue uma via semelhante à
322 que está representada pelas equações 1-3 acima.

323 Embora existam muitos trabalhos que mostrem os mecanismos de oxidação do
324 Mn (II), ainda não se sabe direito sobre a utilidade da formação de óxido de Mn para as
325 bactérias oxidantes desse metal. Dessa forma muitas hipóteses têm sido formuladas
326 como, a oxidação do Mn (II) a Mn (IV) seria uma reação exergônica e a energia obtida
327 seria utilizada pelos microrganismos; entretanto, ainda não há evidências que
328 comprovem essa função para oxidação do Mn (Tebo et al., 2005); os óxidos de Mn que
329 possuem propriedades adsorptivas e são oxidantes fortes poderiam exercer função de
330 proteção contra metais pesados e espécies reativas de oxigênio [este fato foi observado
331 em um estudo realizado com *P. putida* GB-1, no qual a oxidação do Mn aumentou a
332 sobrevivência da bactéria na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ehrlich e
333 Newman, 2008)]; os óxidos de Mn também poderiam conferir proteção contra luz UV,
334 predação e ataque viral por revestirem as células (Tebo et al., 2004) e por fim, os óxidos
335 de Mn poderiam oxidar complexos de substâncias húmicas, liberando compostos
336 orgânicos de baixo peso molecular que poderiam ser utilizados pelas bactérias para
337 crescimento celular (Brouwers et al., 2000; Tebo et al., 2005 e Das et al., 2011) .

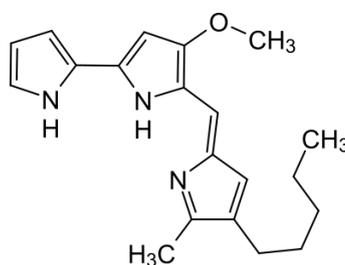
338 **2.3.2.2. Bactérias do gênero *Serratia***

339 *Serratia* é um membro da família Enterobacteriaceae que compreende um grupo
340 de bactérias gram-negativas relacionadas tanto fenotipicamente quanto pelas suas
341 sequências de DNA. Elas habitam diferentes organismos e ambientes que variam desde
342 insetos, mamíferos, pacientes humanos hospitalizados até água, solos e plantas. A
343 maioria dos isolados de *Serratia* foi encontrada em pacientes hospitalizados e em águas,
344 sendo a espécie *Serratia marcescens* a mais comum em ambos locais (Grimont e
345 Grimont, 2006). Diversos estudos têm demonstrado o potencial dessas bactérias no
346 processo de biorremediação de metais pesados como níquel, rádio, cromo, cobre e o
347 próprio Mn (Kannan e Ramteke, 2002; Zakeri et al., 2010; Zhang e Li, 2011; Andrezza
348 et al. 2012; Cristani et al., 2012 e Barboza et al., 2017).

349 Até 2006, dez espécies bacterianas pertencentes a esse gênero eram conhecidas e
350 de acordo com Li et al. (2015) um pouco mais de 13 genomas de *Serratia* já foram
351 sequenciados e reportados ao NCBI. Alguns dos genomas sequenciados são: *S.*
352 *marcescens* WW4 isolada a partir de uma máquina de papel (Chung et al., 2013); *S.*

353 *marcescens* DB11 patógeno da *Drosophila*; *S. marcescens* FGI 94 associado com uma
354 formiga cortadora de folha e fungo de jardim (Aylward et al., 2013); *Serratia*
355 *proteamaculans* 568 com uma análise detalhada do genoma sobre a produção de
356 quitinase (Purushotham et al., 2012); *Serratia liquefaciens* ATCC27592, *Serratia*
357 *fonticola* RB-25 isolada de um aterro de resíduos (Ee et al., 2014); quatro cepas de
358 *Serratia plymuthica* AS13 (Neupane et al., 2012), AS12, AS9, S13 (Muller et al., 2013)
359 e 4Rx13 isoladas de plantas que exibem atividade de promover crescimento das mesmas
360 e *Serratia symbiotica* que coexiste com um pulgão.

361 Algumas espécies desse gênero são capazes de produzirem um pigmento
362 vermelho característico chamado de prodigiosina (Figura 1), contudo a sua produção
363 não é exclusiva das espécies de *Serratia* (Grimont e Grimont, 2006). Existem quatro
364 tipos de prodigiosina e a sua biossíntese por essas bactérias depende das condições de
365 crescimento bacteriano, temperatura, presença de íons e aminoácidos (Williams e
366 Quadri, 1980; Bennett e Bentley, 2000). A sua produção também é considerada um
367 mecanismo protetor em condições desfavoráveis para o crescimento bacteriano (Hejazi
368 e Falkiner, 1997 e Cristani et al., 2012).



369

370 **Figura 2.1-** Molécula de prodigiosina caracterizada por apresentar um esqueleto
371 comum com três anéis tipo pirrole (Williams, 1973).

372 A prodigiosina localiza-se em vesículas extracelulares, associada a células e em
373 grânulos intracelulares (Zakeri et al., 2010). É o composto mais caracterizado na
374 *Serratia* por exibir propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoários e por
375 apresentar características imunossupressoras e anticancerígenas (Li et al., 2015). A
376 produção desse pigmento tem sido relacionada também a absorção de metais pesados
377 em alguns trabalhos de biorremediação. A bioacumulação e biossorção de vários sais
378 de níquel pela *S. marcescens* NCIM 2078 foi associada ao possível papel da estrutura da

379 prodigiosina na captação de níquel (Kannan e Ramteke, 2002). A absorção de rádio
380 também foi vinculada a produção desse pigmento pela *Serratia sp.* ZF03 (Zakeri et al.,
381 2010).

382 Outras moléculas importantes também são produzidas pelas espécies de *Serratia*,
383 como as pirazinas usadas nas indústrias alimentícias para melhorar o sabor de alguns
384 produtos; enzimas como as quitinases potencialmente usadas no tratamento de rejeitos
385 contendo quitina produzida pela indústria de embalagens de frutos do mar atuam como
386 agentes de biocontrole contra fungos patogênicos de plantas; e participam da produção
387 de adesivos, curativos e recuperação de metais pesados de águas (Grimont e Grimont,
388 2006).

389 A produção dessas diversas moléculas por certas espécies de *Serratia* tornam
390 essas bactérias extremamente interessantes para serem aplicadas em diferentes
391 processos de biorremediação, como já foram mostrados em muitos trabalhos da
392 literatura. A *Serratia sp.* SVGG16 isolada de solos tropicais foi capaz de produzir
393 compostos surfactantes durante o seu crescimento em meio contendo gasolina misturada
394 com álcool. Os surfactantes por serem moléculas anfipáticas, diminuíram a tensão
395 superficial e interfacial em sistemas aquáticos contaminados com hidrocarbonetos,
396 como a gasolina, melhorando a restauração dessas áreas a partir do aumento da área de
397 superfície para o ataque microbiano (Cunha et al., 2004).

398 A *Serratia sp.* Cr-10, isolada partir de um local contaminado com crômio, foi
399 descrita como um gênero crômio resistente, após ser capaz de remover espécies tóxicas
400 desse elemento, reduzindo a um precipitado insolúvel através de um mecanismo
401 enzimático (Zhang e Li, 2011). Um isolado de *Serratia sp.* encontrado em solos
402 brasileiros contaminados com cobre, teve o seu potencial demonstrado no processo de
403 biolixiviação de íons de cobre dos solos (Andreazza et al., 2012). A *Serratia sp.* ZF03
404 isolada de águas termais em áreas com altas concentrações de radiação se apresentou
405 como um eficiente biossorvente do elemento rádio também (Zakeri et al., 2010).

406 Os mecanismos utilizados por cepas não pigmentadas de *S. marcescens* na
407 remoção de Mn foram estudados pela primeira vez pelo nosso grupo (Barboza et al.,
408 2017). Neste estudo, duas cepas de *S. marcescens* isoladas de água de rejeito de mina de

409 Mn, localizada em Minas Gerais, foram capazes de oxidar esse metal de forma
410 biológica através de algum produto do metabolismo microbiano que aumentou o pH do
411 meio e promoveu a oxidação do Mn (II) por um mecanismo indireto. Foi o primeiro
412 trabalho que demonstrou o potencial promissor de *S. marcescens* no tratamento de
413 águas de rejeito de mina com excesso de Mn.

414 **2.4 Análises proteômicas para verificação de alterações moleculares causadas pela** 415 **presença de metais**

416 A diversidade de microrganismos que habitam locais contaminados e a
417 variedade de genes que codificam fenótipos que facilitam as interações entre os metais e
418 os microrganismos são elementos importantes na biorremediação de metais (Zakeri, et
419 al., 2012). Trabalhos em biotecnologia indicam fungos e bactérias como principais
420 microrganismos eficientes na degradação de poluentes e metais pesados por possuírem
421 alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (Balan, 2002). A
422 eficiência de microrganismos ambientais em degradar metais pesados, em especial o
423 Mn, se deve a diversos mecanismos que envolvem desde a produção de enzimas com
424 potencial de oxidar esse metal a sua forma insolúvel, a outros mecanismos como, por
425 exemplo, produtos do metabolismo microbiano (ex: superóxidos), que podem ser
426 analisados através de abordagens proteômicas.

427 A disponibilidade de genomas microbianos em bancos de dados e as melhorias
428 nas ferramentas utilizadas no estudo de proteínas aceleraram a análise de proteomas dos
429 microrganismos (Bianco e Perrotta, 2015). A proteômica tem se tornado uma
430 metodologia essencial na genômica funcional, uma vez que fornece informações em
431 nível de proteína, sendo particularmente relevante por oferecer uma visão da função da
432 proteína, sua localização específica (subproteoma), bem como informações de
433 modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação e peptídeo de sinal,
434 que desempenham um papel importante na atividade e localização dessa macromolécula
435 (Bianco e Perrotta, 2015).

436 A proteômica é uma das melhores ferramentas para avaliar a resposta de
437 qualquer organismo ao seu ambiente circundante e tem sido usada em diversos estudos
438 para descobrir as proteínas microbianas envolvidas em situações de estresse (Braconi et

439 al., 2011; Ilyas et al., 2014; Bianco e Perrotta, 2015 e Kumar e Rai, 2015). A maioria
440 das espécies microbianas tolerantes a metais possuem apenas informações limitadas
441 sobre as alterações proteômicas devido à presença de metal (Ilyas et al., 2014). Existe
442 apenas um trabalho com bactérias resistentes ao Mn que verificou as proteínas expressas
443 em relação à presença desse metal (Learman e Hansel, 2014). Nesse sentido, mais
444 estudos proteômicos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessa
445 condição.

446

447 3. Relevância e hipótese

448 Diversas fontes antrópicas como atividades industriais, lodo de esgoto, resíduos
449 de produtos comerciais da agricultura e combustíveis, rejeitos de mina, dejetos urbanos
450 e fertilizantes são responsáveis pela emissão de Mn no meio ambiente, com consequente
451 contaminação dos mesmos (Martins e Lima 2001). Removê-lo dos ambientes, assim
452 como outros metais pesados, de forma eficiente e adequada tem se tornado uma
453 necessidade atual tanto no cenário regional, nacional e internacional. Desta forma, a
454 busca por alternativas de remoção de metais pesados e de menor impacto ambiental tem
455 motivado a comunidade científica.

456 Desde a década de 1980, a remoção de Mn por meio de potenciais
457 microrganismos tem sido aplicada com sucesso em muitas instalações (Qin et al., 2009;
458 Li et al., 2013; Yang et al., 2014). Entretanto os mecanismos específicos envolvidos na
459 oxidação desse metal ainda são pouco compreendidos (Nakama et al., 2014). No
460 presente trabalho, focamos especificamente em indivíduos do gênero *Serratia* que
461 parece ser muito promissor em processos de biorremediação de Mn (II), além de ser
462 bom produtor de enzimas e pigmentos que são capazes de degradar/e ou absorver
463 contaminantes tóxicos.

464 Nesse sentido, partimos da hipótese que a cepa pigmentada de *S. marcescens*
465 apresenta melhor capacidade de tolerar e remover o Mn (II), uma vez que sabemos que
466 a presença do pigmento prodigiosina pode conferir uma vantagem ecológica ao seu
467 produtor. Para investigá-la, dois isolados de *Serratia sp.*, um pigmentado e outro não
468 pigmentado, foram comparados em duas condições nutricionais diferentes contendo
469 altas concentrações de Mn (II). Um meio de cultura rico em nutrientes permite um
470 maior crescimento bacteriano o que pode afetar a remoção de Mn (II). Abordagens
471 proteômicas foram utilizadas para compreender melhor esse processo de tolerância e
472 remoção de Mn (II) e o pigmento prodigiosina foi analisado.

473

474

475

476 **4. Objetivos**

477

478 **4.1 Objetivo Geral**

479 Este estudo teve como objetivo geral conhecer os mecanismos e as proteínas
480 envolvidas na remoção e tolerância ao Mn (II) de um isolado pigmentado de *S.*
481 *marcescens*. Além disso, analisar a influência de altas concentrações desse metal na
482 produção de prodigiosina.

483 **4.1.1 Objetivos Específicos**

484 Os objetivos específicos foram,

- 485 • Comparar a habilidade de tolerância e remoção de uma cepa pigmentada de *S.*
486 *marcescens* (LG1) com outra não pigmentada (CL11) na ausência e presença de
487 diferentes concentrações de Mn (II) em um meio pobre (meio K) e em um meio
488 rico em nutrientes (meio NB);
- 489 • Determinar os possíveis mecanismos utilizados na remoção de Mn (II);
- 490 • Obter o perfil proteômico da cepa pigmentada LG1 na condição de ausência e
491 presença de Mn (II);
- 492 • Compreender as funções das proteínas identificadas em ambas às condições,
493 especialmente aquelas encontradas mais expressas na presença de Mn (II);
- 494 • Caracterizar o pigmento da cepa *S. marcescens* LG1;
- 495 • Avaliar a influência do Mn (II) na produção da prodigiosina.

496 As seções de metodologias, resultados e discussão foram agrupadas em artigos,
497 que foram obtidos a partir deste trabalho, como descrito abaixo:

498 **Capítulo I:** Meio de crescimento rico promove aumento na remoção de Mn (II) e na
499 produção de óxido de manganês por cepas de *Serratia marcescens* isoladas de efluentes

500 **Capítulo II:** Alterações no proteoma da *Serratia marcescens* em resposta ao manganês
501 (II).

502 **Capítulo III:** Caracterização da prodigiosina produzida pela cepa LG1 e o impacto da
503 concentração do Mn (II) na sua produção.

504 **5. CAPÍTULO I: Meio de crescimento rico promove aumento na**
505 **remoção de Mn (II) e na produção de óxido de manganês por cepas de**
506 ***Serratia marcescens* isoladas de efluentes**

507

508 Pollyana S. Queiroz, Natália R. Barboza, Mônica M. Cordeiro, Versiane A. Leão e
509 Renata Guerra-Sá

510

511 Neste capítulo foi investigado o desempenho de dois isolados de *Serratia marcescens* na
512 remoção de manganês (II) e os efeitos do meio de cultura rico em nutrientes (meio NB)
513 e pobre em nutrientes (meio K) neste processo. No meio NB, o isolado pigmentado
514 denominado de LG1 e o isolado CL11 não pigmentado, exibiram melhor crescimento e
515 maior tolerância ao Mn (II) (0-2000 mg L⁻¹). Além disso, uma melhor remoção de Mn
516 (II) (64,25%) e o aumento da formação de óxidos de Mn foram observados neste meio,
517 especialmente para o isolado LG1. A análise de EELS revelou Mn no interior da célula
518 de LG1 e análise EDX revelou Mn fora da célula de CL11, indicando que os dois
519 isolados removem Mn (II) por meio de mecanismos distintos. A biooxidação de Mn pela
520 linhagem CL11 pode envolver mecanismos indiretos que alteram o pH do meio,
521 enquanto a linhagem LG1 pode usar um mecanismo direto para a biooxidação mediada
522 por componentes celulares, como proteínas intracelulares. Estes resultados demonstram
523 o potencial biotecnológico das duas linhagens. Além disso, é a primeira vez que o alto
524 potencial do meio NB para remoção de Mn é demonstrado. Este meio influenciou
525 grandemente a remoção de Mn e a formação de óxidos, especialmente no caso do
526 isolado LG1 pigmentado.

527

528 Esse capítulo foi publicado como “*Rich growth medium promotes an increased on*
529 *Mn(II) removal and manganese oxide production by Serratia marcescens strains*
530 *isolates from wastewater*” na revista Biochemical Engineering Journal Volume 140:
531 148-156, 2018, doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.018

532

533

534 **I.1 Introdução**

535 O manganês (Mn) é um metal pesado encontrado naturalmente na Terra e um
536 micronutriente essencial para o crescimento e a sobrevivência dos humanos, animais e
537 plantas (Langille e Maclean, 1976). O aumento das atividades de mineração e
538 industriais elevou sua concentração no meio ambiente, gerando problemas não só para o
539 meio ambiente, mas também para a saúde humana, devido à sua alta toxicidade (Li et
540 al., 2013; Kornblith et al., 2018; Kafaei et al., 2017). O Mn foi colocado na Lista
541 Prioritária de Substâncias Perigosas pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de
542 Doenças (ATSDR) (Fay e Mumtaz, 1996) e sua contaminação em águas industriais,
543 água potável e águas subterrâneas se tornou um problema crescente em muitas partes do
544 mundo (Franciskovic-Bilinski et al., 2017), necessitando sua remoção desses ambientes.

545 Dentre as técnicas disponíveis para remoção de Mn, os métodos físico-químicos
546 são os mais convencionais. Em pH neutro, a oxidação de Mn (II) solúvel em óxido de
547 Mn (IV) insolúvel é muito lenta, de modo que oxidantes químicos como o cloro são
548 usados para acelerar este processo. Depois disso, os óxidos de Mn podem ser removidos
549 por filtração (Choo e Choi, 2005; McKee et al., 2016). Embora esses métodos sejam
550 eficazes, eles promovem a remoção incompleta, geram subprodutos tóxicos e
551 apresentam baixo benefício econômico (Di Bernardo e Di Bernardo, 2006; Volesky,
552 2011). Como alternativa, novas estratégias biotecnológicas baseadas em
553 microrganismos oxidantes de Mn foram propostas como formas mais eficientes e
554 ecologicamente corretas, compensando as deficiências dos métodos tradicionais
555 (Ehrlich e Newman, 2008; Tang et al., 2014).

556 Bactérias oxidantes de Mn, como *Bacillus sp.s* cepa SG-1, *Leptothrix*
557 *discophora* SS-1 e *Pseudomonas putida* MnB1 e GB-1 foram isoladas de uma ampla
558 variedade de ambientes, incluindo mares e corpos d'água contaminados, solos,
559 sedimentos, tubulações de água, nódulos de Mn e fontes hidrotermais (Waasbergen et
560 al., 1996; Corstjens et al., 1997; Caspi et al., 1998; Brouwers et al., 1999; Das et al.,
561 2011). Devido ao pequeno tamanho e alta razão superfície-volume desses
562 microrganismos, eles possuem uma grande área de contato disponível para interação
563 com íons metálicos presentes na solução (Soares e Soares, 2012). Além disso, eles

564 podem sintetizar enzimas como a multicobre oxidases, que catalisam a oxidação de Mn
565 (II) a Mn (IV) e, assim, aumentam a taxa dessa reação (Tebo et al., 2004). A oxidação
566 biológica mediada por bactérias leva à precipitação de óxidos de Mn em sistemas
567 naturais, que é um processo ambientalmente importante no que diz respeito à sorção e
568 sequestro de metais pesados e à oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e
569 inorgânicos (Francis et al., 2001; Tebo et al., 2004). Os óxidos de Mn biogênicos
570 possuem alta capacidade de adsorção de metais pesados em sua superfície (Tebo et al.,
571 2004).

572 Espécies de *Serratia* têm sido consideradas ferramentas potenciais para a
573 remoção de Mn e outros metais pesados, como cromo (Cr), cádmio (Cd), chumbo (Pb),
574 cobre (Cu), zinco (Zn) e níquel (Ni). Essas bactérias pertencem à família
575 Enterobacteriaceae e, por serem boas produtoras de enzimas e outros compostos
576 importantes, possuem a capacidade de remover metais pesados do meio ambiente, não
577 apenas por vias diretas envolvendo enzimas, mas também por mecanismos indiretos,
578 como a biossorção (Kannan e Ramteke, 2002; Cruz-Vega et al., 2008; Zhang e Li, 2011;
579 Cristani et al., 2012; Andrezza et al., 2012; Barboza et al., 2017). Algumas espécies de
580 *Serratia* produzem o interessante pigmento vermelho, chamado prodigiosina, 2-metil-3-
581 amil-6-metoxiprodigiosene (Williams e Quadri, 1980) que é considerado parte de um
582 mecanismo de proteção para o crescimento bacteriano sob condições desfavoráveis
583 (Hejazi e Falkiner, 1997). Este pigmento é o composto mais característico da *Serratia*
584 devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiprotozoárias, e
585 recentemente também foi relatado exibir atividades imunossupressoras e
586 anticancerígenas (Li et al., 2015). Sua presença tem sido associada à absorção de metais
587 pesados e elementos radioativos em alguns estudos de biorremediação (Kannan e
588 Ramteke, 2002; Cristani et al., 2012; Zakeri et al., 2010).

589 Em um trabalho anterior do nosso grupo, descobriu-se que uma cepa não
590 pigmentada de *Serratia marcescens* isolada de águas residuais da mina removeu
591 eficientemente Mn (II) através de um mecanismo indireto (Barboza et al., 2017). Esta
592 cepa promoveu um aumento no pH do meio, resultando na oxidação dos íons Mn. No
593 entanto, não se sabe se a cepa pigmentada de *Serratia* pode apresentar um melhor
594 desempenho na remoção de Mn. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi

595 comparar a capacidade de uma cepa pigmentada e outra não pigmentada de *Serratia* em
596 remover os íons Mn (II) do meio e avaliar os possíveis mecanismos utilizados pelas
597 duas linhagens na biorremediação do Mn. A influência do meio de cultura na remoção
598 deste íon também foi examinada, uma vez que se espera que um meio mais rico permita
599 um maior crescimento bacteriano o que pode afetar a remoção de Mn (II).

600

601 **I.2 Materiais e métodos**

602 **I.2.1 Cepas bacterianas**

603 As duas cepas de *Serratia* denominadas CL11 e LG1 usadas neste estudo foram
604 isoladas de águas residuais coletadas em Minas Gerais, Brasil. A cepa não pigmentada
605 CL11 foi recuperada de uma amostra de água coletada de uma mina de Mn na região do
606 Quadrilátero Ferrífero e a cepa pigmentada LG1 foi isolada de um lago contaminado
607 que sofre poluição intensa devido à descarga de esgoto doméstico, derramamentos de
608 óleo e lixo carregado pela chuva (Freitas, 2009). A cepa CL11 foi identificada como
609 *Serratia marcescens* em um estudo anterior (Barboza et al., 2017). A cepa LG1 foi
610 isolada como resistente a Mn (II). As cepas foram cultivadas em meio K sólido (2,0 g
611 L⁻¹ de peptona, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, tampão HEPES 10 mM, 15 g L⁻¹ de
612 ágar, pH 7,5) e meio nutriente sólido (NB) (10 g L⁻¹ de peptona, 3 g L⁻¹ de extrato de
613 levedura, 5 g L⁻¹ de NaCl, 15 g L⁻¹ de ágar, pH 7,0) suplementado com 50 mg L⁻¹ de
614 Mn (II) como MnSO₄ • H₂O por sete dias com incubação a 28 ± 2 ° C.

615 **I.2.2 Identificação da cepa LG1: Sequenciamento do rDNA 16S bacteriano**

616 Na caracterização molecular, o isolado LG1 foi cultivado por três dias em meio
617 K a 30° C com agitação constante a 150 min⁻¹. As células foram então centrifugadas a
618 14681 x g durante 5 min e o DNA genômico foi extraído utilizando um kit NucleoSpin
619 Tissue (Macherey-Nagel). A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas
620 por eletroforese em gel de agarose (0,6%) e espectrofotometria UV (NanoDrop), e a
621 PCR foi então realizada para amplificar o gene RNA 16S. Na reação de PCR, os
622 primers 8F e 1392R (Bortone, 2005) foram usados sob as seguintes condições de
623 reação: 1× tampão de PCR, 0,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo,

624 0,2 mM de cada primer, 2,5U de Taq DNA polimerase (Thermo Scientific TaqDNA
625 Polymerase, Fermentas), e 2ng de DNA molde em um volume final de 25 mL. As
626 condições do ciclo foram as seguintes: desnaturação inicial (2 min a 95 °C), seguida por
627 35 ciclos de desnaturação (1 min a 95 °C), anelamento (45 seg a 47 °C) e extensão (2
628 min a 72 °C) e uma etapa de extensão final (10 min a 72 °C). Os produtos de PCR
629 foram detectados por eletroforese em gel de agarose (1,2%).

630 Os produtos de PCR foram purificados como descrito anteriormente (Sambrook
631 et al., 1989) e os amplicons foram sequenciados na direção forward usando um kit
632 BigDye Terminator (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e
633 analisados em um sequenciador de DNA automatizado (3500 Genetic Analyzer,
634 Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas foram analisadas utilizando o Editor
635 de Alinhamento de Sequências, BioEdit, e foram utilizadas sequências em triplicata
636 para construir sequências consenso com a ferramenta Clustal W (Aiyar, 2000). Estas
637 sequências de LG1 foram comparadas com as sequências do gene 16S rRNA
638 disponíveis nas bases de dados do GenBank usando a ferramenta de alinhamento
639 BLASTn (Altschul et al., 1990). As sequências foram alinhadas usando o programa
640 Muscle (Edgar, 2004) e, em seguida, utilizadas no programa Gblocks (Castresan, 2000).
641 Uma árvore filogenética foi então construída usando a máxima parcimônia dentro do
642 pacote de software PAUP (versão 4.0b10) e as análises filogenéticas foram realizadas
643 usando o software FigTree 1.3.1. A robustez estatística da análise foi estimada por
644 bootstrapping com 1.000 repetições. A sequência parcial da sequência do gene 16S
645 rRNA do isolado de *S. marcescens* foi depositada no GenBank sob o número de acesso
646 (MG855665).

647 **I.2.3 Tolerância e influência de Mn (II) no crescimento bacteriano**

648 *I.2.3.1 Avaliação da tolerância ao Mn (II)*

649 A tolerância máxima ao Mn (II) no crescimento bacteriano foi avaliada
650 primeiramente em placas de Petri contendo várias concentrações de Mn. As cepas CL11
651 e LG1 foram inoculadas em meio K e NB sólido sem Mn (II) e suplementadas com
652 várias concentrações de Mn (II) (5, 10, 25, 50, 100, 140, 300, 600 ou 1200 mg L⁻¹). As

653 placas foram incubadas a 30 °C e as colônias formadas em cada concentração foram
654 contadas no final de cinco dias.

655 *I.2.3.2 Influência do Mn (II) no crescimento bacteriano*

656 Para avaliar a influência do Mn e do meio nutricional no crescimento de CL11 e
657 LG1, 250 µL de cultura de cada cepa foi inoculada em frascos de 250 mL contendo 100
658 mL de meio NB líquido sem Mn (II) (controle) ou suplementado com várias
659 concentrações de Mn (II) (5, 10, 25 ou 50 mg L⁻¹). Este procedimento foi repetido
660 usando 100 mL de meio K líquido. As culturas foram então cultivadas a 30° C com
661 agitação constante a 150 min⁻¹ e as amostras foram coletadas após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10,
662 12, 24 e 36 h para medir o crescimento bacteriano através da densidade óptica a 600 nm
663 (espectrofotômetro da série 2800 A, Hitachi).

664 **I.2.4 Experimentos de oxidação e adsorção**

665 *I.2.4.1 Ensaio de remoção de Mn (II)*

666 Como nos experimentos anteriores, CL11 e LG1 foram cultivados em meio K e
667 NB contendo 40 mg L⁻¹ Mn (II) e incubados por oito dias. As amostras foram coletadas
668 a cada dois dias para medir a concentração de Mn (espectrometria de emissão atômica
669 por plasma ICP-OES; Varian 725), pH e crescimento bacteriano (densidade óptica a 600
670 nm usando um espectrofotômetro da série Hitachi 2800 A). Após centrifugação a
671 14.681 × g por 15 min, a massa bacteriana foi descartada e a quantidade de Mn
672 removido foi calculada com base na concentração remanescente do elemento no meio
673 de cultura. Os frascos controle (condições abióticas) com o pH ajustado a 7,5 foram
674 mantidos em condições semelhantes e o crescimento bacteriano foi evitado pela adição
675 de ampicilina. A remoção de Mn foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$676 \text{ Remoção (\%)} = ((A - B) / A) \times 100\%$$

677 onde A e B representam as concentrações inicial e final de Mn, respectivamente.

678

679

680 *I.2.4.2 Ensaio de oxidação de Mn (II)*

681 A quantidade de Mn oxidado produzido foi medido colorimetricamente usando o
682 ensaio de corante azul de leucoberbelin (LBB) com KMnO_4 usado para traçar a curva
683 padrão (Hurst et al., 1997). Para realizar o ensaio, 100 μl de sobrenadante da cultura de
684 CL11 e LG1 obtido após centrifugação foram adicionados a alíquotas de 500 μL de
685 0,04% de LBB (Sigma-Aldrich USA), e as amostras foram então armazenadas no
686 escuro durante 3h. A absorbância a 620nm foi mensurada em seguida
687 (espectrofotômetro da série 2800 A, Hitachi).

688 *I.2.4.3 Bioissorção de metal pesado por células microbianas mortas*

689 A capacidade de células microbianas mortas remover Mn (II) foi avaliada pela
690 adição de biomassa produzida em meio líquido K e NB sem Mn (II) em frascos de 250
691 mL contendo 100 mL de solução de 40 mg L^{-1} de Mn (II). Os frascos foram incubados
692 à temperatura ambiente com agitação e alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 12
693 horas durante cinco dias para medir a concentração de Mn (II) usando ICP-OES. Cada
694 alíquota recolhida foi centrifugada durante 5 min a $7155 \times g$ e o sobrenadante resultante
695 foi diluído dez vezes em água destilada e acidificado com solução de HCl (1: 1). O Mn
696 residual no sobrenadante foi medido usando ICP-OES e este valor foi usado para
697 calcular a quantidade de Mn removido pela biomassa. A presença de espécies de Mn
698 oxidadas [Mn (III) ou Mn (IV)] nas amostras foi monitorada pela adição de 0,5 mL de
699 0,04% de LBB em 45 mM de ácido acético e confirmada pela reação positiva azul em
700 poucos segundos.

701 *I.2.4.4 Oxidação de Mn (II) pelo filtrado livre de células*

702 A remoção de Mn por filtrados livres de células também foi estudado, como
703 descrito anteriormente por Learman et al. (2011). Ambas as cepas bacterianas foram
704 cultivadas em meio K e NB líquido durante quatro dias sob as mesmas condições de
705 cultura como descrito acima e depois centrifugadas a $7155 \times g$ durante 20 min. Os
706 sobrenadantes foram filtrados através de membranas de $0,22 \mu\text{m}$ para garantir que os
707 filtrados fossem isentos de células. Cada amostra foi dividida em dois frascos, um
708 contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ proteinase K (Promega) e o outro não. Antes de adicionar 40 mg

709 L⁻¹ de Mn (II) a estes frascos, os frascos contendo proteinase K foram incubados a 37 °C
710 durante três horas. Os frascos foram então mantidos a essa mesma temperatura com
711 agitação constante a 150 min⁻¹ e as amostras foram coletadas a cada 24 horas durante
712 sete dias para medir a concentração de Mn usando ICP-OES e determinar a eficiência de
713 remoção. A oxidação de Mn foi confirmada usando o LBB.

714 **I.2.5 Microscopia eletrônica: análises de espectroscopia de raios X por dispersão** 715 **em energia (EDX) e espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS)**

716 As cepas CL11 e LG1 crescidas por oito dias em meio K e NB líquido contendo
717 40 mg L⁻¹ de Mn (II) foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão
718 (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os ensaios MEV/EDX foram
719 realizados utilizando um sistema FEI Quanta 200 FEG e os ensaios MET/EDX e
720 MET/EELS foram realizados utilizando os sistemas FEI Tecnai G2 12 Spirit BioTwin
721 de 120 kV e Tecnai G2 20 SuperTwin de 200 kV. Os experimentos e análises
722 envolvendo microscopia eletrônica foram realizados no Centro de Microscopia da
723 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

724 **I.2.6 Análise estatística**

725 Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados obtidos foram
726 analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism para determinar
727 diferenças significativas (p <0,05). Os dados apresentados são a média ± SEM e as
728 comparações estatísticas foram realizadas usando regressão linear, ANOVA one-way e
729 ANOVA two-way seguido por testes pós Bonferroni, conforme apropriado.

730 **I.3 Resultados**

731 **I.3.1 Identificação da cepa LG1 e caracterização molecular**

732 A análise comparativa das sequências do gene 16S rRNA revelou que a cepa
733 LG1 compartilhou 99% de similaridade com a sequência do gene 16S rRNA de *S.*
734 *marcescens*, confirmando sua identidade (figura I.1). A sequência parcial da sequência
735 do gene 16S rRNA foi depositada no GenBank sob o número de acesso MG855665. As
736 sequências 16S rRNA de várias bactérias conhecidas como Mn (II)-oxidantes foram

737 incluídas na análise filogenética, bem como a sequência do isolado CL11. O isolado
738 LG1 pigmentado foi agrupado com o gênero *Serratia*, principalmente com *S.*
739 *marcescens*. A ausência do pigmento prodigiosina em cepas de *S. marcescens* não
740 pigmentadas pode ser explicada pela falta da enzima de condensação usada para a
741 biossíntese de prodigiosina (Ding e Williams, 1983). Embora a prodigiosina seja um
742 pigmento característico de *S. marcescens*, sabe-se que sua produção é influenciada por
743 vários fatores ambientais, incluindo disponibilidade de fosfato inorgânico, composição
744 do meio, temperatura e pH (Williams e Quadri, 1980; Grimont, 1977).

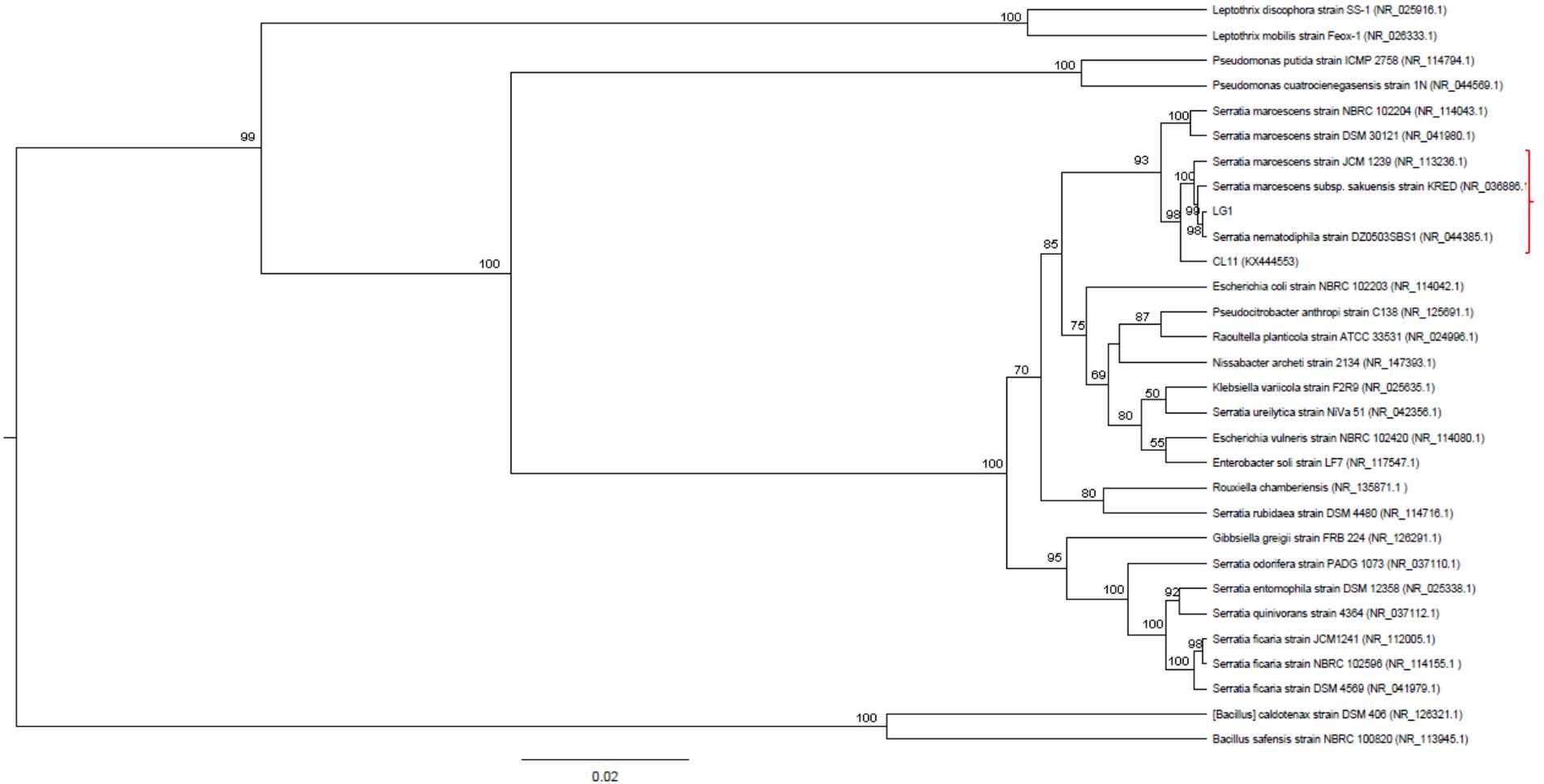
745 **I.3.2 Tolerância e influência de Mn (II) no crescimento bacteriano**

746 A tolerância ao Mn (II) e a influência do Mn (II) foram avaliadas observando o
747 crescimento bacteriano dos isolados LG1 e CL11 em meio líquido e sólido contendo
748 várias concentrações de Mn (II). Nos testes de tolerância de placa, os isolados de LG1 e
749 CL11 mostraram boa tolerância ao Mn (II) e foram capazes de crescer nos meios NB e
750 K em todas as concentrações de Mn (II) testadas (figura I.2). O número de colônias
751 formadas pelo isolado LG1 foi praticamente constante nas placas controle e nas placas
752 contendo Mn (II) para ambos os meios de cultura ($p > 0,05$) (figura I.2A e I.2B). Em
753 contraste, para o isolado CL11, o número de colônias diminuiu com o aumento da
754 concentração de Mn (II), especialmente nas concentrações de Mn (II) de 600 mg L^{-1} e
755 1200 mg L^{-1} ($p < 0,05$) (figura I.2C e I.2D).

756 O isolado LG1 produziu um número maior de colônias do que o CL11, e para
757 ambos os isolados o crescimento bacteriano foi maior no meio NB do que no meio K.
758 Reduções nos tamanhos das colônias, alterações em sua morfologia e escurecimento dos
759 meios e/ou colônias nas placas contendo Mn (II) foram observadas nas concentrações
760 igual e acima de 50 mg L^{-1} nos dois isolados.

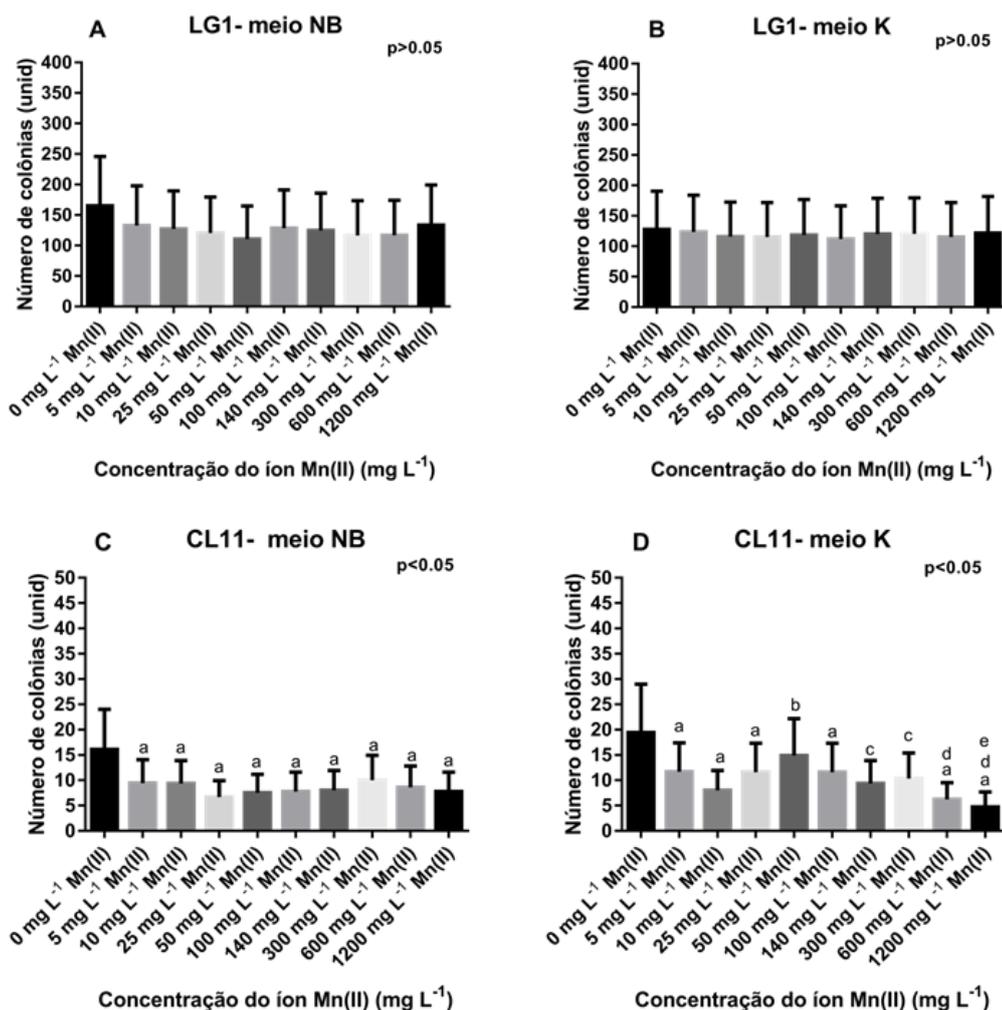
761 Em meios líquidos, as concentrações de Mn (II) testadas não influenciaram o
762 crescimento dos isolados LG1 e CL11 ($p > 0,05$) (figura I.3), e maiores níveis de
763 crescimento foram novamente observados em meio NB (OD LG1 e CL11 $> 2,000$)
764 (figura I.3A e I.3C) do que no meio K (DO LG1 e CL11 $< 1,000$) (Fig. I.3B e I.3D) para
765 ambos isolados.

766



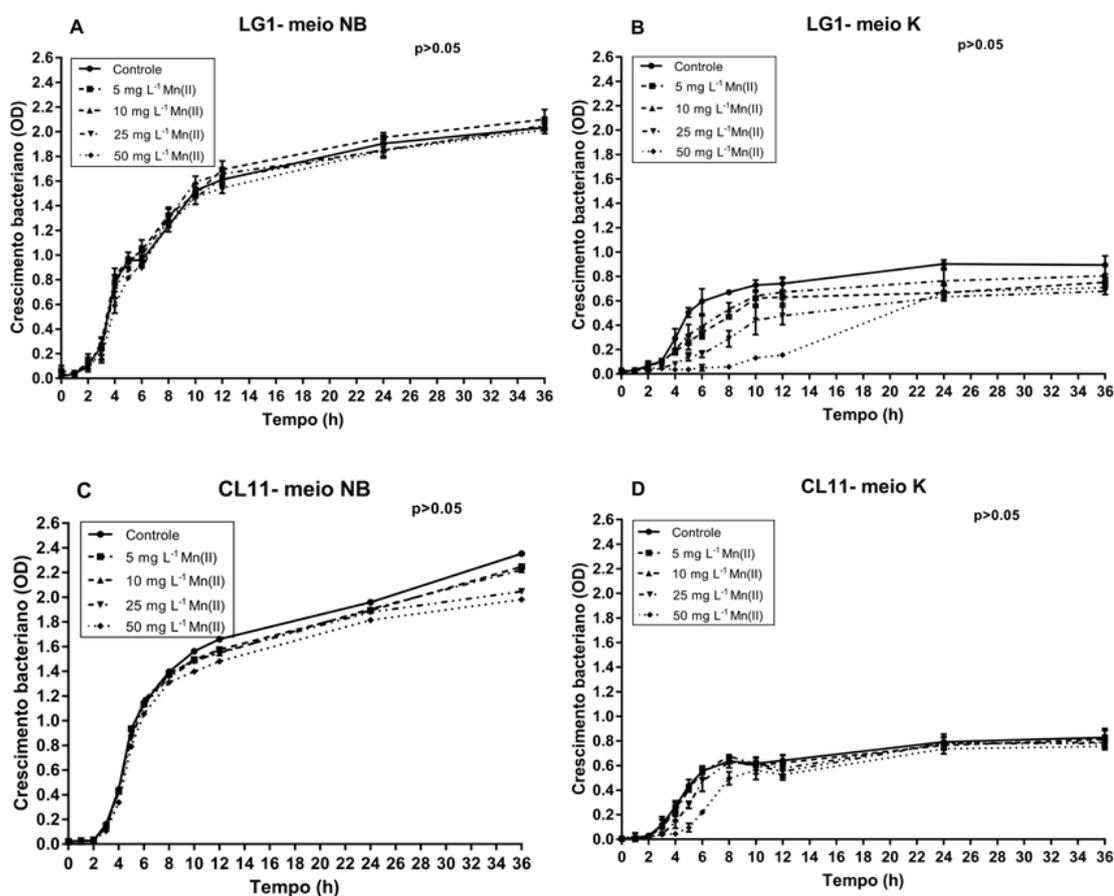
767

768 **Figura I.1-** Identificação filogenética da cepa LG1 com número de acesso do GenBank MG855665



769

770 **Figura I.2-** Tolerância ao Mn (II) das cepas LG1 e CL11 nos meios NB e K (A-D). C e
 771 D: a- significativamente diferente da concentração de 0 mg L⁻¹ Mn (II); b-
 772 significativamente diferente da concentração de 0 e 10 mg L⁻¹ Mn (II); c-
 773 significativamente diferente da concentração de 0 e 50 mg L⁻¹ Mn (II); d-
 774 significativamente diferente da concentração de 5, 25, 50 e 100 mg L⁻¹ Mn (II); e-
 775 significativamente diferente da concentração de 140 e 300 mg L⁻¹ Mn (II).



776

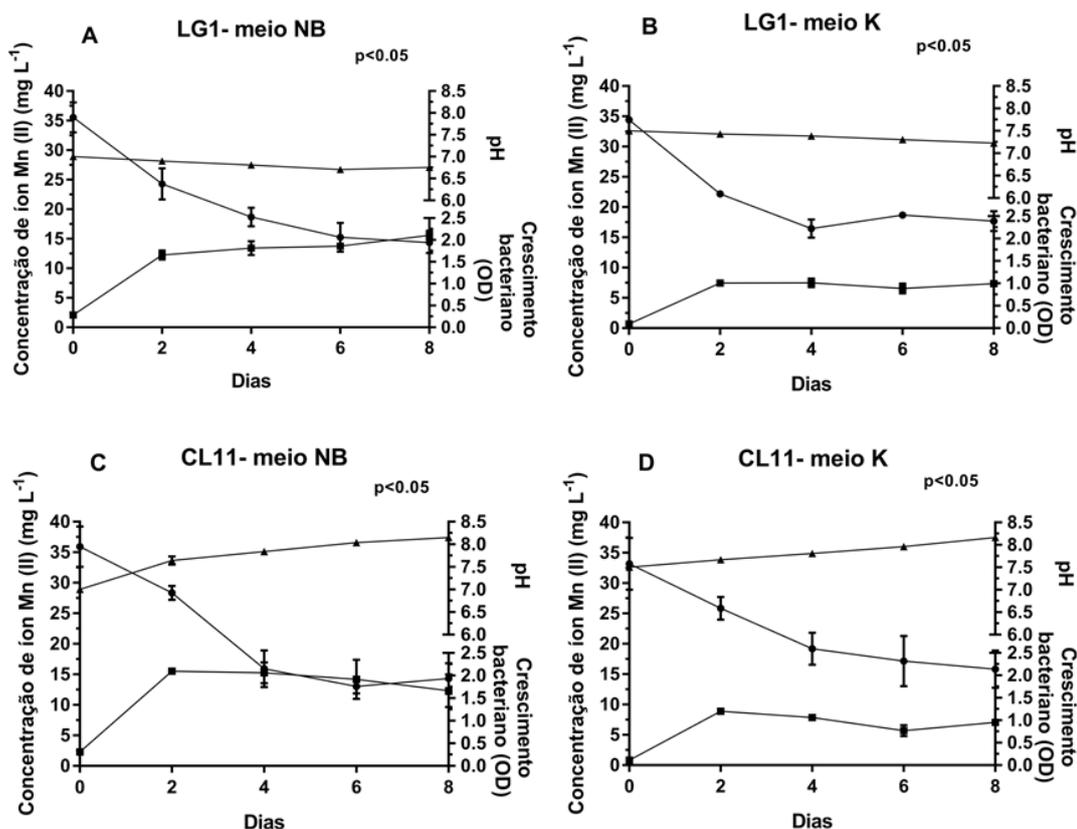
777 **Figura I.3-** Influência do Mn (II) no crescimento de LG1 e CL11 nos meios NB e K. **A:**
 778 LG1 em meio NB; **B:** LG1 em meio K; **C:** CL11 em meio NB; **D:** CL11 em meio K.

779 I.3.3 Experimentos de oxidação e adsorção

780 A habilidade dos isolados LG1 e CL11 em remover o Mn (II) foi investigada
 781 usando vários experimentos como um esforço para elucidar os mecanismos potenciais
 782 usados por bactérias neste processo. Em ambos os meios testados, a remoção de Mn (II)
 783 pelos isolados LG1 e CL11 começou juntamente com o crescimento celular (figura I.4).
 784 Após dois dias a fase estacionária foi alcançada, enquanto o decaimento Mn (II)
 785 mostrou-se contínuo durante toda a duração dos experimentos, especialmente no caso
 786 do meio NB. O pH permaneceu constante durante a remoção de Mn (II) pelo LG1,
 787 diminuindo sutilmente até o final do experimento (figura I.4A e I.4B), enquanto o pH
 788 aumentou durante a remoção do Mn pelo isolado CL11 (figura I.4C e I.4D). No meio
 789 NB, LG1 e CL11 exibiram a mesma média de remoção (64,25%), e as quantidades de
 790 Mn oxidado produzido pelas duas cepas após oito dias foram 26,39 μM e 10,61 μM ,

791 respectivamente (Tabela 1 e 2). No meio K, o LG1 removeu 56% do Mn (II) e produziu
 792 3,13 μM de Mn oxidado, enquanto o CL11 removeu 60,5% do Mn (II) e forneceu 4,15
 793 μM de Mn oxidado. As taxas de remoção de Mn (II), bem como a formação de óxidos
 794 de Mn aumentaram com o crescimento celular. Nenhuma remoção de Mn (II) foi
 795 observada no controle (dados não mostrados).

796



797

798 **Figura I.4-** Remoção de Mn (II) pelos isolados LG1 e CL11 em meio NB e K. **A:** LG1
 799 em meio NB; **B:** LG1 em meio K; **C:** CL11 em meio NB; **D:** CL11 em meio K (**▲** - pH;
 800 **●** -remoção de Mn (II); **■** - crescimento bacteriano).

801

802

803

804

805 **Tabela I.1** - Remoção de Mn (II) e concentrações médias de óxido de Mn apresentadas
 806 pela cepa LG1 em meio NB e K em triplicata.

Dias	Meio NB*		Meio K**	
	Remoção de Mn(II) (%)	Concentração de óxido de Mn (μM) (\pm SD)	Remoção de Mn(II) (%)	Concentração de óxido de Mn (μM) (\pm SD)
0	11.25	5.83 (\pm 0.88)	14.0	0
2	39.5	9.17 (\pm 0.58)	44.5	1.80 (\pm 0.08)
4	53.50	15.28 (\pm 0.92)	53.75	2.72 (\pm 0.52)
6	62.0	19.17 (\pm 0.62)	53.50	2.65 (\pm 0.36)
8	64.25	26.39 (\pm 0.43)	56.0	3.13 (\pm 0.13)

807 *Mn(II) inicial: 35.5 mg L⁻¹. Mn(II) residual: 14.33 mg L⁻¹.
 808 **Mn(II) inicial: 34.4 mg L⁻¹. Mn(II) residual: 17.67 mg L⁻¹.
 809 (\pm SD): desvio padrão
 810

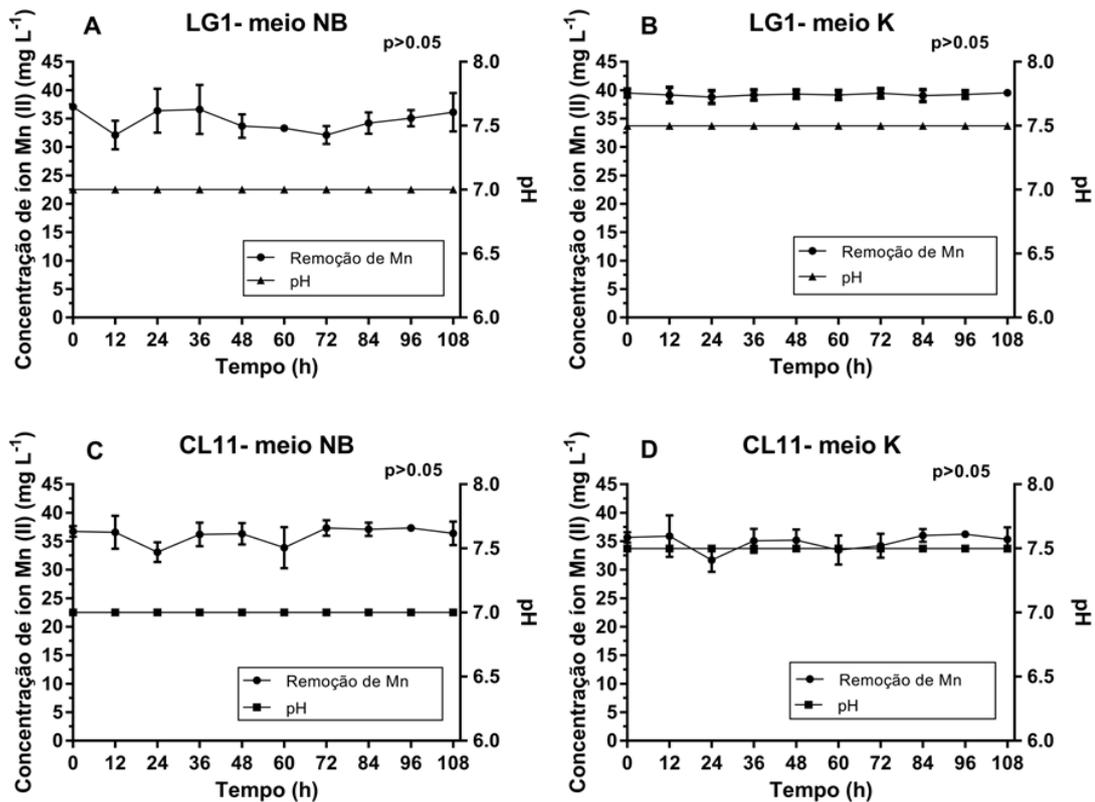
811 **Tabela I.2** - Remoção de Mn (II) e concentrações médias de óxido de Mn apresentadas
 812 pela cepa CL11 em meio NB e K em triplicata.

Dias	Meio NB*		Meio K**	
	Remoção de Mn(II) (%)	Concentração de óxido de Mn (μM) (\pm SD)	Remoção de Mn(II) (%)	Concentração de óxido de Mn (μM) (\pm SD)
0	10.25	0	17.0	0
2	29.25	7.28 (\pm 0.53)	35.5	0
4	54.50	8.94 (\pm 0.73)	52.25	2.01 (\pm 0.07)
6	67.5	10.93 (\pm 0.9)	57.25	3.45 (\pm 0.08)
8	64.25	10.61 (\pm 0.43)	60.5	4.15 (\pm 0.24)

813 *Mn(II) inicial: 35.9 mg L⁻¹. Mn(II) residual: 14.33 mg L⁻¹.
 814 **Mn(II) inicial: 33.2 mg L⁻¹. Mn(II) residual: 15.8 mg L⁻¹.
 815 (\pm SD): desvio padrão
 816

817 Nos experimentos de biossorção de Mn (II) utilizando células mortas (figura
 818 I.5), nenhum dos isolados foi capaz de remover Mn (II) em qualquer um dos meios e o

819 pH não se alterou ao longo do tempo. Da mesma forma, nos ensaios de oxidação de Mn
 820 (II) utilizando filtrados livres de células na presença ou ausência de proteinase K, não
 821 foi observado alguma remoção (figura I.6). Os resultados destes experimentos foram
 822 confirmados usando o ensaio com LBB e sugerem que a remoção de Mn (II) não ocorre
 823 via bioadsorção ou a secreção de proteínas para o meio de cultura. Nenhuma remoção de
 824 Mn (II) foi observada no controle (dados não mostrados).



825 **Figura I.5-** Experimento de remoção de Mn (II) utilizando células mortas das cepas
 826 LG1 e CL11 em meio NB e K. **A:** LG1 em meio NB; **B:** LG1 em meio K; **C:** CL11 em
 827 meio NB; **D:** CL11 em meio K.

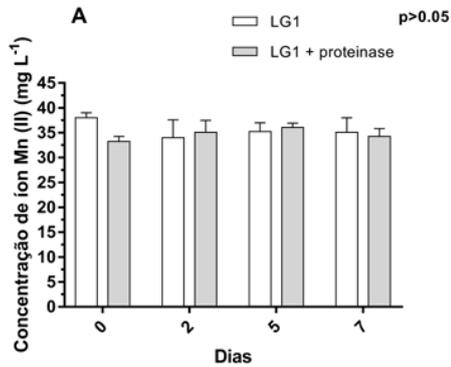
829

830

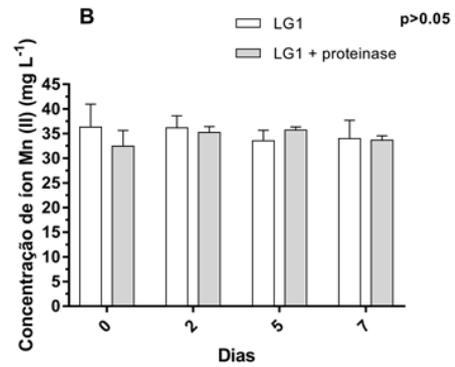
831

832

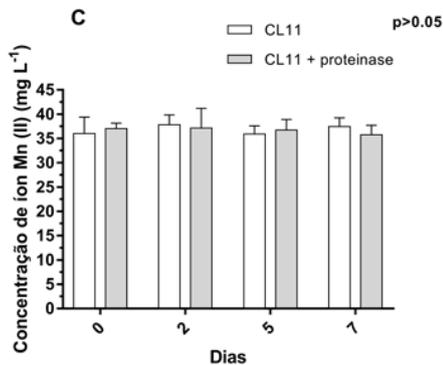
Filtrado livre de células da cepa LG1 em meio NB



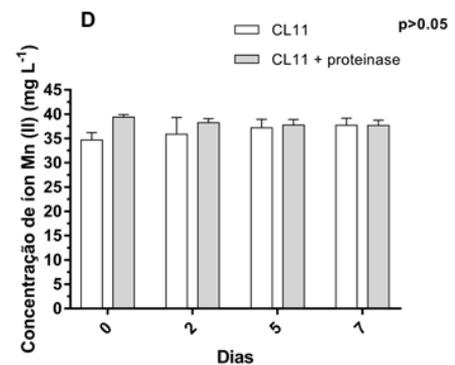
Filtrado livre de células da cepa LG1 em meio K



Filtrado livre de células da cepa CL11 em meio NB



Filtrado livre de células da cepa CL11 em meio K

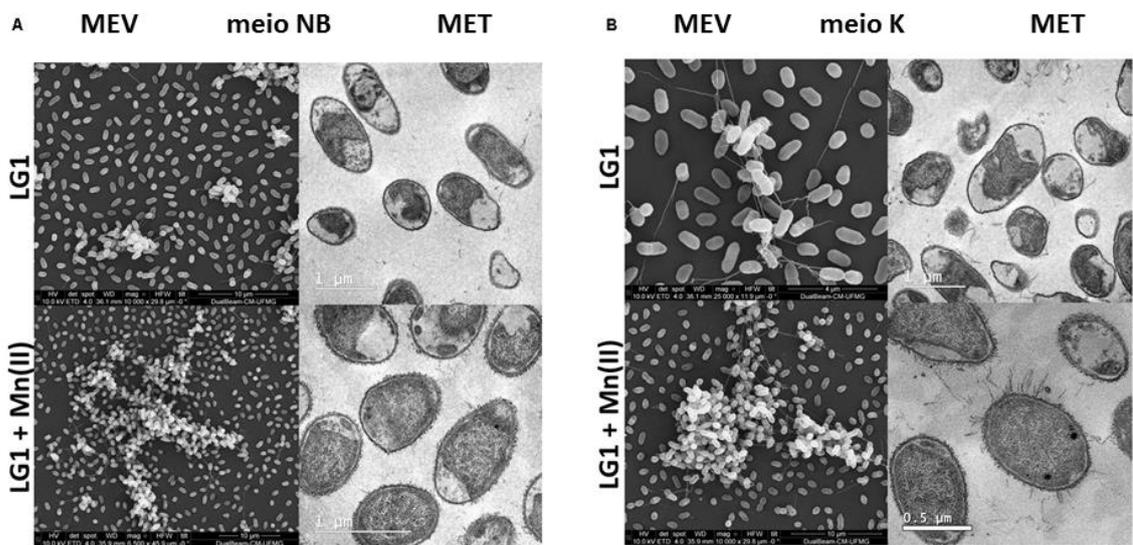


833

834 **Figura I.6-** Experimento de remoção de Mn (II) utilizando filtrados livres de células
835 dos isolados LG1 e CL11 em meio NB e K. **A:** LG1 em meio NB; **B:** LG1 em meio K;
836 **C:** CL11 em meio NB; **D:** CL11 em meio K.

837 I.3.4 Microscopia eletrônica: análises de EDX e EELS

838 As imagens do MEV e MET revelaram que os isolados de LG1 (figura I.7) e
839 CL11 (figura I.8) não continham agregados nem na membrana celular e nem no interior
840 da célula após serem cultivados no meio K e NB na ausência de Mn (II). Quando os
841 isolados foram cultivados na presença de Mn (II), embora o Mn não tenha sido
842 detectado dentro ou fora das células LG1 crescidas em meio NB e K por análise de
843 EDX, foi encontrado dentro das células cultivadas em meio NB pela análise de EELS
844 (figura I.9A). O espectro de EELS apresentou um pico em uma região entre os valores
845 de energia de oxigênio (532 eV) e Mn (651 eV), que pode ser atribuído a uma espécie
846 de Mn oxidada (figura I.9B). Um precipitado extracelular contendo uma fase mineral de
847 Mn foi observado apenas no isolado CL11 crescido em meio K, como investigado pelo
848 espectro MET/ EDX (figura I.10).



849

850

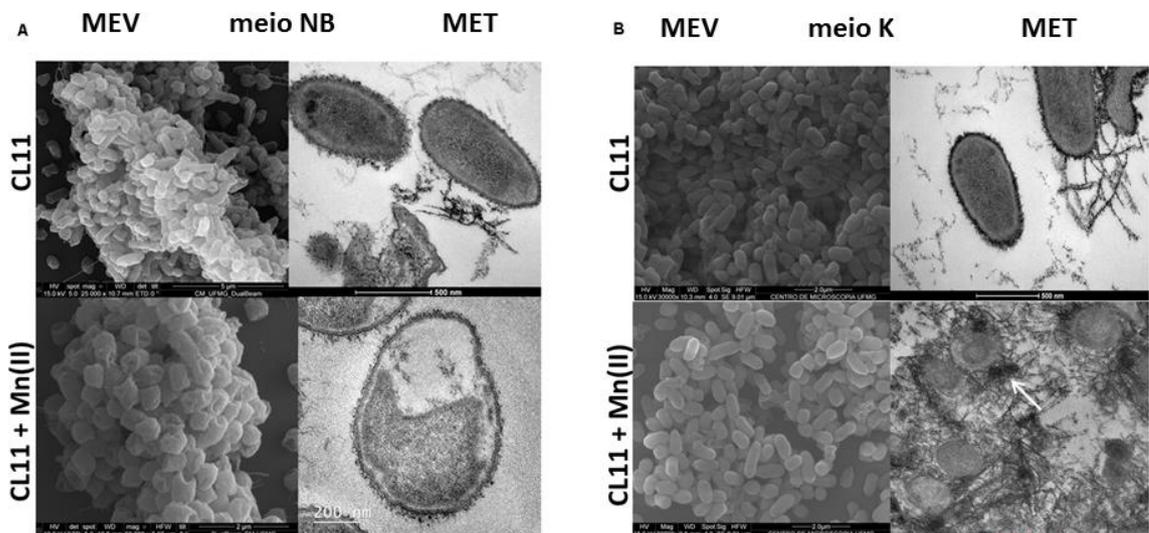
851

852

853

Figura I.7- Microscopia eletrônica do isolado LG1 cultivado em meio NB (A) e K (B) na presença ou ausência de $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn(II)}$ por oito dias. Não foram encontradas diferenças estruturais nas células LG1 através da análise de MEV e MET e a análise de EDX não detectou Mn dentro ou fora das células LG1 crescidas em meio NB e K.

854



855

856

857

858

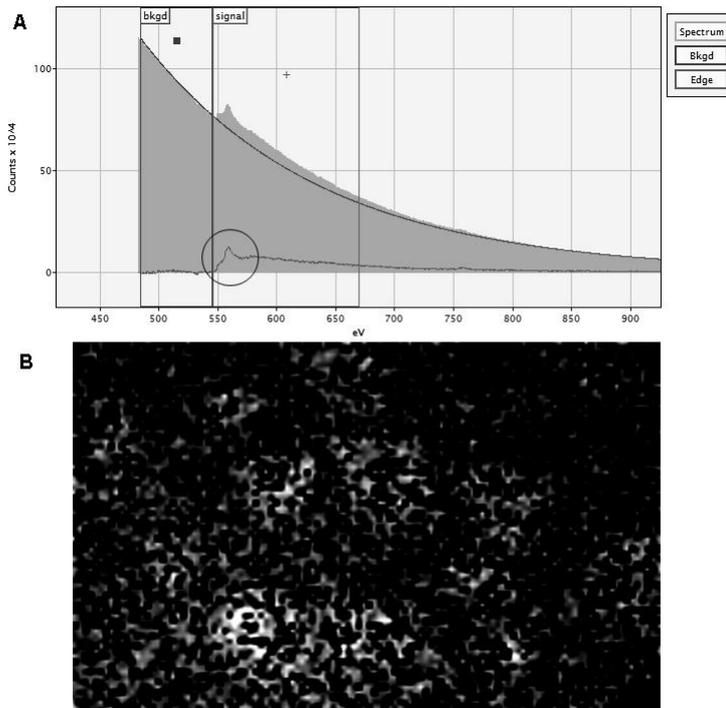
859

860

Figura I.8- Microscopia eletrônica do isolado CL11 cultivado em meio NB (A) e K (B) na presença ou ausência de $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn(II)}$ por oito dias. Não foram encontradas diferenças estruturais nas células CL11 através da análise MEV e MET, mas a análise MET / EDX encontrou uma precipitação extracelular de uma fase mineral contendo Mn no isolado CL11 cultivado em meio K.

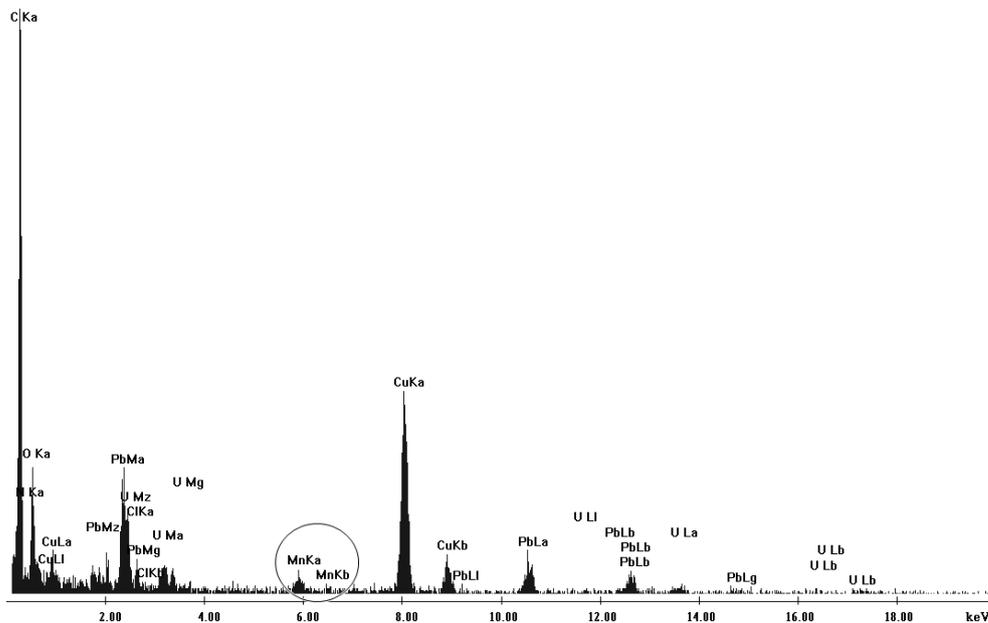
861

862



863

864 **Figura I.9-** Espectro de EELS (A) e mapa de Mn (B) revelado das células LG1
 865 cultivadas em meio NB. O espectro de EELS mostrou um pico em uma região entre os
 866 valores de energia de oxigênio (532 eV) e Mn (651 eV), que pode ser atribuída a uma
 867 espécie de Mn oxidada representada pelo mapa de Mn. A cor branca representa
 868 manganês e a cor preta representa o oxigênio.



869

870 **Figura I.10-** Resultado da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) dos
 871 isolados de CL11 cultivados em meio K com 40 mg L⁻¹ de Mn (II).

872 I.4 Discussão

873 As cepas de *S. marcescens* usadas em estudos de remoção de metais pesados
874 foram isoladas de ambientes aquáticos e terrestres sob várias condições. A ocorrência
875 generalizada desta espécie indica um forte potencial adaptativo e de sobrevivência, e
876 capacidade de utilizar uma ampla gama de nutrientes (Szewzyk et al., 1993). A
877 tolerância a altas concentrações de Mn (II) exibidas pelas cepas LG1 e CL11, bem como
878 sua capacidade de crescer em várias concentrações de Mn (II) sob dois diferentes tipos
879 de condições nutricionais, demonstra claramente a adequação desta espécie a diferentes
880 situações. A alta resistência a Mn (II) pode ser atribuída à menor toxicidade deste
881 elemento em comparação a outros metais pesados (Nies, 1999). Barboza et al. (2017)
882 relataram que cepas de *S. marcescens* isoladas da drenagem de minas foram capazes de
883 crescer e tolerar as mesmas concentrações de Mn (II) usadas neste trabalho. Jafarzade et
884 al. (2012) também demonstraram a tolerância e crescimento de cepas de *S. marcescens*
885 isoladas de ambientes marinhos, mas usaram concentrações mais baixas de Mn (II)
886 variando de 50 a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O crescimento de enterobactérias em baixas e altas
887 concentrações de Mn é possível pelo sistema de transporte presente na membrana
888 interna, que controla a absorção e exportação deste metal e garante que sua
889 disponibilidade seja adequada às necessidades biológicas, opondo a sua toxicidade
890 (Kehres e Maguire, 2003; Porcheron et al., 2013). Na presença de altas concentrações
891 de Mn, sua absorção é suprimida e seu efluxo é ativado, permitindo que a célula
892 sobreviva em ambientes com altas concentrações de Mn.

893 A biossorção e a biomineralização são os processos biológicos mais comuns
894 utilizados na biorremediação de metais pesados (Gadd, 2004, 2010) e estudos anteriores
895 demonstraram o potencial de várias bactérias em promover a remoção eficiente do Mn
896 (II) (Francis et al., 2001; Wang et al., 2011; Tang et al., 2014; McKee et al., 2016; Tang
897 et al., 2016; Zhou et al., 2016). A maioria desses estudos envolveu culturas bacterianas
898 puras e consórcios que foram capazes de remover o Mn (II) por mecanismos de
899 oxidação e/ou adsorção, e as concentrações de Mn (II) investigadas foram muito
900 menores do que as utilizadas neste trabalho. Uma cepa de *Bacillus sp.* isolada de
901 esponjas (Wang et al., 2011), uma cepa de *Lysinibacillus sp.* isolada de minas de Mn
902 (Tang et al., 2016) e um consórcio bacteriano isolado de sedimentos marinhos (Zhou et

903 al., 2016) foram usadas em experimentos de remoção de Mn com concentrações de Mn
904 (II) de 50 μ M – 200 μ M, 1 mM e 0,1–5 mM, respectivamente, ao longo de períodos de
905 até 16 dias.

906 Para realizar a remoção de Mn (II), as cepas LG1 e CL11 utilizam mecanismos
907 que envolvem a oxidação desse íon para suas formas oxidadas Mn (III) e Mn (IV). O
908 pH, tipo de meio de cultura e aumento no crescimento celular influenciaram na
909 diminuição da concentração de Mn (II), o que contribuiu para as altas taxas de remoção
910 obtidas após oito dias (56-64,25%) e na formação de óxidos de Mn. Sabe-se que o
911 tempo de inoculação, fatores ambientais, concentração celular final e estado de
912 enriquecimento da cultura influenciam a oxidação de Mn (II), e valores de pH entre 6,0
913 e 8,5 têm sido relatados para favorecer a formação de óxidos de Mn em vias biológicas
914 (Tebo et al., 2005; McKee et al., 2016). Embora a eficiência de remoção de Mn tenha
915 sido alta para ambos os isolados nos dois meios de cultura testados, uma maior
916 quantidade de óxidos de Mn foi produzida no meio NB. Os óxidos de Mn têm valor
917 econômico, pois podem ser usados para a oxidação de vários compostos orgânicos e
918 inorgânicos, como substâncias húmicas, Cr (III) e Fe (II), e para a remoção de vários
919 metais pesados, como Cu, Cd, Zn, Ni, Pb e cobalto (Co) do ambiente (Francis et al.,
920 2001; Tebo et al., 2004). Assim, a remoção de Mn (II) no meio NB introduziria valor
921 econômico adicional devido à maior taxa de produção de óxidos de Mn, especialmente
922 no caso do isolado LG1.

923 Esta é a primeira vez que o potencial e a eficiência do meio NB para a remoção
924 de Mn (II) foram demonstrados. Além de influenciar a produção de óxido de Mn, esse
925 meio promoveu maior crescimento bacteriano dos isolados LG1 e CL11 em relação ao
926 meio K, que é frequentemente utilizado em experimentos envolvendo Mn. Embora
927 ambos os meios tenham uma composição semelhante, o meio NB possui uma
928 concentração muito maior de nutrientes, o que seria esperado influenciar o metabolismo
929 bacteriano e a oxidação de Mn (II). Francis et al. (2001) observaram que as
930 concentrações relativas de aminoácidos específicos ou outros componentes traços
931 presentes nas várias peptonas do meio de cultura influenciaram a oxidação de Mn
932 (expressão de Mn (II) oxidase) pela cepa *Erythrobacter sp.* SD-21.

933 Ensaio de oxidação de Mn (II) utilizando células mortas e filtrados livres de
934 células na presença e ausência de proteinase K foram realizados para investigar os
935 possíveis mecanismos envolvidos na remoção de Mn (II). As células podem adsorver
936 metais pesados do meio e a secreção de proteínas pelas células pode alterar as condições
937 ambientais por favorecer a oxidação de Mn (II) para Mn (III) ou Mn (IV) (Learman et
938 al., 2011; Sujitha e Jayanthi, 2014). Entretanto, nenhuma remoção de Mn (II) foi
939 observada nesses dois ensaios, indicando que a remoção de Mn (II) não ocorre por
940 nenhum desses mecanismos. A esse respeito, parece que as cepas LG1 e CL11
941 promovem a oxidação de Mn (II) por mecanismos distintos que não envolvem
942 biossorção ou oxidação de Mn (II) por enzimas secretadas extracelularmente.

943 A análise MET/ELLS revelou a presença de Mn apenas dentro das células LG1
944 crescidas no meio NB e a análise MET/EDX revelou o Mn na forma de precipitados
945 extracelulares no caso de células CL11 cultivadas no meio K. Durante a oxidação de
946 Mn (II), a cepa LG1 não alterou o pH em nenhum dos meios, mas esse fator foi
947 aumentado em ambos os meios contendo a cepa CL11. O processo de biomineralização
948 do Mn pode ocorrer por vias diretas ou indiretas, sendo este considerado o mecanismo
949 utilizado por essas cepas na remoção do Mn (II). A cepa LG1 pigmentada pode ter
950 promovido por mecanismos diretos a biooxidação de Mn, mediada por componentes
951 celulares como proteínas que não são secretadas no meio extracelular, enquanto que a
952 cepa CL11 não pigmentada pode ter utilizado mecanismos indiretos na biooxidação de
953 Mn através da produção de um determinado produto microbiano e / ou crescimento
954 bacteriano que alterou o pH do meio. Também pode ter acontecido que parte da
955 remoção de Mn (II) por CL11 ser devido à precipitação de Mn (II) como $MnCO_3$, pois
956 esta conversão é favorecida em valores de pH acima de 8,0 e sob condições de alto
957 potencial redox ($E_h = 418 \text{ mV}$) (Zhou et al., 2010).

958 Os resultados deste estudo demonstram que os isolados LG1 e CL11 exibem alta
959 tolerância e remoção eficiente de altas concentrações de Mn, e poderiam ser
960 potencialmente aplicadas no tratamento de efluentes contaminados com este metal.
961 Além de promover altos níveis de remoção de Mn, também foi observada a formação de
962 óxidos de Mn que possui valor econômico agregado, principalmente para a cepa LG1
963 pigmentada. O meio NB desempenhou papéis importantes na formação do óxido Mn e

964 na remoção do Mn (II), sendo esta a primeira vez que o potencial deste meio foi
965 demonstrado em experimentos envolvendo o Mn. A produção de prodigiosina também é
966 favorecida no meio NB (Grimont e Grimont, 2006) e sugerimos que este pigmento
967 possa ajudar a promover a formação de óxidos de Mn, uma vez que a cepa LG1 foi
968 capaz de tamponar o pH do meio para favorecer a oxidação biológica de Mn sob
969 condições de pH neutro. No entanto, experimentos futuros são necessários para
970 determinar o papel da prodigiosina na remoção e oxidação de Mn.

971

972 **I.5 Conclusão**

973 A alta tolerância ao Mn (II) apresentada pelas cepas pigmentadas e não
974 pigmentadas de *S. marcescens* e sua capacidade de crescer em altas concentrações de
975 Mn (II) em meio rico em nutrientes (NB) e pobre em nutrientes (K), bem como remover
976 este íon de qualquer meio de cultura, reforçam ainda mais a aplicabilidade desta espécie
977 em processos de biorremediação de Mn em vários ambientes aquáticos. O alto potencial
978 do meio NB para a remoção de Mn e a produção de óxidos de Mn foi demonstrado,
979 especialmente para a cepa LG1. A esse respeito, sugerimos que esse meio de cultura
980 também possa ser utilizado em grandes reatores biológicos contínuos para o tratamento
981 de efluentes contaminados com Mn.

982

983

984

985

986

987

988 6. CAPÍTULO II: Alterações na composição proteômica de *Serratia*
989 *marcescens* em resposta ao manganês (II)

990 Pollyana Santos Queiroz, France Anne Dias Ruas, William de Castro Borges e Renata
991 Guerra-Sá.

992

993 Nesse capítulo, utilizamos a abordagem da proteômica, que é uma ferramenta
994 importante para a investigação de respostas fisiológicas dinâmicas de micróbios sob
995 estresse por metais pesados. Para obter informações sobre como as bactérias respondem
996 ao manganês (II) e identificar as proteínas envolvidas na oxidação de Mn (II), a
997 abordagem proteômica foi aplicada a um isolado de *Serratia marcescens* oxidante de
998 Mn (II) cultivada na ausência e na presença de Mn (II). Foi observado que a cepa LG1,
999 que cresceu igualmente bem nas duas condições, expressou um conjunto de proteínas
1000 relacionadas aos processos celulares vitais para a sobrevivência, bem como proteínas
1001 envolvidas na adaptação e tolerância ao Mn (II). A multicobre oxidase CueO foi
1002 identificada, indicando sua provável participação na biooxidação de Mn (II); no entanto,
1003 sua expressão não foi modulada pela presença de Mn (II). Um conjunto de proteínas
1004 relacionadas aos processos celulares e metabólicos vitais para as células foram down-
1005 reguladas na presença de Mn (II), enquanto as proteínas relacionadas à membrana
1006 celular envolvidas na manutenção da integridade celular e sobrevivência sob estresse
1007 foram up-reguladas sob essa condição. Esses achados indicam que a cepa LG1 pode ser
1008 aplicada com sucesso na biorremediação de Mn (II), e a abordagem shotgun fornece um
1009 meio eficiente para a obtenção do proteoma total dessa espécie.

1010

1011 Esse capítulo foi publicado como “Alterations in the proteomic composition of *Serratia*
1012 *marcescens* in response to manganese (II)” na revista BMC Biotechnology Volume 18:
1013 83, 2018, doi: 10.1186/s12896-018-0493-3

1014

1015 **II.1 Introdução**

1016 A contaminação de manganês (Mn) em águas industriais, águas subterrâneas e
1017 águas potáveis tem sido um problema crescente em muitas partes do mundo
1018 (Franciskovic-Bilinski et al., 2007). O excesso de Mn solúvel (II) pode ser tóxico e
1019 causar grandes danos à saúde, sendo necessário a sua remoção dos ambientes de
1020 ambientes contaminados (Who, 2011; Barboza et al., 2017b). Bactérias oxidantes de Mn
1021 (II) conseguem tolerar este metal e oxidá-lo em óxidos de Mn (III)/(IV) insolúveis
1022 promovendo sua precipitação. Diferentes mecanismos são utilizados na sua remoção
1023 que variam desde vias indiretas como a biossorção, a vias diretas que envolvem enzimas
1024 como as multicobre oxidases (MCO), hemeperoxidases e uma proteína reguladora de
1025 dois componentes (Brouwers et al., 2000).

1026 Os mecanismos moleculares envolvidos na remoção do Mn (II), assim como as
1027 respostas fisiológicas das bactérias em resposta presença desse metal, podem ser obtidos
1028 a partir de análises proteômicas. Estudos proteômicos com microrganismos ambientais
1029 têm sido conduzidos devido os importantes atributos apresentados por essas espécies
1030 que os permitem tolerar, degradar ou precipitar compostos tóxicos, assim como, sua
1031 versatilidade em usar doadores de elétrons, aceptores de elétrons e fontes de carbono e
1032 energia (Lacerda e Reardon, 2009). A aplicação dessa ferramenta molecular permite
1033 responder essas características microbianas através da expressão de proteínas e também
1034 fornece uma visão global do complemento proteico desses sistemas biológicos (Lacerda
1035 e Reardon, 2009; Jehmlich et al., 2010).

1036 Dentre os poucos trabalhos proteômicos envolvendo bactérias oxidantes de Mn,
1037 podemos destacar a análise comparativa do proteoma de duas bactérias marinhas, uma
1038 oxidante de Mn (II), *Roseobacter sp.* AzwK-3b, com outra não oxidante, *Ruegeria sp.*
1039 TM1040. Ambas apresentaram uma variedade de proteínas expressas em resposta a esse
1040 metal, porém tais proteínas não tiveram relação com a oxidação do Mn (II). A enzima
1041 hemeperoxidase associada à oxidação do Mn (II) foi identificada no proteoma da cepa
1042 oxidante, mas a sua expressão não foi modulada pela presença desse metal (Learman e
1043 também Hansel, 2014).

1044 Cepas de *Serratia marcescens* também conseguem tolerar e remover altas
1045 concentrações de Mn (II) (Barboza et al., 2017b; Queiroz et al., 2018). No entanto, seu
1046 perfil proteômico em resposta a este metal ainda precisa ser elucidado. Essa espécie é
1047 um patógeno oportunista pertencente à família Enterobacteriaceae, caracterizado por sua
1048 capacidade de produzir importantes pigmentos e secretar enzimas como fosfolipases,
1049 proteases e nucleases (Hines et al., 1988; Grimont e Grimont, 2006). Os poucos estudos
1050 proteômicos envolvendo *S. marcescens* somente identificaram proteínas em resposta ao
1051 estresse causado pela exposição ao excesso de ondas de rádio (Zakeri et al., 2012),
1052 toxinas antibacterianas secretadas pelo sistema de secreção tipo VI (Fritsch et al., 2013),
1053 proteínas expressas em condições autotróficas e heterotróficas (Bharti et al., 2014),
1054 proteínas moduladas pela microgravidade (Wang et al., 2014) e proteínas da maquinaria
1055 quitinolítica (Tuveng et al., 2017).

1056 A fim de identificar as proteínas envolvidas na resposta de *S. marcescens* à
1057 presença de Mn (II) e envolvidas na oxidação, o objetivo principal deste trabalho foi
1058 obter o perfil proteômico da cepa *S. marcescens* LG1 oxidante de Mn (II). Esta cepa foi
1059 cultivada na ausência e presença de Mn (II), e o primeiro proteoma total dessa espécie
1060 foi obtido através da abordagem proteômica shotgun, aplicada pela primeira vez
1061 também no estudo de uma cepa de *S. marcescens* oxidante de Mn (II).

1062

1063 **II.2 Materiais e Métodos**

1064 **II.2.1 Amostra bacteriana**

1065 A cepa *S. marcescens* LG1 foi isolada de uma água coletada em um lago
1066 contaminado em Ouro Preto, Minas Gerais, e foi selecionada por sua resistência a Mn
1067 (II). Alíquotas da cultura de LG1 estavam preservadas a -80° C em meio nutriente
1068 líquido (NB) (10 g/L de peptona, 3 g/ L de extrato de levedura, 5 g/L NaCl, pH 7,0)
1069 para experimentos futuros (Queiroz et al., 2018).

1070

1071 **II.2.2 Curva de crescimento LG1 e remoção de Mn (II)**

1072 Para construir a curva de crescimento, 1 mL de cultura preservada da cepa LG1
1073 foi pré-cultivada overnight em 9 mL de meio NB sob agitação constante a 150 rpm a
1074 30° C. Em seguida, essa pré-cultura (em triplicata) foi inoculada em frascos de 250 mL
1075 contendo 90 mL de meio NB puro e suplementado com 40 mg/L de Mn (II) (MnSO₄ •
1076 H₂O). Os frascos foram incubados por 48 h e alíquotas foram coletadas após 1, 2, 3, 4,
1077 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 h para avaliar o crescimento bacteriano através da medida da
1078 densidade óptica a 600nm (OD600). (Espectrofotômetro Hitachi 2800A).

1079 A concentração de Mn (II) e a contagem padrão de células foram determinadas
1080 nas amostras coletadas nos tempos de 1, 24 e 48 h. Estas amostras foram centrifugadas a
1081 14.681 × g durante 15 min e os sobrenadantes foram analisados por espectrometria de
1082 emissão atômica por plasma (Varian 725 ICP-OES) para avaliar o decaimento de Mn
1083 (II) no meio. A taxa de remoção de Mn (II) foi calculada usando a fórmula:

1084

$$1085 \text{Removal (\%)} = (A - B) / A \times 100\%$$

1086 onde **A** representa a concentração inicial e **B** a concentração final de Mn (II).

1087 A presença de espécies oxidadas de Mn (Mn III/IV) nas culturas de 48 h foi
1088 avaliada colorimetricamente usando o corante azul de leucoberbelin (LBB). A cultura
1089 foi centrifugada e 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 500 µL de 0,04% de
1090 LBB (Sigma-Aldrich USA). Após a incubação, o meio foi examinado quanto a
1091 alterações na cor.

1092 Frascos de 250 mL incubados contendo meio NB puro suplementado com
1093 ampicilina (para evitar o crescimento bacteriano) serviram como controles.

1094 **II.2.3 Experimentos proteômicos *shotgun bottom-up***

1095 *II.2.3.1 Extração de proteínas e eletroforese “short run” em gel 1D*

1096 Culturas de LG1 (em triplicata biológica) foram cultivadas na presença e
1097 ausência de Mn (II). Após 48 h, as culturas foram centrifugadas a 7,168 × g por 10 min.

1098 Os pellets gerados foram lavados com PBS 1x, ressuspendidos em 1 mL de tampão de
1099 extração (Tris HCl 50 mM pH 7,5, dithiothreitol (DTT) 1 mM, coquetel inibidor de
1100 proteína diluído 1: 100) e sonicados cinco vezes por 30s. As amostras foram incubadas
1101 a 37° C por 1h, centrifugadas a 20.000 × g por 1 h e parte do sobrenadante foi usado
1102 para estimar a quantidade de proteínas a partir do método BCA (ácido bicinconínico)
1103 usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Sigma-Aldrich QuantiPro™
1104 BCA Assay Kit). O sobrenadante restante foi precipitado com acetona e tricloroacético
1105 (TCA) (1: 8: 1), incubado a -20° C overnight e depois centrifugado a 18.000 x g durante
1106 15 min. O pellet foi lavado com acetona gelada e suspenso com 100 ul do mesmo
1107 tampão de extração.

1108 20 µg de proteínas de cada alíquota foi utilizada em uma rápida e curta
1109 eletroforese (short run) em gel 1D (10% SDS PAGE) durante 5 min até as proteínas
1110 entrarem no gel formando uma única banda. Este procedimento teve como objetivo
1111 concentrar as proteínas e eliminar possíveis interferências de metabólitos secundários e
1112 pigmentos nas amostras de proteínas. Como a cepa *S. marcescens* LG1 é pigmentada,
1113 seu pigmento pode atrapalhar a leitura do aparelho de cromatografia líquida acoplada à
1114 espectrometria de massas (LC-MS/MS).

1115 *II.2.3.2 Digestão das proteínas e análise no LC-MS /MS*

1116 As bandas únicas do gel 1D foram cortadas e descoradas em solução de metanol
1117 a 40% e ácido acético a 7% a 37° C. Após a lavagem, os géis foram incubados com
1118 DTT 50 mM a 65° C durante 30 min e depois com iodoacetamida 100 mM no escuro a
1119 25 °C durante 1 h, para redução e alquilação de resíduos de cisteína, respectivamente.
1120 As bandas de gel foram lavadas com NH₄HCO₃ 20 mM durante 20 min, três vezes e
1121 secadas. Em seguida, foram incubadas em uma solução de tripsina modificada própria
1122 para sequenciamento (Promega, Madison, EUA) com NH₄HCO₃ 40 mM durante 20 min
1123 a 25° C e depois com NH₄HCO₃ 20 mM durante 12 h a 37° C. O sobrenadante foi
1124 preservado a frio e os peptídeos foram extraídos do gel utilizando uma solução de ácido
1125 trifluoroacético a 0,1 % e acetonitrila (ACN) a 50% durante 20 min. O sobrenadante
1126 gerado foi adicionado ao primeiro sobrenadante, seco a vácuo e suspenso em ácido
1127 fórmico a 0,1%.

1128 Um sistema Dionex UltiMate® 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen,
1129 Alemanha) foi utilizado para separar os peptídeos tripticos previamente digeridos. 500
1130 ng de peptídeos obtidos da digestão enzimática das três repetições biológicas foram
1131 separados sob gradiente de eluição, usando uma coluna Nano-Trap Acclaim
1132 PepMap100 C18 (75 µm id × 2 cm, 3 µm, 100 Å, Thermo Scientific) on-line com uma
1133 coluna capilar Acclaim PepMap100 C18 (75 µm id × 15 cm, 2 µm, 100 Å, Thermo
1134 Scientific). A preparação peptídica foi previamente lavada com solução de acetonitrila a
1135 2% e ácido trifluoroacético a 0,1% durante 3 min. Os peptídeos foram separados com
1136 um gradiente de múltiplos passos utilizando uma combinação de solventes A (0,1% de
1137 ácido fórmico) e solvente B (80% de ACN/0,1% de ácido fórmico) a 40° C. O gradiente
1138 variou de 4 a 50% de solvente B ao longo de 120 min. Os espectros foram adquiridos
1139 usando um espectrômetro de massa Q-Exactive™ (Thermo Scientific), acoplado ao
1140 sistema UHPLC através de uma fonte de íons Nanospray. Os espectros MS/MS foram
1141 obtidos com uma resolução de 17.500, um tempo máximo de injeção de 60 ms e um
1142 valor alvo de AGC de 5e⁵ íons. Após cada dado MS/MS obtido, um tempo de exclusão
1143 dinâmica de 30 s foi aplicado.

1144 O instrumento operou a 1,9 kV, no modo positivo, com uma resolução de 70.000
1145 na faixa de 300–1750 *m/z*, um tempo máximo de injeção de 120 ms e um valor alvo de
1146 controle automático de ganho (AGC) de 1e⁶ íons. Até 12 íons precursores mais intensos
1147 com carga entre 2-5 (excluindo isótopos) foram isolados com uma janela de 2 *m/z* e
1148 fragmentados por dissociação colisional de alta energia (HCD) com energia de colisão
1149 normalizada de 28-30 V. Os espectros MS/MS obtidos exibiram uma resolução de
1150 17.500 com um tempo máximo de injeção de 60 ms e um valor de contagem de íons
1151 alvo de AGC de 5e⁵ íons.

1152 **II.2.4 Processamento de dados e análise bioinformática**

1153 Os dados brutos do MS foram submetidos a uma pesquisa no banco de dados do
1154 software PEAKS, versão 8.5. As proteínas foram identificadas através da comparação
1155 de dados MS/MS² contra uma base de dados compilados da UniProt contendo 5.075
1156 sequências de *Serratia* (download em 6 de dezembro de 2017) e contra um banco de
1157 dados personalizado do proteoma previsto de *S. marcescens*. Os seguintes parâmetros

1158 foram utilizados: enzima tripsina, permitindo no máximo duas clivagens perdidas, e
1159 carbamidometilação e oxidação da metionina como modificações variáveis. Outros
1160 parâmetros tais como estado de carga máxima (+7), tolerância isotópica ao fósforo (2
1161 ppm) e comprimento mínimo do pico (2) foram também incluídos e a tolerância ao
1162 precursor foi estabelecida em 4,5 ppm.

1163 O método LFQ (Label-Free Quantification) usando os dados de intensidade
1164 maxLFQ sob o modo padrão foi aplicado para determinar a abundância relativa de
1165 proteínas (Cox et al., 2014). Os parâmetros globais foram selecionados para realizar
1166 quantificações repetidas e obter correspondência entre as execuções. As sequências
1167 invertidas de todas as entradas de proteína foram concatenadas para estimar o FDR. O
1168 FDR e o Matching Sequence Peptide (PSM) foram ajustados para 0,01, o comprimento
1169 mínimo do peptídeo era 7 e um único peptídeo era necessário. A opção de um segundo
1170 peptídeo foi usada para reduzir a perda de peptídeos co-eluentes. O conjunto de
1171 proteínas diferencialmente expressas identificadas na ausência e presença de Mn (II) nas
1172 triplicatas biológicas foi validado através do software PEAKS.

1173 A anotação das proteínas foi obtida a partir do UniProtKB e categorizadas
1174 usando o GO e o Blast2GO, que se baseiam na função molecular, processo biológico e
1175 componente celular para classificar as proteínas. O alinhamento das sequências
1176 proteicas também foi realizado utilizando o Blastp através da comparação com as
1177 sequências presentes nos bancos de dados do NCBI.

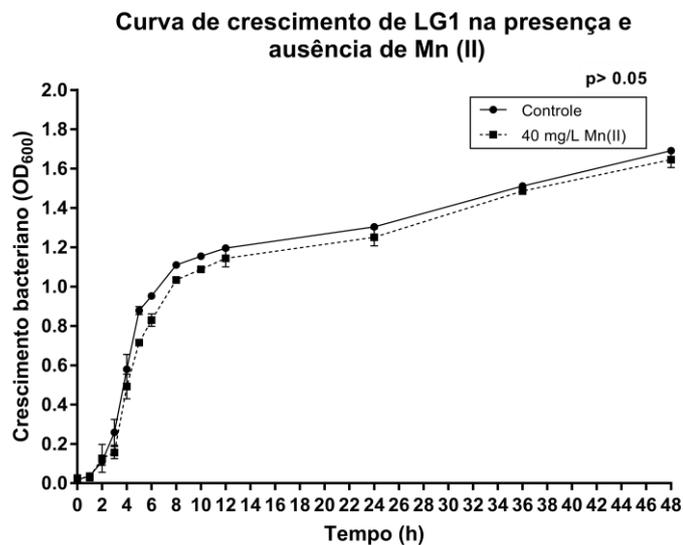
1178 **II.2.5 Análise estatística**

1179 A reprodutibilidade alcançada entre as várias separações cromatográficas foi
1180 avaliada por um teste estatístico de correlação (Spearman) realizado para cada uma das
1181 três réplicas biológicas das amostras de controle e Mn (II). As proteínas que exibiram
1182 pelo menos dois dados maxLFQ entre os triplicatas foram consideradas para análise
1183 estatística. A razão maxLFQ (Mn (II)/controle) contra todos os valores de p obtidos para
1184 as proteínas identificadas foi utilizada para produzir o gráfico vulcano para avaliar o seu
1185 padrão de regulação positiva ou negativa. Entre estes, apenas os que exibiram
1186 significância ($p \leq 0,05$) foram considerados estatisticamente diferentes comparando as
1187 amostras controle e Mn (II).

1188 II.3 Resultados

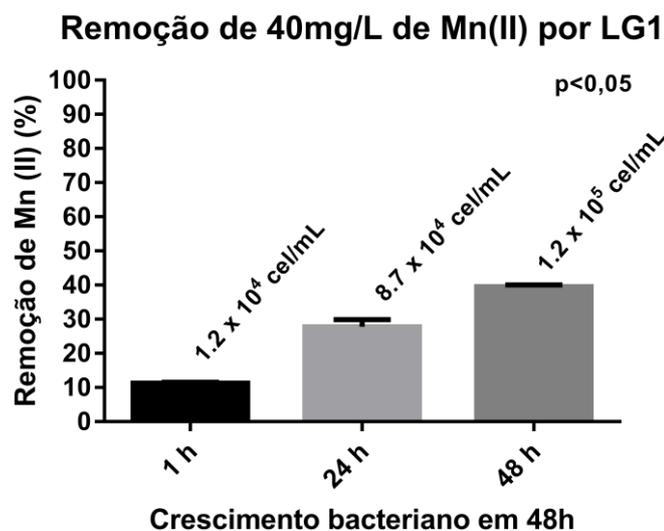
1189 II.3.1 Bio-oxidação de Mn (II) pela cepa LG1

1190 A cepa LG1 apresentou alto crescimento, tanto na presença quanto na ausência
1191 de 40 mg/L de Mn (II) e não foi encontrada diferença significativa entre as curvas de
1192 crescimento em ambas as condições ($p > 0,05$) (Figura II.1). Foi observada, uma curva
1193 típica de crescimento bacteriano. A fase lag foi observada até 2 horas, em seguida uma
1194 fase exponencial de crescimento até 8 horas, e após esse tempo a fase estacionária. A
1195 taxa de remoção de Mn (II) aumentou com o crescimento bacteriano ($p < 0,05$) (Figura
1196 II.2) e a cepa LG1 removeu 39,5% do Mn (II) presente no meio com 48 h de cultivo.
1197 Além disso, o LBB indicou a presença de espécies oxidadas de Mn.



1198

1199 **Figura II.1-** Crescimento de *S. marcescens* LG1 na ausência e presença de alta
1200 concentração de Mn (II) (40 mg/L) por 48 h. A cepa LG1 cresceu igualmente bem sob
1201 ambas as condições, demonstrando tolerância ao Mn (II).



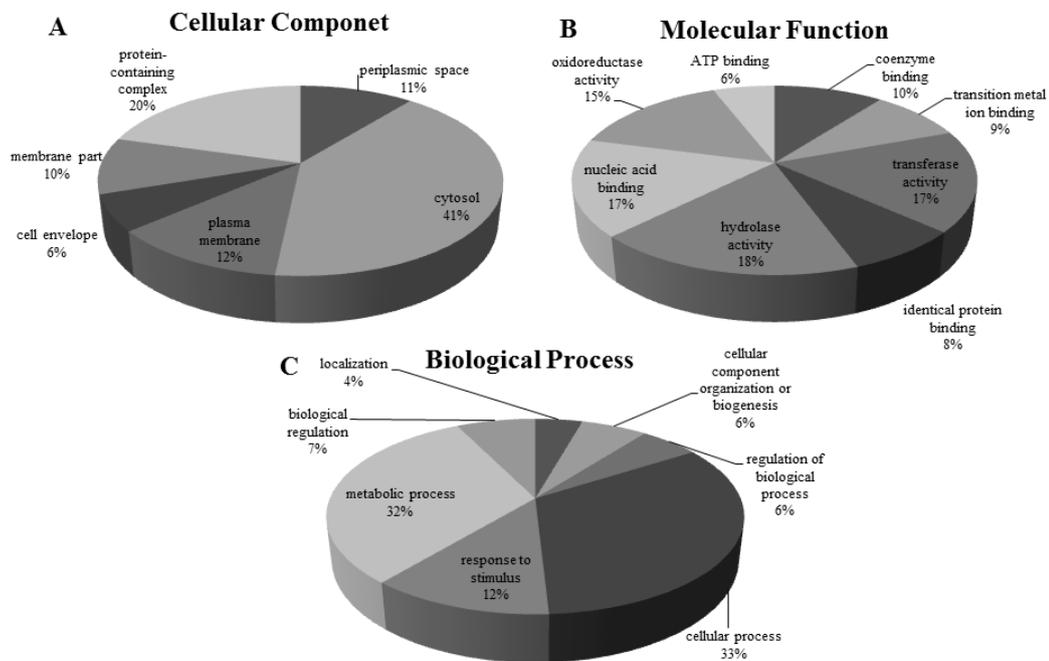
1202

1203 **Figura II.2-** Remoção de Mn (II) pela *S. marcescens* LG1 durante 48 h. À medida que
 1204 o número de células aumentou, a taxa de remoção de Mn (II) também aumentou.

1205 **II.3.2 Proteínas identificadas no proteoma total obtido na ausência e presença de**
 1206 **Mn (II): enzima MCO identificada**

1207 Um total de 1.577 proteínas foi identificado nas triplicatas biológicas da cepa
 1208 LG1 em um único experimento. Entre estes, 787 proteínas foram identificadas na
 1209 ausência de Mn (II), 52 na presença de Mn (II) e 738 em ambas as amostras. A
 1210 classificação de todas as proteínas pelo UniProtKB e Blast2GO indicou que a maioria
 1211 estava presente no citosol (41%), na forma de complexos protéicos (20%) e na
 1212 membrana plasmática (12%) de acordo com os componentes celulares (Figura II.3A).
 1213 As principais funções moleculares destas proteínas foram as seguintes: atividade de
 1214 hidrolase (18%), atividade de transferase (17%) e ligação de ácido nucléico (17%)
 1215 (Figura II.3B). Em relação aos processos biológicos, a maioria das proteínas estava
 1216 envolvida em processos celulares (33%), processos metabólicos (32%) e resposta a
 1217 estímulos (12%) (Figura II.3C). Mais especificamente, descobriu-se que as proteínas
 1218 desempenham papéis na biossíntese de carboidratos; metabolismo de carbono,
 1219 aminoácidos, ácidos graxos e proteínas ribossomais; biossíntese de nucleotídeos;
 1220 transcrição; tradução; divisão celular; replicação de DNA; síntese de vitaminas; fatores
 1221 de virulência e atividade oxidoreductase.

1222 Para ambas as condições analisadas, ausência e presença de Mn (II), foram
 1223 identificadas proteínas de componentes celulares relacionadas à tolerância bacteriana a
 1224 metais pesados, como lipoproteínas do lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicanos,
 1225 glicoproteínas que fazem parte de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e outras
 1226 proteínas que possuem essa função e atividade antioxidante, como citocromos,
 1227 glutatona, glutaredoxina, tioredoxina, catalase, peroxidase e superóxido dismutase.
 1228 Além disso, a MCO também foi identificada. Essa enzima que participa dos processos
 1229 de oxidorredução foi encontrada tanto no envelope celular quanto no espaço
 1230 periplasmático. De acordo com os dados do Blastp, a MCO foi confirmada com 100%
 1231 de identidade com a MCO CueO, cujo papel em processos de remoção de Mn (II) foi
 1232 previamente relatado (Su et al., 2014).



1233

1234 **Figura II.3-** Categorização das proteínas totais de *S. marcescens* LG1 pelo Blast2GO
 1235 em componente celular (A), função molecular (B) e processo biológico (C).

1236 II.3.3 Proteínas diferencialmente expressas em ambos os grupos

1237 Os resultados mostraram que 182 proteínas foram diferencialmente expressas,
 1238 sendo 176 mais abundantes na ausência de Mn (II) e seis proteínas mais abundantes na
 1239 presença de Mn (II) (Figura II.4). Na ausência de Mn (II), proteínas relacionadas ao
 1240 metabolismo de carboidratos (malato desidrogenase), carbono (transcetolase),

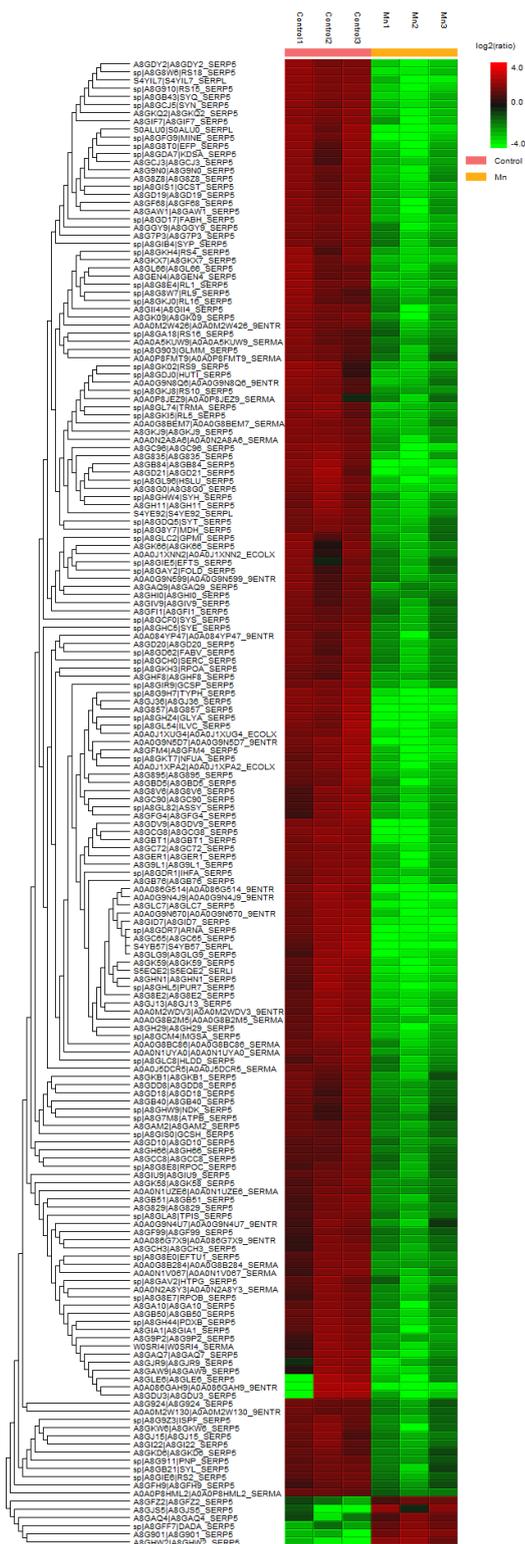
1241 aminoácidos e nucleotídeos (serina-RNAt ligase), ácidos graxos (3-oxoacil- [proteína
 1242 transportadora-acil] sintase III), síntese de vitaminas (biossíntese de riboflavina) foram
 1243 identificadas; além disso, proteínas envolvidas na transcrição (RNA polimerase dirigida
 1244 por DNA), tradução (fator de alongamento), motilidade celular (flagelina), adesão
 1245 (montagem de pili), divisão celular (fator de especificidade topológica da divisão
 1246 celular) e proteínas ribossomais (proteína ribossômica 30/50S) foram identificadas.

1247 Em geral, as proteínas identificadas na presença de Mn (II) foram relacionadas a
 1248 processos envolvendo a membrana plasmática. A proteína de membrana externa BamB,
 1249 a FtsH zinco metaloprotease dependente de ATP, D-aminoácido desidrogenase,
 1250 ubiquinol oxidase subunidade II, di-hidroxiacetona quinase e proteína bifuncional PutA
 1251 foram mais expressas sob essa condição (Tabela II.1).

1252 **Tabela II.1** - Proteínas identificadas como upreguladas na presença de Mn (II) e
 1253 informações sobre acesso do Uniprot, nome da proteína, gene, função, localização
 1254 subcelular e massa (Da).

Acesso UniProt	Nome da proteína	Gene	Função	Localização subcelular	Massa (Da)
A8GHW2_ SERP5 m	BamB -Fator de montagem de proteína de membrana externa	bamB	Parte do complexo de montagem de proteína da membrana externa	Membrana celular externa	42113
A8G901_ SERP5	FtsH- zinco metaloprotease dependente de ATP	ftsH	Desempenha um papel no controle de qualidade de proteínas integrais de membrana	Membrana celular interna	70508
DADA_ SERP5	D-aminoácido desidrogenase	dadA	Desaminação oxidativa de D-aminoácidos.	-	47212
A8GAQ4_ SERP5 m	Ubiquinol oxidase, subunidade 2	Spro_ 1090	Ligação de íon de cobre Atividade citocromo-c oxidase	Membrana celular	34933
A8GJS5_ SERP5	Di-hidroxiacetona-quinase, subunidade L	Spro_ 4271	Atividade de glicerona quinase	-	22825
A8GFZ2_ SERP5	Proteína bifuncional PutA	Spro_ 2931	Oxida prolina a glutamato para uso como fonte de carbono e nitrogênio	-	144402

1255



1256

1257 **Figura II.4-** Heat map das proteínas de *S. marcescens* LG1 upreguladas e
 1258 downreguladas na ausência (controle) e presença de Mn (II). Vermelho indica maior
 1259 expressão e verde menor expressão das proteínas.

1260 **II.4. Discussão**

1261 Neste estudo, mostramos pela primeira vez o proteoma total de uma cepa de *S.*
1262 *marcescens* oxidante de Mn (II), a cepa LG1, em duas condições diferentes: a ausência
1263 e a presença de íons Mn (II). A sua análise permitiu uma melhor compreensão
1264 fisiológica da tolerância e oxidação do Mn pela cepa LG1 dessa espécie. Espécies de
1265 *Serratia* isoladas de diferentes ambientes apresentam a capacidade de remover metais
1266 pesados e elementos radioativos, tanto por vias enzimáticas quanto por mecanismos
1267 indiretos, como a biossorção (Kannan e Ramteke, 2002; Cruz-Veja et al., 2008; Zhang e
1268 Li, 2011; Andrezza et al., 2012; Cristani et al., 2012; Zakeri et al., 2012; Barboza et al.,
1269 2017b, Queiroz et al., 2018). Como esperado, a cepa LG1 resistente a Mn (II)
1270 apresentou uma boa taxa de remoção de Mn (II), mesmo durante o curto período de
1271 crescimento observado, e foi capaz de produzir espécies oxidadas de Mn, confirmando
1272 seu potencial de bio-oxidação desse metal. Poucos estudos realizaram análises dos
1273 proteomas dessas espécies para elucidar os mecanismos moleculares relacionados à
1274 resistência e remoção de contaminantes tóxicos. Apenas Zakeri et al. (2012) fizeram
1275 uma análise comparativa do proteoma de uma cepa de *S. marcescens* biossorvente de
1276 rádio em resposta ao estresse radioativo. Os autores usaram eletroforese bidimensional
1277 em gel de poliacrilamida e espectrometria de massa para identificar as proteínas
1278 envolvidas.

1279 Em geral, as proteínas identificadas na ausência e presença de Mn (II) foram
1280 proteínas estruturais e enzimas relacionadas aos principais processos celulares e
1281 metabólicos necessários para o crescimento e sobrevivência de bactérias gram-
1282 negativas. A maioria dessas proteínas foi identificada principalmente na ausência de Mn
1283 (II) e entre ambas as condições analisadas; isto mostra que a presença de altas
1284 concentrações de Mn (II) causou pouca interferência no conjunto de proteínas expressas
1285 e demonstra a adaptabilidade intrínseca da cepa LG1 ao Mn, uma vez que cresceu
1286 igualmente bem na ausência e presença de Mn (II). Proteínas de estruturas bacterianas
1287 relacionadas à tolerância a metais pesados tais como EPS, LPS e peptidoglicanos
1288 (Beveridge e Murray, 1976; Macaskie et al., 2000; Teitzel e Parsek, 2003; Pereira et al.,
1289 2011)., foram identificadas nesse estudo e podem ter contribuído para a sua boa
1290 adaptabilidade. *S. marcescens* produz EPS que, além de conter carboidratos,

1291 compreende grandes quantidades de enzimas e proteínas estruturais, como as
1292 glicoproteínas (Sheng et al., 2008; More et al., 2014). Estas enzimas e proteínas mantêm
1293 a integridade estrutural e estabilidade da célula para sinalização e comunicação
1294 intercelular (Hug e Feldman, 2011). O LPS, que é composto de lipídios e
1295 polissacarídeos, e que pode conter lipoproteínas associadas, permite que bactérias gram-
1296 negativas resistam a altos níveis de metais em seu ambiente (Macaskie et al., 2000).
1297 Também foram identificadas proteínas, como citocromos solúveis, glutathione,
1298 glutaredoxina e sistemas de tiorredoxina envolvidas no combate ao estresse oxidativo
1299 que pode ser promovido pela presença de metais. Essas proteínas são importantes
1300 antioxidantes e determinantes na tolerância a alguns metais pesados para algumas
1301 bactérias (Lovley e Widman, 1993; Helbig et al., 2008; Harrison et al., 2009; Liu et al.,
1302 2014). Learman e Hansel (2014), ao analisarem o proteoma de bactérias do clado
1303 *Roseobacter* na ausência e presença de Mn (II), também encontraram essas proteínas
1304 com atividade antioxidante e outras, como a superóxido dismutase, redutases, catalases
1305 e peroxidases também identificadas no presente estudo, e que não foram upreguladas na
1306 presença de Mn (II). Esses dados indicam que independente da presença desse metal, as
1307 proteínas antioxidantes tem um papel importante para a sobrevivência dessas espécies.

1308 A identificação da enzima MCO CueO em ambas condições analisadas pode ser
1309 relacionada ao potencial oxidativo apresentado pela cepa LG1 na remoção do Mn (II). A
1310 principal via para a oxidação bacteriana de Mn (II) é enzimática e geralmente, uma
1311 enzima do tipo MCO é necessária para oxidar o Mn (II) (Brouwers et al., 2000). CueO é
1312 um MCO periplasmático que está associado ao sistema de efluxo de cobre (Grass et al.,
1313 2001). Sua capacidade de oxidar o Mn (II) e produzir óxidos de Mn foi demonstrada por
1314 Su et al. (2014), que clonaram o gene dessa enzima a partir de *Escherichia coli* e
1315 examinaram a atividade oxidativa de Mn (II) com CueO purificado (in vitro) e uma cepa
1316 recombinante (in vivo). Virtualmente toda MCO consiste em três domínios de
1317 cupredoxina (Brouwers et al., 2000), e baseado na sequência similar da MCO CueO
1318 disponível no NCBI, esta enzima também possui estes domínios. A presença de uma
1319 MCO corroborou com nosso estudo anterior, que mostrou a produção de óxido de Mn
1320 por cepas de LG1 e espécies oxidadas de Mn dentro de células LG1 por análise de
1321 espectroscopia de perda de energia eletrônica (EELS) (Queiroz et al., 2018). Além

1322 disso, também provamos a produção de óxido de Mn pela cepa LG1, pois observamos
1323 uma reação redox entre os óxidos de Mn e o reagente de LBB, evidenciada pelo
1324 desenvolvimento da cor azul no meio de reação. Os óxidos de Mn estão entre os
1325 absorventes mais fortes e possuem alto poder oxidativo em sistemas ambientais
1326 (Geszvain et al., 2012).

1327 As proteínas upreguladas na ausência de Mn (II) incluíram proteínas estruturais
1328 e enzimas importantes para o crescimento e sobrevivência das bactérias. Somente seis
1329 proteínas foram mais expressas na presença do Mn (II), a maioria relacionada com a
1330 membrana celular. O pequeno número de proteínas diferencialmente expressas nessa
1331 condição pode ser atribuído à boa tolerância a altos níveis de Mn (II) apresentadas por
1332 LG1 (Queiroz et al., 2018). A alta concentração de Mn (II) pode ter resultado na
1333 redução de algumas atividades celulares e induziu a expressão de proteínas
1334 essencialmente envolvidas na sobrevivência celular sob condições de estresse e
1335 relacionadas à maior barreira celular, a membrana. Segundo Bruins et al. (2000), as
1336 bactérias resistem à altos níveis de metais, modificando suas propriedades de superfície
1337 celular. Devido a sua capacidade de se associar com metais, assumiu-se que a
1338 membrana é o local mais afetado pela toxicidade do metal (Lemire et al., 2013). Nossas
1339 análises identificaram algumas proteínas relacionadas à membrana que podem ter tido
1340 importantes papéis na tolerância ao metal, como as proteínas BamB da membrana
1341 externa, FtsH zinco metaloprotease e a D-aminoácido desidrogenase (DAD). A proteína
1342 BamB é uma importante lipoproteína do mecanismo de montagem da membrana
1343 externa β -barrel (OMPs) envolvida na manutenção da membrana (Misra et al., 2015;
1344 Namdari et al., 2012). Vários estudos demonstraram a indução da proteína de membrana
1345 externa em *Pseudomonas aeruginosa* sob diferentes condições de estresse (Said et al.,
1346 1987). A proteína de membrana FtsH é necessária para a degradação de subunidades de
1347 complexos proteicos que não estão adequadamente associados, assim contribui para o
1348 controle de qualidade das proteínas de membrana e para o crescimento celular (Herman
1349 et al., 1993; Akiyama et al., 1996). A enzima DAD também identificada catalisa reações
1350 de desidrogenação que produzem prótons e elétrons que são transferidos para os
1351 citocromos da cadeia respiratória (Franklin et al., 1976; Tanigawa et al., 2010). As
1352 enzimas na cadeia de transporte de elétrons podem oxidar ou reduzir metais, um

1353 processo que pode levar à formação de minerais no periplasma ou no citoplasma
1354 (Taylor et al., 1988). Desde que foi encontrado que essas proteínas mais expressas na
1355 presença de Mn (II) têm um papel na manutenção da integridade da membrana celular,
1356 sugerimos que a alta tolerância ao Mn (II) da cepa LG1 é devida à regulação positiva
1357 dessas proteínas.

1358 Neste estudo, a abordagem shotgun permitir elucidar o primeiro proteoma total
1359 da cepa *S. marcescens* LG1 oxidante de Mn (II), tanto na ausência quanto na presença
1360 de Mn (II). A identificação das proteínas envolvidas forneceu novos insights sobre os
1361 prováveis mecanismos moleculares relacionados à tolerância, remoção e proteção contra
1362 os efeitos tóxicos do excesso de Mn (II) na cepa LG1. Os achados reiteram o grande
1363 potencial dessa cepa na biorremediação de ambientes contaminados com Mn (II).

1364

1365 **II.5 Conclusão**

1366 A identificação das proteínas encontradas no presente trabalho fornece uma
1367 melhor compreensão fisiológica das inter-relações entre as bactérias e o Mn (II) e
1368 confirma a presença da enzima multicobre oxidase associada à remoção de Mn (II) na
1369 cepa *S. marcescens* LG1. Os presentes achados destacam o valor biotecnológico desta
1370 espécie; além disso, a lista de proteínas expressas identificadas pela análise proteômica
1371 pode ser usada como uma ferramenta em experimentos futuros para validar esses
1372 achados.

1373

1374 **CAPÍTULO III: Caracterização da prodigiosina produzida pela cepa**
1375 **LG1 e o impacto da concentração do Mn (II) na sua produção**

1376

1377 Neste capítulo, o pigmento prodigiosina produzido pela cepa *Serratia marcescens* LG1
1378 oxidante de Mn (II) foi analisado. A prodigiosina é um pigmento vermelho produzido
1379 por pouquíssimas espécies bacterianas, como alguns grupos de *S. marcescens*, e que
1380 apresenta importância médico e industrial. Ele é considerado um mecanismo protetor
1381 em condições desfavoráveis e pode ser influenciado por diversos fatores ambientais e
1382 condições de estresse. Para analisar como a presença de altas concentrações de Mn (II)
1383 pode atuar na biossíntese desse sensível pigmento, o presente estudo teve como objetivo
1384 caracterizar a prodigiosina produzida pela cepa *S. marcescens* LG1 tolerante e oxidante
1385 de Mn e analisar a influência de concentrações elevadas desse metal [0, 50, 100 mg/L
1386 de Mn (II)] na produção do pigmento. Foi possível observar a influência de altas
1387 concentrações de Mn (II) na produção da prodigiosina que apresentou um maior volume
1388 na concentração de 50 mg/L de Mn (II) e não deixou de ser produzido em concentrações
1389 maiores. Esse resultado demonstra o efeito protetor da prodigiosina para a célula e
1390 também ressalta a aplicabilidade da *S. marcescens* LG1 que consegue crescer e tolerar
1391 altas concentrações de Mn (II). Os resultados encontrados servirão para contribuir com
1392 o estudo desse promissor pigmento, entretanto são necessários mais experimentos para
1393 observar a relação direta da prodigiosina com a remoção de Mn (II), uma vez que foi
1394 relacionada com a absorção desse metal.

1395

1396

1397

1398 **III.1 Introdução**

1399

1400 A prodigiosina é um pigmento vermelho também conhecido como 2-metil-3-
1401 pentil-6-metoxiprodinginina que pertence a uma classe de pigmentos naturais que
1402 apresentam em comum uma estrutura química única de tripirrole (Araújo et al.,2010). A
1403 sua estrutura tripirrole linear foi elucidada pela primeira vez na década de 1960
1404 (Wasserman e McKeon, 1960) e foi considerado um metabólito secundário clássico
1405 devido à sua cor visível e à natureza geneticamente sensível de algumas cepas
1406 produtoras das espécies *Serratia* e *Streptomyces* (Williamson et al. 2006).

1407 Esse pigmento foi primeiramente descoberto na *Serratia marcescens*, uma
1408 bactéria facultativa, gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae (Grimont e
1409 Grimont, 2006). Posteriormente foi caracterizado em outras espécies e subgrupos de
1410 *Serratia* e em algumas espécies bacterianas do gênero *Pseudomonas* e *Streptomyces*. A
1411 função fisiológica da prodigiosina nos organismos produtores ainda é pouco discutida,
1412 mas é sabido que a sua presença pode conferir uma vantagem ecológica (Williamson et
1413 al. 2006; Haddix e Shanks, 2018). Haddix e Shanks, (2018) verificaram que as células
1414 pigmentadas de *S. marcescens* acumulam ATP mais rapidamente e crescem duas vezes
1415 mais que as células não pigmentadas. A maioria dos estudos realizados tem focado no
1416 potencial antibacteriano, antifúngico, antiprotozoário e nas importantes atividades
1417 imunossupressoras e anticancerígenas da prodigiosina (Li et al., 2015). A sua possível
1418 participação na absorção de metais pesados e elementos radioativos também foi
1419 sugerida em alguns trabalhos de biorremediação (Kannan e Ramteke, 2002; Zakeri et
1420 al., 2010; Cristani et al., 2012; Queiroz et al., 2018).

1421 Fatores ambientais e fatores nutricionais que incluem a temperatura,
1422 concentração de oxigênio, pH, luz, variações na fonte de carbono e nitrogênio, a
1423 disponibilidade de fosfato inorgânico, sal, e vários cátions e ânions são conhecidos por
1424 interferir na produção de prodigiosina (Williams e Quadri, 1980; Bennett e Bentley,
1425 2000). Segundo Williamson et al. (2006), a sua síntese também é influenciada pela fase
1426 de crescimento, com expressão máxima ocorrendo sob condições de privação de
1427 nutrientes ou estresse. Entretanto, Cristani et al. (2012) ao monitorar a biossíntese de
1428 prodigiosina de uma cepa de *S. marcescens* biosorvente de metais pesados em

1429 condições sub-inibitórias de chumbo, cádmio e crômio, observou que a sua produção
1430 era drasticamente reduzida quando as concentrações desses metais eram elevadas
1431 devido a morte da bactéria que não conseguia sobreviver nessas condições.

1432 Um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou a *S. marcescens*
1433 LG1 pigmentada, como uma potencial ferramenta na biorremediação de águas
1434 contaminadas com Mn (II) (Queiroz et al, 2018). Eles observaram que essa cepa
1435 apresentou um melhor crescimento e remoção de Mn (II) quando comparada com uma
1436 cepa não pigmentada dessa espécie, e atribuiu essa melhor habilidade a presença da
1437 prodigiosina. Entretanto não se sabe como a presença de altas concentrações desse
1438 metal pode atuar na biossíntese desse sensível pigmento. Nesse sentido, o presente
1439 estudo teve como objetivo caracterizar a prodigiosina produzida pela cepa *S.*
1440 *marcescens* LG1 tolerante e oxidante de Mn e analisar a influência de concentrações
1441 elevadas desse metal na produção do pigmento.

1442

1443 **III.2 Materiais e Métodos**

1444 **III.2.1 *Serratia marcescens* LG1 e extração da prodigiosina**

1445 A cepa pigmentada *S. marcescens* LG1 foi isolada de uma água coletada em um
1446 lago contaminado em Ouro Preto, Minas Gerais, e foi identificada como *S. marcescens*
1447 (99% de similaridade) por sequenciamento da região 16S do rDNA em estudo anterior
1448 (Queiroz et al., 2018). Para realizar a extração do seu pigmento, 1 mL da cultura
1449 preservada de LG1 foi cultivada em 9 mL de meio NB (10 g/L de peptona, 3 g/L de
1450 extrato de levedura, 5 g/L NaCl, pH 7,0) sob agitação constante a 150 rpm a 30 °C
1451 overnight. Em seguida 25 µL dessa pré-cultura foi inoculada no meio NB sólido (10 g/L
1452 de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L NaCl, 15g/L de Ágar, pH 7,0) e
1453 incubadas durante 72 h a 28 ± 2 °C. As colônias crescidas foram transferidas para tubos
1454 falcons estéreis e seu pigmento foi extraído com etanol acidificado (HCL 4%) como
1455 sugerido por Kimyon et al., (2006). Os restos celulares foram removidos por
1456 centrifugação, o sobrenadante foi seco no rotavapor na temperatura de 45-50° C e o
1457 pigmento foi dissolvido em metanol grau HPLC (figura III.1).



1458

1459 **Figura III.1-** Procedimento de extração do pigmento prodigiosina.

1460 **III.2.2 Quantificação e caracterização do pigmento por LC-MS/MS**

1461 Uma parte do pigmento extraído foi quantificada de acordo com Goldschmidt e
 1462 Williams (1968) a partir de valores de absorbância da prodigiosina extraída. O valor da
 1463 absorbância foi determinado em dois comprimentos de onda diferentes, 534 nm (pico de
 1464 absorção da prodigiosina) e 655 nm (correção da interferência de outras substâncias na
 1465 amostra) e depois calculado na seguinte formula:

$$1466 \quad \mu\text{g prodigiosina/mL} = (\text{Abs}_{534} - \text{Abs}_{655}) \times 19,3 \text{ (fator diferencial)}$$

1467 O outro restante do pigmento foi inserido em vial de vidro novo de 1.5 mL com
 1468 septo para ser analisado no LC-MS/MS. As fases móveis utilizadas foram água milli-Q
 1469 grau HPLC acidificada com 0.1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol grau HPLC
 1470 acidificado com 0.01% de ácido fórmico (solvente B).

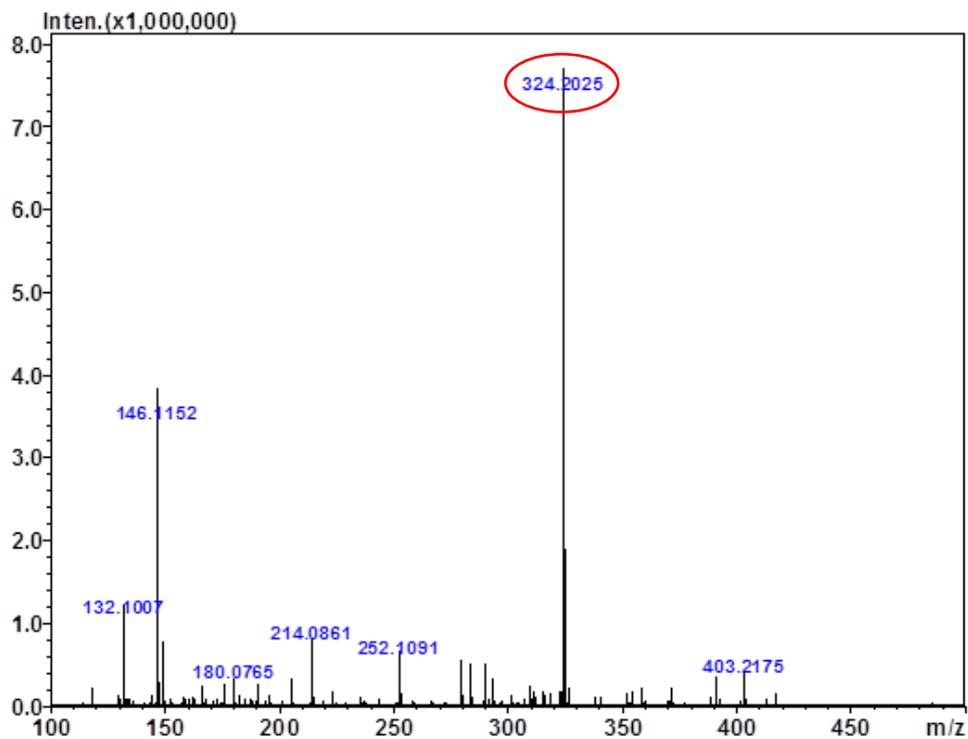
1471 **III.2.3 Avaliação da influência do Mn (II) na produção de prodigiosina**

1472 Para analisar a relação prodigiosina com o Mn (II) e observar como altas
 1473 concentrações desse metal interferem na produção desse pigmento, a cultura LG1 foi
 1474 crescida em placas de petri contendo o meio NB sólido acrescido das concentrações 0,
 1475 50 e 100 mg/L de Mn (II) e incubadas na mesma condição anterior. Um controle
 1476 positivo foi feito utilizando o metal pesado chumbo (Pb) nas mesmas concentrações
 1477 anteriores e na concentração sub inibitória de 0,025 mg/L conforme Cristani et al.
 1478 (2012). O pigmento também foi extraído e dosado da mesma forma citada
 1479 anteriormente.

1480 **III.3 Resultados e Discussões**

1481 **III.3.1 Caracterização da prodigiosina**

1482 O pigmento extraído apresentou concentração de 348,9 µ/mL. A partir dos picos
1483 gerados no espectro MS1 e no MS2 foi possível identificar a prodigiosina que possui
1484 fórmula molecular: C₂₀H₂₅N₃O e peso molecular igual 323.44 (Araújo et al.,2010). O
1485 espectro MS1 apresentou um pico de valor 324.2 (figura III.2) e o espectro ms2
1486 apresentou os picos com valores de 309 e também 252 (figura III.3) que correspondem à
1487 fragmentação da prodigiosina (Chen et al., 2008- Figura III.4).



1488

1489 **Figura III.2-** Espectro de massas MS1 da prodigiosina da cepa *Serratia marcescens*
1490 LG1 (aquisição de m/z de 100.0000a 500.0000).

1491

1492

1493

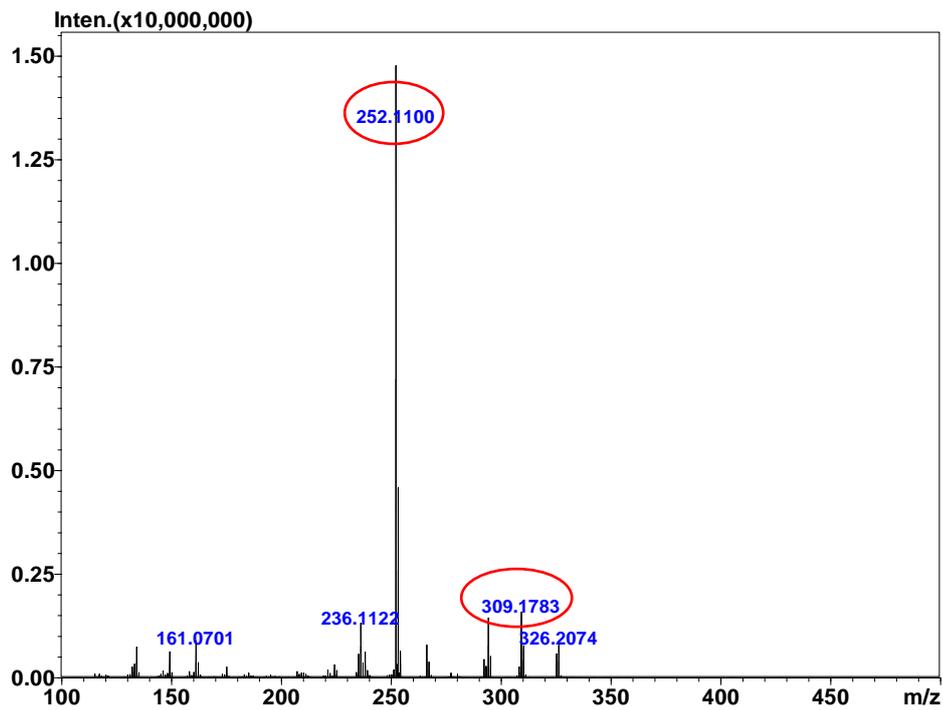
1494

1495

1496

1497

1498



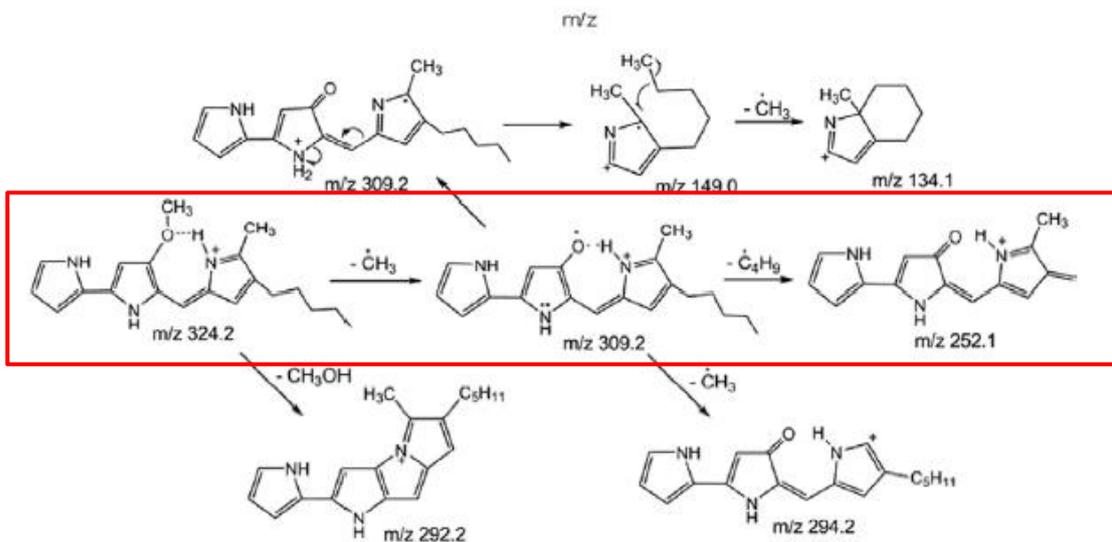
1499

1500

1501 **Figura III.3-** Espectro de massas MS2 da prodigiosina da cepa *Serratia marcescens*

1502 LG1 (aquisição de m/z de 100.0000a 500.0000, precursor m/z: 324.2070 ± 3.0000 Da).

1503



1504

1505 **Figura III.4-** Principais vias de fragmentação da prodigiosina e seus valores m/z. MS1

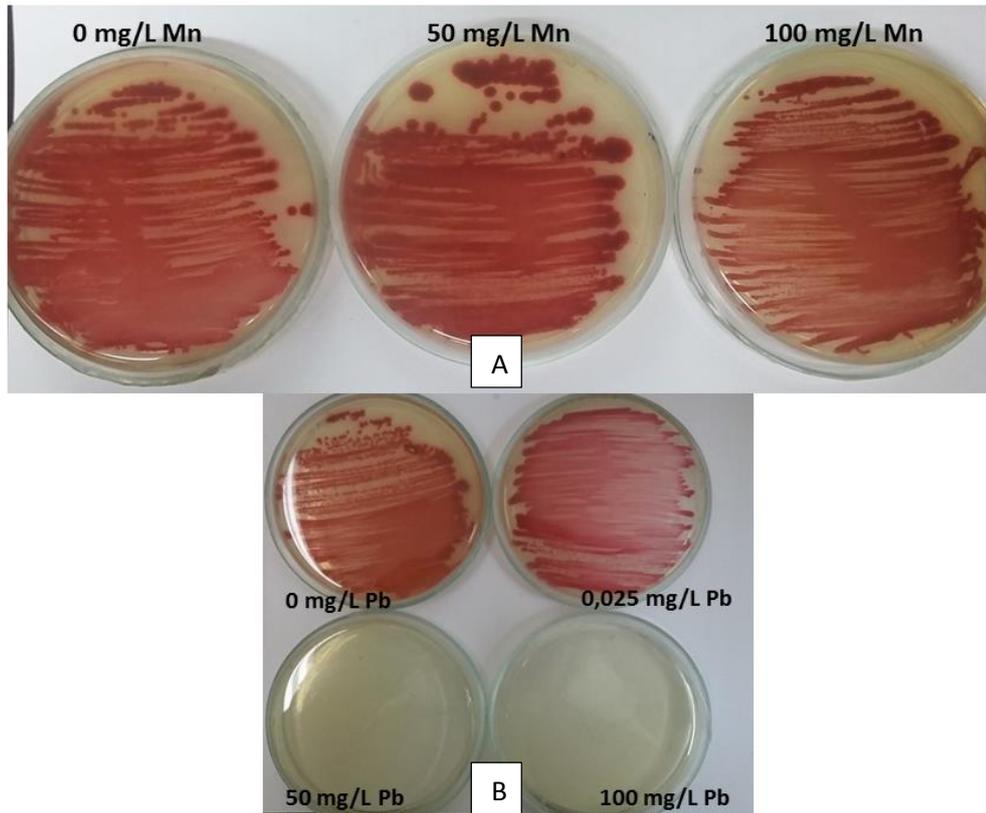
1506 324; MS2 309 e MS3 149. (Fonte: Chen et al., 2008)

1507

1508

1509 **III.3.2 Avaliação da influência do Mn (II) na produção de prodigiosina**

1510 A cepa LG1 conseguiu crescer em todas as concentrações de Mn (II) testada,
1511 entretanto no controle positivo com Pb conseguiu crescer apenas nas concentrações 0 e
1512 0,025 mg/L, evidenciando alta toxicidade desse metal para a bactéria mesmo em
1513 concentrações mínimas (Figura III.5).



1514

1515 **Figura III.5-** Crescimento da *Serratia marcescens* LG1 em placas contendo Mn (II) e
1516 Pb. **A:** LG1 nas concentrações 0, 50 e 100 mg/L de Mn (II); **B:** LG1 nas concentrações
1517 0; 0,025; 50 e 100 mg/L de Pb.

1518

1519 Uma maior concentração da prodigiosina foi encontrada na amostra com 50
1520 mg/L de Mn(II) (650 $\mu\text{g/L}$) e em seguida na amostra com 100 mg/L de Mn(II) (565
1521 $\mu\text{g/L}$). A menor quantidade do pigmento encontrado na amostra sem metal pesado (310
1522 $\mu\text{g/L}$) não diferiu significativamente da quantidade encontrada no controle positivo com
1523 o chumbo (295 $\mu\text{g/L}$) (Figura III.6).

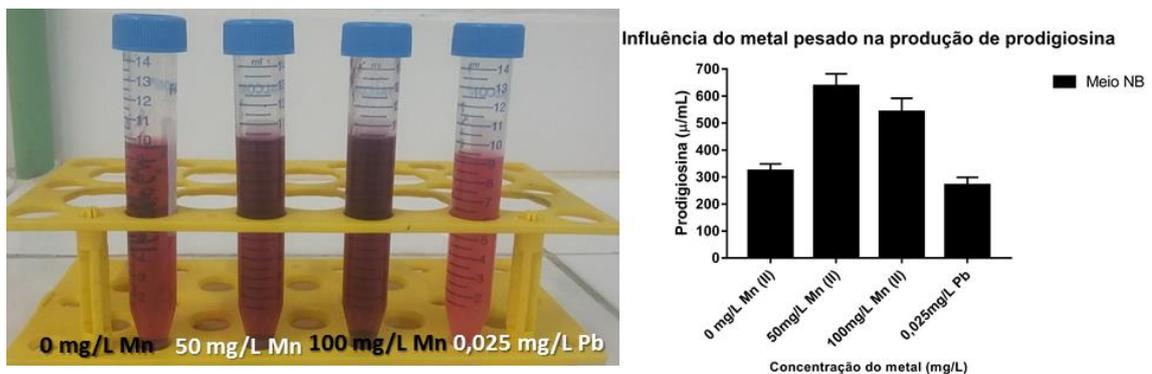
1524

1525 Segundo Hejazi e Falkiner, (1997), esse pigmento é considerado parte de um
mecanismo de proteção para o crescimento bacteriano sob condições desfavoráveis,

1526 sendo observada uma expressão máxima da prodigiosina em condições de estresse
1527 (Williamson et al. 2006). A presença do Mn (II) em até certa concentração, como 50
1528 mg/L, provocou um aumento da produção de prodigiosina que serviu para proteger a
1529 célula da citotoxicidade do metal. Entretanto, quando a concentração do Mn (II) elevou
1530 mais, a sua toxicidade aumentou também, o que pode ter afetado a célula da cepa LG1 e
1531 a via de biossíntese desse pigmento que foi produzido em uma quantidade um pouco
1532 menor. Em um trabalho anterior com essa cepa, a LG1 apresentou um crescimento
1533 constante em um meio sólido contendo concentrações crescentes de Mn (II) (0 a 1200
1534 mg/L), entretanto foi possível observar reduções nos tamanhos das colônias, alterações
1535 em sua morfologia e diminuição da cor do pigmento nos meios com concentrações igual
1536 e acima de 50 mg/L (Queiroz et al., 2018). Apesar dessas alterações é possível que o
1537 excesso de Mn (II) não foi letal para a célula que continuou produzindo a prodigiosina,
1538 e a protegeu dos efeitos tóxicos do metal.

1539 A cepa LG1 não conseguiu crescer nas concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L
1540 de Pb evidenciando a alta toxicidade desse metal quando comparado ao Mn (II).
1541 Cristani et al., (2012) também atribuíram o aumento da concentração de metais, como
1542 Pb, cádmio e cromo, com o aumento da toxicidade desses metais, causando a redução
1543 do pigmento.

1544



1545

1546 **Figura III.6-** Influência das concentrações 0, 50 e 100 mg/L de Mn (II) e 0,025 mg/L
1547 de Pb na produção de prodigiosina.

1548

1549 III.4 Conclusão

1550 As bactérias sintetizam a prodigiosina apenas quando as condições são
1551 apropriadas, sendo assim considerado um metabólito secundário bem sensível às

1552 condições do meio ambiente. Foi possível observar a influência de altas concentrações
1553 de Mn (II) na produção do pigmento que apresentou uma maior quantidade na
1554 concentração de 50 mg/L de Mn (II) e não deixou de ser produzido em concentrações
1555 maiores. Esse resultado demonstra o efeito protetor da prodigiosina para a célula e
1556 também ressalta a aplicabilidade da *S. marcescens* LG1 que consegue crescer e tolerar
1557 altas concentrações de Mn (II). Os resultados encontrados servirão para contribuir com
1558 o estudo desse promissor pigmento, entretanto são necessários experimentos
1559 aprofundados para observar a relação direta da prodigiosina com a remoção de Mn (II),
1560 uma vez que foi relacionada com a absorção de metais.

1561

1562 **8. Conclusão geral**

1563 Como a busca por estratégias eficientes e ambientalmente adequadas para a
1564 remoção de metais pesados tem sido incentivada, neste trabalho reforçamos ainda mais
1565 a aplicabilidade de cepas pigmentadas e não pigmentadas de *S. marcescens* em
1566 processos de biorremediação de Mn em ambientes aquáticos. Estas cepas exibem alta
1567 tolerância ao Mn (II), capacidade de crescer e remover altas concentrações de Mn (II)
1568 em diferentes condições nutricionais e de produzir óxidos de Mn que possui valor
1569 econômico agregado, especialmente a cepa pigmentada LG1. O meio NB rico em
1570 nutrientes desempenhou papéis importantes na formação do óxido Mn e na remoção do
1571 Mn (II), sendo a primeira vez que o potencial deste meio foi demonstrado em
1572 experimentos envolvendo o Mn.

1573 Nesse trabalho também ficou evidente o grande potencial da cepa pigmentada
1574 LG1 na bio-oxidação de Mn (II), por isso teve seu proteoma analisado. O estudo das
1575 suas proteínas expressas na ausência e presença desse metal permitiu conhecer não
1576 somente seu proteoma, mas também compreender a partir da identificação das
1577 proteínas, como essa bactéria responde em situação de estresse ao Mn (II). A enzima
1578 multicobre oxidase que participa de processos de oxidação de Mn (II) foi identificada
1579 no seu proteoma, evidenciando a possível participação dessa enzima nesse processo.

1580 Além disso, o estudo do pigmento prodigiosina na presença de diferentes
1581 concentrações de Mn (II) permitiu observar que apesar da sua sensibilidade a condições
1582 externas, a prodigiosina continuou sendo produzida em altas concentrações de Mn (II).
1583 Assim, manteve seu efeito protetor para a célula da cepa LG1 e também ressaltou a
1584 tolerância dessa cepa ao Mn (II) evidenciada em um trabalho anterior. Vale lembrar que
1585 o meio NB é ideal para a formação da prodigiosina, que tem sido associada à remoção
1586 de metais e contaminantes tóxicos. Provavelmente, esse pigmento pode ter
1587 influenciado no melhor desempenho da cepa LG1, porém são necessários mais estudos
1588 que evidencie diretamente a relação da prodigiosina com o Mn (II).

1589

1590

1591 **9. Contribuição ao conhecimento**

1592 Todos esses achados realçam a aplicação biotecnológica desta espécie. Dentre os
1593 estudos presentes na literatura com bactérias oxidantes de Mn (II), o nosso grupo foi o
1594 primeiro que demonstrou o potencial de cepas de *S. marcescens* em tolerar e remover
1595 concentrações elevadas de Mn (II) que ainda não tinham sido avaliadas. Devido todo
1596 potencial apresentado, em especial pela cepa pigmentada LG1, sugerimos a sua
1597 utilização juntamente com o meio de cultura NB em grandes biorreatores contínuos para
1598 o tratamento de efluentes contaminados com Mn para avaliar se o processo continuaria
1599 tão eficiente quanto em batelada.

1600 Estudos desse tipo tornam-se extremamente importantes especialmente pelo
1601 contexto atual do Brasil, o qual tem vivenciado infelizes episódios de ‘acidentes’ com
1602 barragens de rejeitos que causaram prejuízos humanos e ambientais. Além da perda
1603 humana, solos, vegetações, animais e bacias de rios próximos foram cobertos pelos
1604 rejeitos danificando a qualidade da água e matando a biota. A barragem do fundão que
1605 rompeu em 2015 liberou mais de 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos para o
1606 interior do estuário do rio Doce. Uma rede independente de cientistas analisou amostras
1607 do rio Doce após o colapso da barragem e encontraram elevada concentração de ferro,
1608 arsênio, chumbo, cádmio, cromo, níquel, selênio e manganês, todos acima dos níveis
1609 obrigatórios (Escobar 2015, GIAIA 2016). O aumento das concentrações de vestígios de
1610 metais nos sedimentos estuarinos levanta novas preocupações sobre os impactos
1611 crônicos dos rejeitos de minas na saúde geral do ecossistema, com impactos potenciais
1612 na biogeoquímica.

1613 Nesse sentido, a busca por microrganismos que sejam eficientes na remoção
1614 desses contaminantes, é fundamental para abrir novas perspectivas com vistas aos
1615 processos de recuperação de ambientes. O advento da biotecnologia, seleção de genes,
1616 introdução de novos genes em microrganismos e seleção de plantas remediadoras pode
1617 ser uma estratégia eficaz nas etapas necessárias ao planejamento e inserção destes
1618 organismos como ferramenta.

1619

1620 **10. Referências Bibliográficas**

1621

1622 Aiyar, A. (2000). The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence
1623 alignment. *Methods Mol. Biol.*, v. 132, p. 221–241.

1624 Akiyama, Y.; Kihara, A.; Tokuda, H. e Ito, K. (1996). FtsH (HOB) is an ATP-
1625 dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J*
1626 *Biol. Chem.*, v. 271, p. 31196-31201.

1627 Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. e Lipman, D. J. (1990). Basic local
1628 alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410.

1629 Andeer, P.F.; Learman, D.R.; McIlvin, M.; Dunn, J.A. e Hansel, C.M. (2015)
1630 Extracellular haem peroxidases mediate Mn(II) oxidation in a marine Roseobacter
1631 bacterium via superoxide production. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 3925-36.

1632 Anderson, C.R.; Johnson, H.A; Caputo, N.; Davis, R.E.; Torpey, J.W. e Tebo, B.M.
1633 (2009). Mn(II) oxidation is catalyzed by heme peroxidases in "*Aurantimonas*
1634 *manganoxydans*" strain SI85-9A1 and *Erythrobacter sp.* strain SD-21. *Applied*
1635 *Environmental Microbiology*, v. 75, n. 12, p. 4130-4138.

1636 Andreazza, R.; Okeke, B. C.; Pieniz, S.; Bortolon, L.; Lambais, M. R., e Camargo, F. A.
1637 (2012). Effects of stimulation of copper bioleaching on microbial community in
1638 vineyard soil and copper mining waste. *Biological trace element research*, v. 146, n. 1,
1639 p. 124-133.

1640 Araújo, C.de.; Helvia, W.; Fukushima, K. e Takaki, G.M.C. (2010). Prodigiosin
1641 production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost
1642 substrate. *Molecules*, p. 6931-6940.

1643 Aylward, F.O.; Tremmel, D.M.; Starrett, G.J.; Bruce, D.C.; Chain, P.; Chen, A., et al.
1644 (2013). Complete Genome of *Serratia sp.* Strain FGI 94, a Strain Associated with Leaf-
1645 Cutter Ant Fungus Gardens. *Genome Announc*, v. 1.

1646 Bharti, R. K.; Srivastava, S. e Thakur, I. S. (2014). Proteomic analysis of carbon
1647 concentrating chemolithotrophic bacteria *Serratia sp.* for sequestration of carbon
1648 dioxide. *Plos One*, v. 9, e91300.

1649 Baker, A.J.M.; McGrath, S.P.; Sodoli, C.M.D. e Reeves, R.D. (1994). The possibility of
1650 in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metalaccumulating
1651 plants. *Resources, Conservation and Recycling*, n. 11, p. 41-49.

1652 Balan, D.S.L. (2002). A indústria têxtil e o meio ambiente. *Tecnologia limpa e controle*
1653 *ambiental. Química Têxtil, Barueri*, v. 66, p. 26-31.

1654 Banks, D.; Younger, P.L.; Arnesen, R.T.; Iversen, E.R. e Banks, S.B. (1997).
1655 Minewater chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environmental Geology*, v. 32, p.
1656 157- 174.

- 1657 Barboza, N.R.; Guerra-Sá, R. e Leão, V.A. (2016). Mechanisms of manganese
1658 bioremediation by microbes: an overview, J Chem Technol Biotechnol, v. 91, p. 2733–
1659 2739.
- 1660 Barboza, N. R.; Morais, M. M.; Queiroz, P. S.; Amorim, S. S.; Guerra-Sa, R. e Leão, V.
1661 A. (2017a). High manganese tolerance and biooxidation ability of *Serratia marcescens*
1662 isolated from manganese mine water in Minas Gerais, Brazil. Front. Microbiol., v. 8, p.
1663 1946.
- 1664 Barboza, N. R; Guerra-Sá, R. e Leão, V. A. (2017b). Mechanisms of manganese
1665 bioremediation by microbes: an overview. J Chem Technol Biotechnol., v. 91, p. 2733–
1666 2739.
- 1667 Bennett, J. W. e Bentley, R. (2000). Seeing red: the story of prodigiosin. Adv. Appl.
1668 Microbiol., v. 47, p. 1–32.
- 1669 Bertolazi, A. A.; Canton, G.C.; Azevedo, I.G.; Cruz, Z. M. A.; Soares, J. M.; Santos, W.
1670 O. e Ramos, A. C. (2010). O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais
1671 pesados no solo. Natureza on line, v. 8, p. 24-31.
- 1672 Beveridge, T. J. e Murray, R. G. E. (1976). Uptake and retention of metals by cell walls
1673 of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol., v. 127, p. 1502-1518.
- 1674 Bianco, L. e Perrotta, G. (2015). Methodologies and perspectives of proteomics applied
1675 to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis. International
1676 journal of molecular sciences, v. 16, n. 3, p. 5803-5829.
- 1677 Bisinoti, M.C.; Yabe, M.J.S. e Gimenez, S.M.N. (2004). Avaliação da influência de
1678 metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina- PR.
1679 Revista Analítica, v. 8, p. 22-27.
- 1680 Bortone, S. A. (2005). Bacterial communities as indicators of estuarine and sediment
1681 conditions, in: Estuarine Indicators. CRC Press Boca Raton FL, p. 99-110.
- 1682 Bouchard, M., Laforest, F., Vandelac, L., Bellinger, D., Mergler, D. (2006). Hair
1683 manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed
1684 through tap water. Environ. Health Perspect., v. 115, p. 122- 127.
- 1685 Bouchard, M.F., Sauve, S., Barbeau, B., Legrand, M., Brodeur, M.E., Bouffard, T.,
1686 Limoges, E., Bellinger, D.C., Mergler, D. (2011). Intellectual impairment in schoolage
1687 children exposed to manganese from drinking water. Environ. Health Perspect., v. 119,
1688 p. 138 e 143.
- 1689 Braconi, D.; Bernardini, G. e Santucci, A. (2011). Linking protein oxidation to
1690 environmental pollutants: redox proteomic approaches. Journal of proteomics, v. 74, n.
1691 11, p. 2324-2337.
- 1692 Brito, N.N.; Zamora, P.P.; Neto, A.L.O.; De Battisti, A.; Paterniani, J.E.S. e Pelegrini,
1693 R.T. (2002). Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: IV Fórum
1694 de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, p. 18-22.

- 1695 Brouwers, G. J.; Vijgenboom, E.; Corstjens, P. L. A. M.; De Vrind, J. P. M., e De
1696 Vrind-De Jong, E. W. (2000). Bacterial Mn²⁺ oxidizing systems and multicopper
1697 oxidases: an overview of mechanisms and functions. *Geomicrobiology Journal*, v. 17, n.
1698 1, p. 1-24.
- 1699 Brouwers, J. G.; de Vrind, J. P.; Corstjens, P. L.; Cornelis, P.; Baysse, C. e Vrind-de
1700 Jong, E. W. (1999). *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn²⁺
1701 oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 1762-1768.
- 1702 Bruins, M. R.; Kapil, S. e Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the
1703 environment. *Ecotox Environ Safety*, v. 45, p. 198-207.
- 1704 Caspi, R.; Tebo, B. M. e Haygood, M. G. (1998). c-Type cytochromes and manganese
1705 oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 3549-
1706 3555.
- 1707 Castresan, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their
1708 use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.*, v. 17, p. 540-552.
- 1709 Cerrato, J.M.; Dietrich, A. M.; Falkinham, J. O.; Knocke, W. R.; McKinney, C. W., et
1710 al., (2010). A Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from
1711 biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Research*, v, 44, n. 13, p. 3935-
1712 3945.
- 1713 CETESB. (2009). Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Relação de áreas
1714 contaminadas. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/>>.
- 1715 Chen, K.; Nalaka, S. R.; Yang, C.; Lane, P.; Liebl, A. L.; Rees, B. B.; Corre, C.;
1716 Challis, G. L. e Colea, R. B. (2008). Unusual Odd-Electron Fragments from Even-
1717 Electron Protonated Prodiginine Precursors Using Positive-Ion Electrospray Tandem
1718 Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, v. 19, p. 1856–1866.
- 1719 Choo, K. H.; Lee, H. e Choi, S. J. (2005). Iron and manganese removal and membrane
1720 fouling during UF in conjunction with prechlorination for drinking water treatment. *J.*
1721 *Membr. Sci.*, v. 267, p. 18-26.
- 1722 Chung, W.C.; Chen, L.L.; Lo, W.S.; Kuo, P.A.; Tu, J.e Kuo, C.H. (2013). Complete
1723 Genome Sequence of *Serratia marcescens* WW4. *Genome Announc*, v. 1, n. 2.
- 1724 Clearinghouse, N. D. W. (1988). Iron and manganese removal. A national drinking
1725 water clearinghouse fact sheet. p. 1-4.
- 1726 CONAMA. (2005). Conselho Nacional do Meio Ambiente- Resolução nº 357,
1727 17/03/2005. CONAMA.
- 1728 CONAMA. (2011). Conselho Nacional do Meio Ambiente- Resolução nº 430,
1729 13/11/2011. CONAMA.
- 1730 Corstjens, P. L. A. M.; de Vrind, J. P. M.; Goosen, T. e de Vrind-de Jong, E. W. (1997).
1731 Identification and molecular analysis of the *Leptothrix discophora* SS-1 *mofA* gene, a

- 1732 gene putatively encoding a manganese-oxidizing protein with copper domains.
1733 Geomicrobiol. J., v. 14, p. 91-108.
- 1734 Costa, M.R.M. e Figueiredo, R.C. (2001). Manganês. Balanço Mineral Brasileiro,
1735 DNPM.
- 1736 Cox, J. e Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates,
1737 individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.
1738 Nat. Biotechnol., v. 26, p. 1367–1372.
- 1739 Cox J.; Hein, M. Y.; Lubner, C. A.; Paron, I.; Nagaraj, N. e Mann, M. (2014). Accurate
1740 proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide
1741 ratio extraction, termed MaxLFQ Cell. Proteomics, v. 13, p. 2513–2526.
- 1742 Cristani, M.T.; Naccari, C.; Nostro, A.; Pizzimenti, A.; Trombetta, D. e Pizzimenti, F.
1743 (2012). Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal).
1744 Environmental Science and Pollution Research, v. 19, p.161–168.
- 1745 Cruz-Vega, D.; Cervantes-González, E.; Ammons, D.; Rojas-Avellzapa, L. I.; García-
1746 Mena, J.; Pless, R. C. e Rojasavelizapa, N. G. (2008). Tolerance and removal of metals
1747 by microorganisms isolated from a pitch lake. Hazard Waste Manage B1.1.
- 1748 Cunha, C.D.; Rosário, M.; Rosado, A.S. e Leite, S.G.F. (2004). *Serratia sp.* SVGG16: a
1749 promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-
1750 blended gasoline. Process Biochemistry, v. 39, p. 2277-2282.
- 1751 Das, A. P.; Sukla, L. B.; Pradhan, N. e Nayak, S. (2011). Manganese biomining: A
1752 review. Bioresource Technology, v. 102, n. 16, p. 7381-7387.
- 1753 Dellamatrice, P. M. (2005). Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis e efluentes da
1754 estação de tratamento de águas residuárias de Americana- SP. Tese (Doutorado em
1755 Ecologia de Agrossistemas), 137f, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
1756 Piracicaba.
- 1757 Di Bernardo, L. e Di Bernardo, A. D. (2006). Métodos e técnicas de tratamento de água.
1758 Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 11, n. 2, p. 107.
- 1759 Dimirkou, A. e Doula, M.K. (2008). Use of clinoptilolite and an Fe-overexchanged
1760 clinoptilolite in Zn²⁺ and Mn²⁺ removal from drinking water. Desalination, v. 224, p:
1761 280-292.
- 1762 Ding, M. J. e Williams, R P. (1983). Biosynthesis of prodigiosin by white strains of
1763 *Serratia marcescens* isolated from patients. J. Clin. Microbiol., v. 17, p. 476-480.
- 1764 DNPM. Departamento Nacional da Produção Mineral. (1976) Perfil Analítico do
1765 Manganês por Serfaty, Abraham, Brasília.
- 1766 Dowling, V.A. e Sheehan, D. (2006). Proteomics as a route to identification of toxicity
1767 targets in environmental toxicology. Proteomics, v. 6, p. 5597–5604.

- 1768 Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and
1769 high throughput. *Nucleic Acids Res.*, v. 32, p. 1792-1797.
- 1770 Ee, R.; Lim, Y.L.; Tee, K.K.; Yin, W.F. e Chan, K.G. (2014). Quorum sensing activity
1771 of *Serratia fonticola* strain RB-25 isolated from an ex-landfill site. *Sensors (Basel)*, v.
1772 14, p. 5136–5146.
- 1773 Ehrlich, H. L. (1999). Microbes as geologic agents: their role in mineral formation.
1774 *Geomicrobiology Journal*, p. 135-153.
- 1775 Ehrlich, H. L. e Newman, D. K. Geomicrobiology of manganese, in: *Geomicrobiology*,
1776 5th edn. CRC Press, Boca Raton FL (2008) 347-420.
- 1777 Escobar, H. (2015). Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. *Science*, v. 350, p.
1778 1138–1139.
- 1779 Favas, P.J.C., Sarkar, S.K., Rakshit, D., Venkatachalam, P., Prasad, M.N.V. (2016).
1780 Acid mine drainages from abandoned mines: hydrogeochemistry, environmental impact,
1781 resource recovery, and prevention of pollution. In: Prasad, M.N.V., Shih, K. (Eds.),
1782 *Environmental Materials and Waste, Resource Recovery and Pollution Prevention*.
1783 Elsevier, Academic Press, pp. 413e462.
- 1784 Fay, R. M. e Mumtaz, M. M. (1996). Development of a priority list of chemical
1785 mixtures occurring at hazardous waste sites, using the HazDat database. *Food Chem.*
1786 *Toxicol.*, v. 34, p. 1163-1165.
- 1787 Francis, C. A.; Co, E. M. e Tebo, B.M. (2001). Enzymatic manganese (II) oxidation by
1788 a marine α -proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 4024-4029.
- 1789 Franciskovic-Bilinski, S.; Bilinski, H.; Grbac, R.; Zunic, J.; Necemer, M. e Hanzel, D.
1790 (2017). Multidisciplinary work on barium contamination of the karstic upper Kupa
1791 River drainage basin (Croatia and Slovenia). *Environ. Geochem. Health*, v. 29, p. 69-79.
- 1792 Franklin, F. C. H. e Venable, W. A. (1976). Biochemical, genetic, and regulatory
1793 studies of alanine catabolism in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.*, v. 149, p. 229-
1794 237.
- 1795 Freire, R. S.; Pelegrini, R.; Kubota, L.T. e Durán, N. (2000). Novas tendências para o
1796 tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v.
1797 23, n. 4, p. 504-511.
- 1798 Freitas, T.C. (2009). Avaliação da capacidade de adsorção de diferentes carvões
1799 derivados de *Moringa oleífera* na remoção de microcistinas de águas contaminadas.
1800 Dissertação, 123f, Universidade Federal de Ouro Preto- MG.
- 1801 Fritsch, M. J.; Trunk, K.; Diniz, J. A.; Guo, M.; Trost, M. e Coulthurst, S. J. (2013).
1802 Proteomic Identification of Novel Secreted Antibacterial Toxins of the *Serratia*
1803 *marcescens* Type VI Secretion System. *Molecular & Cellular Proteomics.*, v. 12, p.
1804 2735-2749.

- 1805 Gadd, G.M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for
1806 bioremediation. *Geoderma*, v. 122, p. 109 -119.
- 1807 Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and
1808 bioremediation. *Microbiology*, v.156, p. 609-643.
- 1809 Gallard, H. e Guten, U. von. (2002). Chlorination of natural organic matter: kinetics of
1810 chlorination and of THM formation. *Water Research*, v. 36, n. 1, p. 65-74.
- 1811 Gavrilesco, M. (2004) Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption.
1812 *Engineering in Life Sciences*, v. 4, n. 3, p. 219-232.
- 1813 Gaylard, C. C.; Bellinaso, M. L. e Manfio, G. P.(2005). Aspectos biológicos e técnicas
1814 da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*,
1815 Brasília, v. 8, n. 34.
- 1816 Geszvain, K.; Butterfield, C.; Davis, R. E.; Madison, A. S.; Lee, S. W.; Parker, D. L.;
1817 Soldatova, A.; Spiro, T. G.; Luther, G. W. e Tebo, B. M. (2012). The molecular
1818 biogeochemistry of manganese (II) oxidation. *Biochem Soc Trans.*, v. 40, p. 1244-1248.
- 1819 GIAIA—Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental. 2016. Relatório-
1820 técnico determinação de metais pesados na bacia do Rio Doce (período dezembro-2015
1821 a abril-2016). [http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/](http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/Relatorio-GIAIA_Metais_Vivian_revisto5.pdf) Relatorio-
1822 GIAIA_Metais_Vivian_revisto5.pdf
- 1823 Goldschmidt, M. C. e Williams, R. P. (1968). Thiamine-induced formation of the
1824 monopyrrole moiety of prodigiosin. *Journal of bacteriology*, v. 96, n. 3, p. 609-616.
- 1825 Gorbacheva, M.; Morozova, O.; Shumakovich, G.; Streltsov, A.; Shleev, S. e
1826 Yaropolov, A. (2009). Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase.
1827 *Bioorganic chemistry*, v. 37, n. 1, p. 1-5.
- 1828 Grass, G. e Rensing, C. (2001). Biochem. CueO is a multi-copper oxidase that confers
1829 copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biophys. Res. Commun.*, v. 286, p. 902-908.
- 1830 Grimont, P. A. D. (1977). Le Genre *Serratia*. Taxonomie et approche écologique, Ph.D.
1831 Thesis, University of Bordeaux I, Bordeaux France.
- 1832 Grimont, F. e Grimont, P.A.D. (2006). The Genus *Serratia*- Chapter 3.3.11.
1833 *Prokaryotes*, v. 6, p. 219–244.
- 1834 Haddix, P.L. e Shanks, R.M.Q. (2018). Prodigiosin pigment of *Serratia marcescens* is
1835 associated with increased biomass production. *Archives of Microbiology*, v. 7, p. 989-
1836 999.
- 1837 Hallberg, K. B. e Johnson, D. B. (2005). Biological manganese removal from acid mine
1838 drainage in constructed wetlands and prototype bioreactors. *Science of the Total*
1839 *Environment*, v. 338, p. 115-124.

- 1840 Hansel, C.M.; Zeinera, C.A.; Santellib, C.M. e Webbc, S.M. (2012) Mn (II) oxidation
1841 by an ascomycete fungus is linked to superoxide production during asexual
1842 reproduction. PNAS, v. 109, n. 31, p. 12621-12625.
- 1843 Harrison, J. J.; Tremaroli, V.; Stan, M. A.; Chan, C. S.; Vacchi-Suzzi, C.; Heyne, B. J.;
1844 Parsek, M. R.; Ceri, H. e Turner, R. J. (2009). Environ. Chromosomal antioxidant genes
1845 have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. Microbiol., v.
1846 11, p. 2491-2509.
- 1847 Hasan, H.A.; Abdullah, S.R.S.; Kofli, N.T. e Kamaruddin, S.K. (2010) Biosorption of
1848 Manganese in Drinking Water by Isolated Bacteria. Journal of Applied Sciences, v. 10,
1849 n. 21, p. 2653-2657.
- 1850 Hasan, H.A.; Abdullah, S.R.S.; Kofli, N.T. e Kamaruddin, S.K. (2012). Isotherm
1851 equilibria of Mn(2)(+) biosorption in drinking water treatment by locally isolated
1852 *Bacillus* species and sewage activated sludge. Journal Environmental Manage, v. 111, p.
1853 4334-4343.
- 1854 Hejazi, A. e Falkiner, F.R. (1997). *Serratia marcescens*. Journal Medical Microbiology,
1855 v. 46, p. 903–912.
- 1856 Helbig, K.; Grosse, C. e Nies, D. H. (2008). Cadmium toxicity in glutathione mutants of
1857 *Escherichia coli*. J Bacteriol., v. 190, p. 5439-5454.
- 1858 Herman, C.; Ogura, T.; Tomoyasa, T.; Hiraga, S.; Akiyama, Y.; Ito, K.; Thomas, R.;
1859 D'Ari, R. e Bouloc, P. (1993). Cell growth and lambda phage development controlled
1860 by the same essential *Escherichia coli* gene, ftsH/hflB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.
1861 90, p. 10861-10865.
- 1862 Hines, D. A.; Saurugger, P. N.; Ihler, G. M. e Benedik, M. J. (1988). Genetic analysis of
1863 extracellular proteins of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol., v. 170, p. 4141–4146.
- 1864 Hoyland, V. W.; Knocke, W. R.; Falkinham, J. O.; Pruden, A. e Singh, G. (2014).
1865 Effect of drinking water treatment process parameters on biological removal of
1866 manganese from surface water. Water research, v. 66, p. 31-39.
- 1867 Hug, I. e Feldman, M. F. (2011). Analogies and homologies in lipopolysaccharide and
1868 glycoprotein biosynthesis in bacteria. Glycobiology, v. 21, p. 138-151.
- 1869 Hullo, M.F., Moszer, I.; Danchin, A. e Martin-Verstraete, I. (2001). CotA of *Bacillus*
1870 *subtilis* is a copper-dependent laccase. Journal Bacteriology, v. 183, n. 18, p. 5426-
1871 5430.
- 1872 Hurst, C.; Crawford, R.; Garland, J.; Lipson, D.; Mills, A. e Stetzenbach, L. (1997).
1873 Manual of Environmental Microbiology, 3rd edn. Electronic only, 1,293 páginas.
- 1874 Ilyas, S.; Rehman, A.; Varela, A.C. e Sheehan, D. (2014). Redox Proteomics Changes
1875 in the Fungal Pathogen *Trichosporon asahiion* Arsenic Exposure: Identification of
1876 Protein Responses to Metal-Induced Oxidative Stress in an Environmentally-Sampled
1877 Isolate. Plos One, v. 9, n. 7.

- 1878 Jafarzade, M.; Mohamad, S.; Usup, G. e Ahmad, A. (2012). Heavy-metal tolerance and
1879 antibiotic susceptibility of red pigmented bacteria isolated from marine environment.
1880 Nat. Resour., v. 3, p. 171-174.
- 1881 Javanbakht, V. Alavi, S.A. e Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal
1882 using microorganisms as biosorbent. Water Science & Technology, v. 69, p. 1775-1787.
- 1883 Jehmlich, N.; Hubschmann, T.; Gesell Salazar, M.; Volker, U.; Benndorf, D.; Müller,
1884 S.; von Bergen, M. e Schmidt, F. (2010). Advanced tool for characterization of
1885 microbial cultures by combining cytomics and proteomics. Appl Microbiol Biotechnol.
1886 v. 88, p. 575–584.
- 1887 Kafaie, R.; Tahmasbi, R.; Ravanipour, M.; Vakilabadi, D. R.; Ahmadi, M.; Omrani, A.
1888 e Ramavandi, B. (2017). Urinary arsenic, cadmium, manganese, nickel, and vanadium
1889 levels of schoolchildren in the vicinity of the industrialized area of Asaluyeh, Iran.
1890 Environ. Sci. Pollut. Res., v. 24, p. 23498-23507.
- 1891 Kannan, A. e Ramteke, P.W. (2002). Uptake of nickel (II) by *Serratia marcescens*.
1892 Journal Environmental Biology, v. 23, n. 1, p. 57-59.
- 1893 Kehres, D. G. e Maguire, M. E. (2003). Emerging themes in manganese transport,
1894 biochemistry and pathogenesis in bacteria. FEMS Microbiol., v. 27, p. 263-290.
- 1895 Kimyon, Ö.; Das, T.; Ibugo, A. I.; Kutty, S. K.; Ho, K. K.; Tebben, J.; Kumar, N. e
1896 Manefield, M. (2016). *Serratia* Secondary Metabolite Prodigiosin Inhibits *Pseudomonas*
1897 *aeruginosa* Biofilm Development by Producing Reactive Oxygen Species that Damage
1898 Biological Molecules. Front. Microbiol., v. 7, p. 972.
- 1899 Kornblith, E. S.; Casey, S. L; Lobdell, D. T.; Colledge, M. A. e Bowler, R. M. (2018).
1900 Environmental exposure to manganese in air: Tremor, motor and cognitive symptom
1901 profiles. Neurotoxicology, v. 64, p. 152-158.
- 1902 Kumar, A. e Rai, L.C. (2015). Proteomic and biochemical basis for enhanced growth
1903 yield of *Enterobacter* sp. LCR1 on insoluble phosphate medium. Microbiological
1904 Research, v. 170, p. 195–204.
- 1905 Kunz, A. e Zamora, P. P. (2002). Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis.
1906 Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 78-82.
- 1907 Lacerda, C. M. R.; Reardon, K. F. (2009). Environmental proteomics: applications of
1908 proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. Briefings in
1909 Functional Genomics and Proteomics., v. 8, p. 75–87.
- 1910 Langille, W. M. e Maclean, K. S. (1976). Some essential nutrient elements in forest
1911 plants as related to species, plant part, season and location. Plant Soil, v 45, p. 17-26.
- 1912 Learman, D.R.; Wankel, S.D.; Webb, S.M.; Marnez, N.; Madden, A.S. e Hansel, C.M.
1913 (2011a). Coupled biotic–abiotic Mn (II) oxidation pathway mediates the formation and
1914 structural evolution of biogenic Mn oxides. Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 75,
1915 p. 6048–6063.

- 1916 Learman, D. R.; Voelker, B. M.; Vazquez-Rodriguez, A. I. e Hansel, C. M. (2011b).
 1917 Formation of manganese oxides by bacterially generated superoxide. *Nature*
 1918 *Geoscience*, v. 4, n. 2, p. 95-98.
- 1919 Learman, D.R. e Hansel, C.M. (2014). Comparative proteomics of Mn(II)-oxidizing and
 1920 non-oxidizing *Roseobacter* clade bacteria reveal an operative manganese transport
 1921 system but minimal Mn(II)-induced expression of manganese oxidation and antioxidant
 1922 enzymes. *Environmental Microbiology Reports*.
- 1923 Lemire, J. A.; Harrison, J. J. e Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals:
 1924 mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11,
 1925 p. 371-384.
- 1926 Li, R. Z.; Pan, C. R.; Xu, J. J.; Chen, J. e Jiang Y. M. (2013). Contamination and health
 1927 risk for heavy metals via consumption of vegetables grown in fragmentary vegetable
 1928 plots from a typical nonferrous metals mine city. *Huan Jing Ke Xue*, v. 34, p. 1076-
 1929 1085.
- 1930 Li, P.; Kwok, A.H.Y.; Jiang, J; Ran, T.; Xu, D.; Wang, W. et al. (2015). Comparative
 1931 Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic
 1932 Potential. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4.
- 1933 Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A. e Lu,
 1934 Y. (2014). Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers.
 1935 *Chem Rev*, v. 114, p. 4366-4469.
- 1936 Lovley, D. R.; Widman, P. K.; Woodward, J. C. e Phillips, E. J. (1993). Reduction of
 1937 uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl Environ Microbiol.*, v. 59, p.
 1938 3572-3576.
- 1939 Macaskie, L. E.; Bonthron, K. M.; Yong, P. e Goddard, D. T. (2000). Enzymically
 1940 mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter sp.*: a concerted role for
 1941 exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation.
 1942 *Microbiology*, v. 146, p. 1855-1867.
- 1943 Martins, I. e Lima, I.V. (2001). Ecotoxicologia do manganês e seus compostos.
 1944 *Caderno de referência ambiental*, v. 7, p. 1-122.
- 1945 McKee, K. P.; Vance, C. C. e Karthikeyan, R. (2016). Biological manganese oxidation
 1946 by *Pseudomonas putida* in trickling filters. *J. Environ. Sci. Health*, v. 51, p. 523-535.
- 1947 Misra, R.; Stikeleather, R. e Gabriele, R. (2015). In vivo roles of BamA, BamB and
 1948 BamD in the biogenesis of BamA, a core protein of the β -barrel assembly machine of
 1949 *Escherichia coli*. *J Mol Biol.*, v. 427, p. 1061-1074.
- 1950 More, T. T.; Yadav, J. S.; Yan, S. e Tyagi, R. D. (2014). Surampalli RY. Extracellular
 1951 polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J*
 1952 *Environ Management*, v. 144, p. 1-25.

- 1953 Morgan, J. J. e. Stumm, W. (1964). Colloid-chemical properties of manganese dioxide.
1954 Journal of Colloid Science, v. 19, n. 4, p. 347-359.
- 1955 Muller, H.; Furnkranz, M.; Grube, M. e Berg, G. (2013). Genome Sequence of *Serratia*
1956 *plymuthica* Strain S13, an Endophyte with Germination- and Plant-Growth-Promoting
1957 Activity from the Flower of Styrian Oil Pumpkin. Genome Announc, v. 1.
- 1958 Nakama, K., Medina, M., Lien, A., Ruggieri, J., Collins, K., Johnson, H.A. (2014).
1959 Heterologous expression and characterization of the manganese-oxidizing protein from
1960 *Erythrobacter sp.* strain SD21. Appl. Environ. Microbiol., v. 80, p. 6837 - 6842.
- 1961 Namdari, F.; Hurtado-Escobar, G. A.; Abed, N.; Trotereau, J.; Fardini, Y; Giraud, E.;
1962 Velge, P. e Virlogeux-Payant, I. (2012). Deciphering the roles of BamB and its
1963 interaction with BamA in outer membrane biogenesis, T3SS expression and virulence in
1964 salmonella. Plos One, v. 7, e46050
- 1965 Nealsen, K. e Myers, C. (1992). Microbial reduction of manganese and iron: new
1966 approaches to carbon cycling. Applied and Environmental Microbiology, v. 58, p. 439 -
1967 443.
- 1968 Nealsen, K.H. (2006). The Manganese-Oxidizing Bacteria, in The Prokaryotes.
- 1969 Neculita, C.M. e Rosa, E. (2019). A review of the implications and challenges of
1970 manganese removal from mine drainage. Chemosphere, v. 214, p. 491- 510
- 1971 Neupane, S.; Finlay, R.D.; Kyrpides, N.C.; Goodwin, L.; Alstrom, S.; Lucas, S., et al.
1972 (2012). Complete genome sequence of the plant-associated *Serratia plymuthica* strain
1973 AS13. Stand Genomic Sci, v. 7, p. 22–30.
- 1974 Nies, D. H. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 51, p.
1975 730-750.
- 1976 Parker, D.L.; Sposito, G. e Tebo, B.M. (2004). Manganese (III) binding to a pyoverdine
1977 siderophore produced by a manganese (II)-oxidizing bacterium. Geochimica et
1978 Cosmochimica Acta, v. 68, n. 23, p. 4809–4820.
- 1979 Pereira, S.; Micheletti, E.; Zille, A.; Santos, A.; Moradas-Ferreira, P.; Tamagnini, P. e
1980 Philippis, R. de. (2011). Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing
1981 cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS
1982 functional groups and also accumulate inside the cell?. Microbiology, v. 157, p. 451-
1983 458.
- 1984 Pereira, A.R.B. e Freitas, D.A.F.de. (2012). Uso de microrganismos para a
1985 biorremediação de ambientes Impactados. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e
1986 Tecnologia Ambiental, v. 6, nº 6, p. 975- 1006.
- 1987 Perez, J. e Jeffries, T.W. (1992). Roles of manganese and organic acid chelators in
1988 regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete*
1989 *chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology, v. 58, p. 2402–2409.

- 1990 Porcheron, G.; Garénaux, A.; Proulx, J.; Sabri, M. e Dozois, C. M. Iron, copper, zinc,
1991 and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: Correlations
1992 between strains, site of infection and the relative importance of the different metal
1993 transport systems for virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, v. 3, p. 90.
- 1994 Purushotham, P.; Arun, P.V.; Prakash, J.S.; Podile, A.R. (2012). Chitin binding proteins
1995 act synergistically with chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. *PLoS One*, v. 7.
- 1996 Queiroz, P.S; Barboza, N.R.; Cordeiro, M.M.; Leão, V.A.; Guerra- Sá, R. (2018). Rich
1997 growth medium promotes an increased on Mn (II) removal and manganese oxide
1998 production by *Serratia marcescens* strains isolates from wastewater. *Biochemical*
1999 *Engineering Journal*, v. 140, p. 148-156.
- 2000
2001 Rajic, N.; Stojakovic, D.; Jevtic, S.; Zabukovec Logar, N.; Kovac, J. e Kaucic, V.
2002 (2009). Removal of aqueous manganese using the natural zeolitic tuff from the Vranjska
2003 Banja deposit in Serbia. *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, p. 1450-1458.
- 2004 Rose, A.K., Fabbro, L., Kinnear, S. (2017). Hydrogeochemistry in a relatively
2005 unmodified subtropical catchment: insights regarding the health and aesthetic risks of
2006 manganese. *J. Hydrol. Reg. Stud.*, v. 13, p. 152 e 167.
- 2007 Said, A. A.; Livermore, D. M. e Williams, R. J. (1987). Expression of H1 outer-
2008 membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to sensitivity to EDTA and
2009 polymyxin. *Br J Med Microbiol*, v. 24, p. 267-274.
- 2010 Sambrook, J.; Maniatis, T. e Fritsch, E. F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory*
2011 *Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 2012 Santelli, C.M.; Pfister, D.H.; Lazarus, D.; Sun, L.; Burgos, W. D. e Hansel, C. M.
2013 (2010). Promotion of Mn (II) Oxidation and Remediation of Coal Mine Drainage in
2014 Passive Treatment Systems by Diverse Fungal and Bacterial Communities. *Applied and*
2015 *Environmental Microbiology*, v. 76, n. 14, p. 4871-4875.
- 2016 Santelli, C.M.; Chaput, D.L. e Hansel, C.M. (2014). Microbial communities promoting
2017 Mn (II) oxidation in Ashumet Pond, a historically polluted freshwater pond undergoing
2018 remediation. *Geomicrobiology Journal*, v. 31, p. 605–616.
- 2019 Savova, D.; Petrov, N.; Yardim, M. F.; Ekinici, E.; Budinova, T.; Razvigorova, M. e
2020 Minkova, V. (2003). The influence of the texture and surface properties of carbon
2021 adsorbents obtained from biomass products on the adsorption of manganese ions from
2022 aqueous solution. *Carbon*, v. 41, n.10, p.1897-1903.
- 2023 Sheng, G. P.; Zhang, M. L. e Yu, H. Q. (2008). Characterization of adsorption
2024 properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Coll.*
2025 *Surf. B. Biointerf.*, v. 62, p. 83-90.
- 2026 Silva, A. M.; Cruz, F. L. S.; Lima, R. M. F.; Teixeira, M. C. e Leão, V. A. (2010).
2027 Manganese and limestone interactions during mine water treatment. *Journal of*
2028 *Hazardous Materials*, v. 181, n. 1, p. 514-520.

- 2029 Soares, E. V. e Soares, H. M. V. (2012). Bioremediation of industrial effluents
2030 containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green
2031 technology: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 19, p. 1066-1083.
- 2032 Soldatova, A. V.; Butterfield, C.; Oyerinde, O. F.; Tebo, B. M. e Spiro, T. G. (2012).
2033 Multicopper oxidase involvement in both Mn (II) and Mn (III) oxidation during
2034 bacterial formation of MnO₂. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 17, n. 8, p.
2035 1151-1158.
- 2036 Su, J.; Bao, P.; Bai, T.; Deng, L.; Wu, H.; Liu, F. e He, J. (2013). CotA, a Multicopper
2037 Oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, Exhibits Manganese-Oxidase Activity. *PLOS*
2038 *ONE*, n. 8, v. 4.
- 2039 Su, J.; Deng, L.; Huang, L.; Guo, S.; Liu, F. e He, J. (2014). Catalytic oxidation of
2040 manganese (II) by multicopper oxidase CueO and characterization of the biogenic Mn
2041 oxide. *Water Research*, v. 56, p. 304- 313.
- 2042 Sujitha, D. e Jayanthi, M. (2014). Efficiency of immobilized microbial combination for
2043 the bioremediation of tannery effluents in Vellore District, Tamil Nadu, India. *Int. J.*
2044 *Adv. Res. Biol. Sci.*, v. 1, p. 113-120.
- 2045 Szewzyk, U.; Szewzyk, R. e Stenstrom, T. (1993). Growth and survival of *Serratia*
2046 *marcescens* under aerobic and anaerobic conditions in the presence of materials from
2047 blood bags. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p.1826-1830.
- 2048 Tang, W.; Xia, J.; Zeng, X.; Wu, L. e Ye. G. (2014). Biological characteristics and
2049 oxidation mechanism of a new manganese-oxidizing bacteria FM-2., *Bio-Medical*
2050 *Materials and Engineering*, v. 24, n. 1, p. 703-709.
- 2051 Tang, W.; Gong, J.; Wu, L.; Li, Y.; Zhang, M. e Zeng, X. (2016). DGGE diversity of
2052 manganese mine samples and isolation of a *Lysinibacillus sp.* efficient in removal of
2053 high Mn(II) concentrations. *Chemosphere*, v. 165, p. 277-283.
- 2054 Tanigawa, M.; Shinohara, T.; Saito, M.; Nishimura, K.; Hasegawa, Y.; Wakabayashi,
2055 S.; Ishizuka, M. e Nagata, Y. (2010). D-Amino acid dehydrogenase from *Helicobacter*
2056 *pylori* NCTC 11637. *Amino Acids*, v. 38, p. 247-255.
- 2057 Taylor, D. E.; Walter, E. G.; Sherburne, R. e Bazett-Jones, D. P. (1988). Structure and
2058 location of tellurium deposited in *Escherichia coli* cells harbouring tellurite resistance
2059 plasmids. *J Ultrastruct Mol Struct Res.*, v. 99, p. 18-26.
- 2060 Tebo, B.M.; Bargar, J.R.; Clement, B.G.; Dick, G.J.; Murray, K.J.; Parker, D.; Verity,
2061 R. e Webb, S.M. (2004). Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of
2062 formation. *Annual Reviews of Earth and Planetary Science*, n. 32, p. 287–328.
- 2063 Tebo, B. M.; Johnson, H. A.; McCarthy, J. K. e Templeton, A. S. (2005).
2064 Geomicrobiology of manganese (II) oxidation. *TRENDS in Microbiology*, v. 13, n. 9, p.
2065 421-428.

- 2066 Tebo, B.M.; Geszvain, K. e Lee S-W. (2010). The molecular geomicrobiology of
2067 bacterial manganese (II) oxidation. In: Geomicrobiology: Molecular and Environmental
2068 Perspective, p. 285–308.
- 2069 Teitzel, G. M. e Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic
2070 *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol., v. 69, p. 2313-2320.
- 2071 Tuveng, T. R.; Hagen, L. H.; Mekasha, S.; Frank, J.; Arntzen, M. O.; Vaaje-Kolstad, G.
2072 e Eijsink, V. G. H. (2017). Genomic, proteomic and biochemical analysis of the
2073 chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* BJL200. BBA-Proteins and Proteomics,
2074 v. 1865, p. 414-421.
- 2075 US DHHS (United States Department of Health and Human Services). (2012).
2076 Toxicological Profile for Manganese. Agency for Toxic Substances and Disease
2077 Registry, p. 556
- 2078 van Waasbergen, L. G.; Hildebrand, M. e Tebo, B. M. (1996). Identification and
2079 characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the
2080 marine *Bacillus sp.* strain SG-1. J. Bacteriol., v. 178, p. 3517-3530.
- 2081 Volesky, B. (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next
2082 century. Hydrometallurgy, v. 59, p. 203-216.
- 2083 Zainol, Z. e Nicol, M. J. (2009). Ion-exchange equilibria of Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ and
2084 Mg²⁺ with iminodiacetic acid chelating resine Amberlite IRC 748. Hydrometallurgy, v.
2085 99, p. 175-180.
- 2086 Zakeri, F.; Noghabi, K.A.; Sadeghizadeh, M.; Kardan, M, R.; Masoomi, F.;
2087 Farshidpour, M.R. e Atarilar, A. (2010). *Serratia sp.* ZF03: An efficient radium
2088 biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas.
2089 Bioresource Technology, v. 101, p. 9163–9170.
- 2090 Zakeri, F.; Sadeghizadeh, M.; Kardan, M.R.; Shahbani Zahiri, H.; Ahmadian, G.;
2091 Masoumi, F. et al. (2012). Differential proteome analysis of a selected bacterial strain
2092 isolated from a high background radiation area in response to radium stress. Journal
2093 Proteomics, v. 75, p. 4820-4832.
- 2094 Zhang, K. e Li, F. (2011). Isolation and characterization of a chromium-resistant
2095 bacterium *Serratia sp.* Cr-10 from a chromate-contaminated site. Applied Microbiology
2096 Biotechnology, v. 90, n 3, p. 1163-1169.
- 2097 Zhou, J.; Liu, Y.; Ran, H.; Yuan, Y. e Wang, G. (2010). Manganese removal
2098 mechanisms of five bacterial strains with the abilities to produce MnCO₃. Microbiol.
2099 Chin., v. 34, (2010) 573-579.
- 2100 Zhou, H.; Pan, H.; Xu, J.; Xu, W. e Liu, L. (2016). Acclimation of a marine microbial
2101 consortium for efficient Mn(II) oxidation and manganese containing particle production.

- 2102 Wang, W., Han, H. (2012). Recovery strategies for tackling the impact of phenolic
2103 compounds in a UASB reactor treating coal gasification wastewater. *Bioresour.*
2104 *Technol.*, v. 103, p. 95-100.
2105
- 2106 Wang, X.; Wiens, M.; Divekar, M.; Grebenjuk, V. A.; Schröder, H. C.; Batel, R. e
2107 Müller, W. E. M. Isolation and characterization of a Mn(II)-oxidizing *Bacillus* strain
2108 from the demosponge *Suberites domuncula*, *Mar Drugs* 9 (2011) 1-28.
- 2109 Wang, Y.; Yuan, Y.; Liu, J.; Su, L.; Chang, D.; Guo, Y.; Chen, Z.; Fang, X.; Wang, J.;
2110 Li, T.; Zhou, L.; Fang, C.; Yang, R. e Liu, C. (2014). Transcriptomic and proteomic
2111 responses of *Serratia marcescens* to spaceflight conditions involve large-scale changes
2112 in metabolic pathways. *Advances in Space Research*, v. 53, p. 1108–1117.
- 2113 Wasserman, H. H., McKeon, J. E. e Smith, L. (1960). Prodigiosin: Structure and partial
2114 synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 82, 506–507.
- 2115 WHO. (2011). Manganese in Drinking-water. Background document for development
2116 of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization.
- 2117 Williams, R.P. (1973). Biosynthesis of Prodigiosin, a Secondary Metabolite of *Serratia*
2118 *marcescens*. *Applied Microbiology*, p. 396-402.
- 2119 Williams, R. P. e Quadri, S. M. H. (1980). The pigment of *Serratia*, in: The genus
2120 *Serratia*, von Graevenitz A, Rubin, SJ (ed), CRC Press Boca Raton.
- 2121 Williamson, N.R.; Fineran, P.C; Leeper, F.J. e Salmond, G.P.C. 2006. The biosynthesis
2122 and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 887-
2123 899.