

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**BIOACUMULAÇÃO DE SELÊNIO POR *Escherichia coli*:  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A ESPÉCIES E  
CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO E NA PRESENÇA DE  
MERCÚRIO**

Michele Pokulat Sauer

Prof.<sup>a</sup> Dra. Emilene Mendes Becker  
Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Roberta Bussamara Rodrigues  
Co-orientadora

Porto Alegre, 12 de abril de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MICHELE POKULAT SAUER

**BIOACUMULAÇÃO DE SELÊNIO POR *Escherichia coli*:  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A ESPÉCIES E  
CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO E NA PRESENÇA DE  
MERCÚRIO.**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutora em Química

Prof.<sup>a</sup> Dra. Emilene Mendes Becker  
Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Roberta Bussamara Rodrigues  
Co-orientadora

Porto Alegre, 12 de abril de 2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Sauer, Michele Pokulat  
BIOACUMULAÇÃO DE SELÊNIO POR *Escherichia coli*:  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A ESPÉCIES E CONCENTRAÇÕES DE  
SELÊNIO E NA PRESENÇA DE MERCÚRIO / Michele Pokulat  
Sauer. -- 2024.  
130 f.  
Orientador: Emilene Mendes Becker.

Coorientador: Roberta Bussamara Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de  
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. *Escherichia coli*. 2. Selênio. 3. Mercúrio. 4.  
Bioacumulação de Se. 5. GFAAS. I. Becker, Emilene  
Mendes, orient. II. Rodrigues, Roberta Bussamara,  
coorient. III. Título.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (03/2016) e (04/2024), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Emilene Mendes Becker e co-orientação da Professora Doutora Roberta Bussamara Rodrigues. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi  
Arruda

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marilene Henning  
Vainstein

---

Prof. Dr. Klester dos Santos Souza

---

Prof. Dr. Alexandre Batista  
Schneider

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Emilene Mendes  
Becker

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Roberta Bussamara  
Rodrigues

---

Michele Pokulat Sauer

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Santa Maria pelo incentivo à qualificação profissional.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade de realização do presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de projetos de pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Emilene Mendes Becker pela disposição em orientar, incentivar e buscar recursos que possibilitaram a execução deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Roberta Bussamara Rodrigues pela co-orientação, disponibilidade, motivação e contribuição significativa na realização deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Marilene Henning Vainstein, docente do Instituto de Biociências e pesquisadora do Centro de Biotecnologia da UFRGS, pela participação na banca examinadora de qualificação e, principalmente, por generosamente disponibilizar os recursos e a estrutura do LABFIMB. Sua colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, docente do Instituto de Química da UNICAMP, pela generosa colaboração ao disponibilizar os recursos do GEPAM, contribuindo consideravelmente para o desempenho deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Schneider pela parceria no trabalho desenvolvido em eletroanalítica e pela participação na banca examinadora de qualificação.

Ao Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes pela participação na banca examinadora de qualificação e pela supervisão das atividades no LEA/IQ-UFRGS.

Ao Dr. Alan dos Santos da Silva, por todo treinamento e auxílio prestados no Laboratório de Espectrometria Atômica – LEA/IQ-UFRGS.

Aos alunos de iniciação científica Flávia, Arielli, Gustavo, Murilo, Lucas, Rickson, Pedro, Thomas e, em especial, à Bruna Dal Bello, pela colaboração inestimável em cada etapa do processo, fundamental para a concretização deste trabalho.

Aos colegas do LABFIMB/UFRGS e do GEPAM /UNICAMP pelo espaço, tempo e conhecimento compartilhados. Agradeço especialmente a Luana e ao Amaury, não só pela ajuda na realização das análises, mas também pela amizade que perdura.

Às colegas e amigas Dra. Camila Cerveira e Dra. Juliana Pinheiro de Souza, pelo conhecimento compartilhado e momentos de apoio e descontração durante esta jornada.

À colega de trabalho e amiga Ma. Andrea da Rocha Giovenardi pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

## Lista de trabalhos gerada por esta tese

### Trabalhos apresentados em eventos

1. Sauer, M. P.; Bello, B. D.; Nebenzahl, A. D. B.; Rodrigues, R. B.; Becker, E. M. Efeito da exposição da *Escherichia coli* ao mercúrio e determinação de mercúrio total por CVG AAS em meio de cultura. In: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Ibero-americano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas. Livro de Resumos. 2018, v.2, p. ESP 092.
2. Sauer, M. P.; Santos, R. B.; Bernardi, F.; Rodrigues, R. B.; Becker, E. M. Estudo do efeito de diferentes espécies de selênio na exposição de células microbianas. In: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Ibero-americano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas. Livro de Resumos. 2018, v.2, p. ESP 101.
3. Schneider, A.; Cardoso, T.; Sauer, M. P.; Krause, C. H.; Rodrigues, R. B.; Becker, E. M. Desenvolvimento de método para quantificação de selênio em meio de cultura por voltametria de redissolução anódica e pulso diferencial após a interação Se-*Escherichia coli*. In: 5º Congresso Uruguaio de Química Analítica, 2018, Montevideú. Livro de Resumos, 2018.

### Artigo completo relacionado com a tese publicado em periódico estrangeiro indexado

1. Michele P. Sauer, Gustavo B. Barp, Luana Ferreira da Costa, Roberta Bussamara, Marilene H. Vainstein, Marco Aurélio Zezzi Arruda e Emilene Mendes Becker (2024): Effects of Low-Level Inorganic Selenium on Selenium Bioaccumulation in *Escherichia coli*: A Bioanalytical Study Using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS), Analytical Letters, DOI: 10.1080/00032719.2024.2328361.

## RESUMO

A interação entre selênio (Se) e mercúrio (Hg) é complexa e pode estar relacionada aos efeitos subjacentes da espécie, concentração e a ordem de administração desses elementos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos interativos entre Se e Hg no desenvolvimento e na bioacumulação de Se por *Escherichia coli*, bactéria capaz de reduzir e acumular Se. Os experimentos com *E. coli* ATCC 11775 foram realizados pela exposição ao Se(IV) ou Se(VI) em baixas concentrações, 0,3; 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  individualmente ou em coexposição com 15  $\mu\text{M}$  de Hg(II), em pré-tratamento e pós-tratamento. A resistência de *E. coli* ao Hg também foi avaliada. A avaliação do desenvolvimento celular foi realizada pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) e a quantificação de Se foi realizada por GF AAS. A influência do Hg e das espécies e concentrações de Se foi determinada por ANOVA. Os resultados evidenciaram que o Se não tem efeito sobre o desenvolvimento celular, mas sobre o conteúdo total de Se bioacumulado. Em 30  $\mu\text{M}$  de Se, as diferenças entre as espécies de Se emergem com a formação de Se(0) no ensaio com Se(IV), resultando em um maior acúmulo de Se(IV) (41,1%) em comparação com Se(VI) (15,8%). Embora a percentagem média de Se bioacumulado não tenha variado entre as concentrações de Se(VI), uma diferença significativa ocorreu entre concentrações de Se(IV) (variando de 6,1% a 41,1%). A bactéria tolerou a presença de até 20  $\mu\text{M}$  de Hg, mas com efeito sobre a viabilidade celular. Na coexposição com Se e Hg, o Se não causou efeito protetivo a toxicidade do Hg e um efeito tóxico aditivo foi observado na concentração de 30  $\mu\text{M}$  de Se. Em comparação à exposição individual ao Se, o Hg mostrou um efeito dose-dependente significativo na bioacumulação de Se por *E. coli*. Em geral, enquanto na coexposição com 3,0  $\mu\text{M}$  de Se houve o aumento da bioacumulação de Se, com 30  $\mu\text{M}$  de Se a diminuição da bioacumulação de Se e a supressão da formação de Se(0) corroboraram o efeito tóxico desta combinação. A ordem de coexposição de Se e Hg não causou efeito sobre o acúmulo de Se. O método otimizado para quantificação de Se por GF AAS mostrou-se sensível e com elevada exatidão para esta análise quando comparada à técnica de ICP-MS. Estes resultados revelam a influência das espécies e concentrações de Se nos efeitos interativos entre Se e Hg e na bioacumulação de Se por *E. coli*.

**Palavras-chave:** selênio; mercúrio; *Escherichia coli*; bioacumulação; GF AAS.

## ABSTRACT

The interaction between selenium (Se) and mercury (Hg) is complex and may be related to the underlying effects of species, concentration, and order of administration. The aim of this study was to assess the interactive effects between Se and Hg on cell growth and Se bioaccumulation in *Escherichia coli* (*E. coli*), capable of reducing and accumulating Se. Experiments with *E. coli* ATCC 11775 were conducted through exposure to Se(IV) or Se(VI) at low concentration levels, 0.3, 3.0, and 30  $\mu\text{M}$  individually or in co-exposure with 15  $\mu\text{M}$  of Hg(II), in pre-treatment and post-treatment. *E. coli* resistance to Hg was also evaluated. Cell growth assessment was performed using the colony-forming unit (CFU) counting method, and Se quantification was carried out using GF AAS. The influence of Hg and Se species and concentrations was determined by analysis of variance (ANOVA). Results showed that Se had no effect on cell growth but on the total Se bioaccumulated content. At 30  $\mu\text{M}$ , differences between Se species emerge with the formation of Se(0) in the Se(IV) assay, leading to higher Se(IV) accumulation (41.1%) compared to Se(VI) (15.8%). Although the average percentage of Se bioaccumulated did not vary between Se(VI) concentrations, there was a significant difference between Se(IV) concentrations (ranging from 6.1% to 41.1%). Hg was well tolerated by *E. coli* up to 20  $\mu\text{M}$ , despite decreasing cell viability. In co-exposure, Se showed no protective effect against Hg toxicity; in fact, an additive toxic effect was observed at the 30  $\mu\text{M}$  concentration. Compared to individual Se exposure, Hg exhibited a significant dose-dependent effect on Se bioaccumulation by *E. coli*. While in co-exposure with 3.0  $\mu\text{M}$ , there was an increase in Se bioaccumulation, with 30  $\mu\text{M}$ , there was a decrease in Se bioaccumulation and suppression of Se(0) formation corroborating the toxic effect of this combination. The order of Se and Hg co-exposure had no effect on Se accumulation. The method for Se quantification by GF AAS proved to be sensitive and highly accurate for this analysis compared to ICP-MS technique. These results reveal the influence of Se species and concentration on the interactive effects between Se and Hg and Se bioaccumulation in *E. coli*.

**Keywords:** selenium; mercury; *Escherichia coli*; bioaccumulation; GF AA.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Metabolismo de Se em *E. coli*. Retirado de: Turner, R. J.; Weiner, J. H.; e Taylor, D. E. *BioMetals*, (11), 1998, pg. 224<sup>63</sup>..... 12
- Figura 2.** Procolo experimental de preparo dos ensaios de interação, controle, soluções controle de Se e branco de um experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se..... 35
- Figura 3.** Procedimentos de (a) avaliação da viabilidade celular e (b) separação das amostras e lavagem da biomassa, realizados com os ensaios de interação e controle após a exposição. .... 37
- Figura 4.** Curva de temperatura de pirólise (a) e de atomização (b) a partir de uma solução analítica de 100 µg L<sup>-1</sup> Se (2 ng) preparada em (■) água e em (•) LB 3,75 g L<sup>-1</sup>. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n = 2). Condições experimentais: Ta fixa em 1900 °C; Tp fixa em 1200 °C; 10 µg Pd + 6 µg Mg como modificador químico..... 46
- Figura 5.** Efeito da massa de modificador químico Pd:Mg (µg) a partir de uma solução padrão de 100 µg L<sup>-1</sup> Se (2 ng) preparada em (■) água e em (•) LB 3,75 g L<sup>-1</sup>. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n = 2). Condições experimentais: Tp 1200 °C e Ta 1850 °C. .... 47
- Figura 6.** Perfil de absorvância de Se, sinal analítico (–) e sinal de fundo (–), obtido a partir de uma solução padrão de 100 µg L<sup>-1</sup> (2 ng) de Se total em água, Se total em LB (3,75 g L<sup>-1</sup>), Se(IV) em LB (3,75 g L<sup>-1</sup>) e Se(VI) em LB (3,75 g L<sup>-1</sup>). Condições experimentais: Tp de 1200 °C, Ta de 1850 °C e 10 µg de Pd + 6 µg de Mg. .... 48
- Figura 7.** Crescimento celular de *E. coli*. Os valores representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes, n = 4. .... 54
- Figura 8.** Curvas de crescimento celular de *E. coli* exposta a 30, 50, 120 e 500 µM de Se(IV) e no controle. (média ± desvio padrão, n = 2). Imagens inseridas no gráfico correspondem respectivamente ao controle e aos ensaios de interação em ordem crescente de concentração, coletados nos intervalos 0 h (a), 8 h (b) e 24 h (c) da curva de crescimento. .... 56
- Figura 9.** Viabilidade celular média (log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>) de *E. coli* exposta a diferentes concentrações de Se(IV). 0 µM de Se(IV) representa o controle. Os dados são expressos como média ± desvio padrão, n = 9. Asteriscos representam p-

	valores ajustados para os testes de comparações múltiplas de Tukey. *: p-valor $\leq 0.05$ ; **: p-valor $\leq 0.01$ . .....	58
<b>Figura 10.</b>	Curvas de crescimento celular de <i>E. coli</i> no controle e na exposição a 0,3, 3,0 e 30 $\mu\text{M}$ de Se(IV) e Se(VI). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 2.....	62
<b>Figura 11.</b>	Viabilidade celular média de <i>E. coli</i> em diferentes espécies e concentrações de Se. A concentração de 0 $\mu\text{M}$ de Se representa o controle. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, n = 6.....	63
<b>Figura 12.</b>	Percentual médio de Se bioacumulado em diferentes espécies e concentrações de Se. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, n = 9. Asteriscos vermelhos representam p-valores ajustados para os testes de comparações pareadas entre concentrações de Se(IV). Asteriscos pretos representam p-valores ajustados para os testes de comparações pareadas entre o percentual de Se bioacumulado na concentrações de 30 $\mu\text{M}$ de Se. *****: p-valor $\leq 0,0001$ . .....	66
<b>Figura 13.</b>	Curvas de crescimento celular de <i>E. coli</i> no controle e na exposição ao Hg(II) na faixa de concentrações de 15 a 40 $\mu\text{M}$ . Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, n = 2.....	69
<b>Figura 14.</b>	Biomassa do ensaio de 15 $\mu\text{M}$ de Hg: (a) após centrifugação para separar as células do meio de cultivo; (b) após lavagem da biomassa com solução tampão fosfato. ....	72
<b>Figura 15.</b>	Viabilidade média ( $\log_{10}$ CFU) de <i>E. coli</i> sob diferentes espécies de Se (Se(IV) e Se(VI)), concentrações de Se (0, 0,3, 3,0 e 30 $\mu\text{M}$ ), concentrações de Hg (0 e 15 $\mu\text{M}$ ), e ordem de coexposição (pré e pós-tratamento). A concentração de 0 $\mu\text{M}$ representa o controle. Viabilidade média de <i>E. coli</i> (A) para todas as combinações entre os quatro fatores, (B) na interação entre concentração de Hg, ordem de coexposição e espécie de Se (C) na interação entre as concentrações de Se e de Hg. Asteriscos representam p-valores ajustados para os testes de comparações múltiplas de Tukey. *: p-valor $\leq 0,05$ ; **: p-valor $\leq 0,01$ ; ***: p-valor $\leq 0,001$ e *****: p-valor $\leq 0,0001$ .....	75
<b>Figura 16.</b>	Ensaio do experimento de coexposição de células de <i>E. coli</i> ao Se e Hg, nas combinações de Hg com 3,0 e 30 $\mu\text{M}$ de Se(IV) e Se(VI) no pré-tratamento, após (a) centrifugação para separar as células do meio de cultivo e (b) lavagem da biomassa com solução tampão fosfato (PBS). ....	77

**Figura 17.** Valores percentuais médios de Se bioacumulado por células de *E. coli* para cada espécie de Se, Se(IV) e Se(VI), e nível de concentração de Se, 0,3, 3,0 e 30 µM. Asteriscos coloridos representam p-valores ajustados para os testes de Tukey entre concentrações de Se para cada espécie de Se. Asterisco preto representa p-valores ajustados para a comparação do percentual de Se bioacumulado na concentração 30 µM. \*: p-valor ≤ 0,05 e \*\*: p-valor ≤ 0,01. .... 80

**Figura 18.** Valores percentuais médios de Se bioacumulado em diferentes concentrações de Se e tipos de exposição. Asteriscos coloridos representam p-valores ajustados para os testes de comparações múltiplas entre concentrações de Se para cada tipo de exposição. Asteriscos pretos representam p-valores ajustados para a comparação do percentual de Se bioacumulado nas concentrações 3,0 e 30 µM. \*: p-valor ≤ 0,05; \*\*: p-valor ≤ 0,01; \*\*\*: p-valor ≤ 0,001 e \*\*\*\*: p-valor ≤ 0,0001. .... 82

**Figura 19.** Valores percentuais de Se no balanço de massa, (■) Se bioacumulado na biomassa e (■) Se recuperado no sobrenadante, em experimentos de exposição de células de *E. coli* ao Se individualmente (n = 9) e nos pré-tratamento (n = 7) e pós-tratamento (n = 7) da coexposição com Hg. Os dados representam a média ± desvio padrão. .... 86

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Metodologias analíticas para a determinação de Se total aplicadas em estudos de avaliação da bioacumulação de Se por bactérias e remoção de Se do meio de cultivo.....	25
<b>Tabela 2.</b> Programa de temperatura para determinação de Se por GF AAS. ....	39
<b>Tabela 3.</b> Programa de ciclos de sonicação utilizado no método de preparo de amostras. ....	40
<b>Tabela 4.</b> Condições operacionais usadas para a determinação de Se por ICP-MS. ....	40
<b>Tabela 5.</b> Figuras de mérito para a determinação de Se por GF AAS. ....	50
<b>Tabela 6.</b> Precisão do método para a quantificação de Se na biomassa bacteriana por GF AAS, em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Os valores representam a média de Se bioacumulado (%) juntamente com o desvio padrão relativo (RSD, %) para cada combinação de espécie e concentração de Se..	51
<b>Tabela 7.</b> Exatidão do método analítico para a quantificação de Se na biomassa bacteriana por GF AAS comparado à técnica analítica de referência, ICP-MS, avaliada por análise de variância. Os valores representam o percentual médio de Se bioacumulado (%) $\pm$ desvio padrão para cada combinação de espécie e concentração de Se. ....	52
<b>Tabela 8.</b> Valores percentuais de Se recuperado nas soluções controle de Se(IV) e Se(VI) nos experimentos de exposição individual ou combinado com Hg(II). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão para cada combinação de espécie e concentração de Se.....	53
<b>Tabela 9.</b> Valores percentuais de Se bioacumulado por células de <i>E. coli</i> após exposição ao Se(IV) e Se(VI). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de um experimento, n = 2. ....	55
<b>Tabela 10.</b> Valores percentuais de Se recuperado na solução controle, no sobrenadante e bioacumulado após exposição de células de <i>E. coli</i> ao Se(IV). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes.	59
<b>Tabela 11.</b> Valores percentuais de Se bioacumulado em células de <i>E. coli</i> após exposição ao Se. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, n = 9. ....	65

**Tabela 12.** Valores percentuais de Se bioacumulado em células de *E. coli* após coexposição ao Se e Hg. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes, n = 7. .... 79

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**AAS:** Espectrometria de absorção atômica, do inglês “Atomic Absorption Spectrometry”.

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**AOAC:** Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês “Association of Official Analytical Chemists”.

**ATCC:** Coleção Americana de Culturas, do inglês “American Type Culture Collection”.

**CFU:** Unidade formadora de colônia, do inglês “Colony Forming Unit”.

**DMDSe:** Disseleneto de dimetila.

**DMSe:** Seleneto de dimetila.

**FAO:** Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês “Food and Agriculture Organization”.

**GF AAS:** Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês “Furnace Grafite Atomic Absorption Spectrometry”.

**H<sub>2</sub>Se:** Seleneto de hidrogênio.

**Hg:** Mercúrio

**Hg(II):** Íon mercúrico.

**ICP-MS:** Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”.

**LB:** Meio de cultura Luria Bertani.

**LOD:** Limite de detecção, do inglês “Limit of Quantification”.

**LOQ:** Limite de quantificação, do inglês “Limit of Detectation”.

**m<sub>0</sub>:** Massa característica.

**MeHg:** Metilmercúrio.

**mer:** Operon de resistência ao mercúrio.

**merA:** Gene que codifica a mercúrio-redutase.

**OD:** Densidade óptica, do inglês “Optical Density”.

**OD<sub>600nm</sub>:** Densidade óptica a 600 nm.

**PBS:** Tampão fosfato salino.

**RFC:** Força Centrífuga Relativa

**rpm:** Rotação por minuto.

**RSD:** Desvio padrão relativo

**sd:** desvio padrão

**Se:** Selênio.

**Se(0):** Selênio elementar.

**Se(II-):** Seleneto.

**Se(IV):** Selenito.

**Se(VI):** Selenato.

**SeCys:** Selenocisteína.

**SeMeth:** Selenometionina.

**SeNPs:** Nanopartículas de selênio.

**WHO:** Organização Mundial da Saúde, do inglês "World Health Organization".

## Sumário

1. Introdução .....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Selênio .....	4
2.1.1 A importância do Se para a saúde.....	5
2.1.2 A relação do Se com o meio ambiente .....	7
2.2. Bactérias Se-redutoras.....	9
2.3. Metabolismo de Se em <i>E. coli</i> .....	11
2.4. Bioacumulação de Se por bactérias.....	15
2.5. Interação entre Se e Hg.....	19
2.6. Determinação de Se total em culturas bacterianas .....	23
3. Objetivos .....	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos .....	30
4. Material e métodos.....	31
4.1 Instrumentação .....	31
4.2 Reagentes e soluções .....	32
4.3 Descontaminação e esterilização do material.....	33
4.4 Protocolo experimental de exposição de células de <i>E. coli</i> .....	33
4.4.1 Cultivo de <i>E. coli</i> .....	33
4.4.2 Experimentos de exposição de células de <i>E. coli</i> .....	34
4.4.3 Coleta, tratamento e preparo de amostras .....	36
4.5 Teste de viabilidade celular .....	37
4.6 Curva de crescimento celular .....	38
4.7. Determinação de Se por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite.....	38
4.8. Determinação de Se por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado .....	39
4.9. Cálculos de recuperação de Se .....	41
4.10. Figuras de mérito .....	41
4.11. Análise estatística .....	43
5. Resultados e discussão .....	44

<b>5.1. Otimização do programa de temperatura para a determinação de Se por GF AAS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2. Avaliação de desempenho do método analítico para a determinação de Se por GF AAS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3. Bioacumulação de Se por <i>E. coli</i> .....</b>	<b>53</b>
5.3.1 <i>Experimento de exposição de células de E. coli ao Se: estudo preliminar A .....</i>	53
5.3.2 <i>Experimento de exposição de células de E. coli ao Se: estudo preliminar B .....</i>	55
5.3.3 <i>Experimento de exposição de células de E. coli ao Se .....</i>	61
<b>5.4. Bioacumulação de Se por <i>E. coli</i> na presença de Hg.....</b>	<b>68</b>
5.4.1 <i>Experimento de exposição de células de E. coli ao Hg.....</i>	68
5.4.2 <i>Experimentos de coexposição de células de E. coli ao Se e Hg.....</i>	73
<b>5.5. Balanço de massa de Se.....</b>	<b>85</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>110</b>

## 1. Introdução

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para muitos organismos vivos, incluindo os humanos. O Se desempenha um papel crucial nas selenoproteínas, que são vitais para vários processos biológicos nos organismos, atuando nos sistemas de defesa antioxidante, contribuindo para a mitigação do estresse oxidativo. Contudo, tanto a deficiência quanto o excesso nutricional deste elemento podem causar complicações à saúde dos indivíduos.

No ambiente, por fonte antropogênica ou natural, o Se ocorre em quatro estados de oxidação comuns: seleneto [Se(-II)], selênio elementar [Se(0)], selenito [Se(IV)] e selenato [Se(VI)]. As espécies de Se com estados de oxidação mais elevados (VI ou IV) apresentam maior mobilidade em ecossistemas aquáticos e são mais tóxicas do que o Se elementar, uma forma insolúvel.

As características do Se, como mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade, são reguladas por transformações redox. Em sistemas naturais, essas transformações podem ocorrer por processos abióticos, mas são majoritariamente resultado de processos bióticos, que envolvem microrganismos. As bactérias, microrganismos amplamente distribuídos no ambiente, desempenham um papel significativo nessas transformações e, conseqüentemente, no ciclo biogeoquímico do Se.

Diversas bactérias, incluindo *Escherichia coli*, metabolizam Se. *E. coli* é um exemplo bem estudado de bactéria Se-redutora, capaz de reduzir tanto Se(IV) quanto Se(VI) por via assimilatória, para incorporar o Se às selenoproteínas. No entanto, essa via metabólica também revela os efeitos tóxicos do Se em *E. coli*, onde as formas tóxicas Se(VI) e Se(IV) são reduzidas a Se(0), insolúvel, em um mecanismo de desintoxicação. Além de reduzir a toxicidade e a carga ambiental dos compostos de Se presentes nos ecossistemas, esse mecanismo mostra-se essencial para a saúde dos ecossistemas.

A capacidade bacteriana de desintoxicação de Se tem sido investigada em estudos de bioacumulação desse elemento, visando avaliar a capacidade das bactérias de produzir e acumular Se na forma de Se(0). Esse mecanismo tem sido explorado no campo emergente das aplicações biotecnológicas, representando uma estratégia promissora para a produção sustentável de nanopartículas de Se e para a biorremediação de áreas contaminadas.

Outro aspecto importante a considerar em relação ao Se é sua capacidade de atenuar os efeitos adversos da toxicidade do mercúrio (Hg) em organismos. Essa interação tem sido objeto de estudo há mais de cinco décadas, desde a pesquisa pioneira de Pařízek e Ošťádalová (1967), que demonstrou a eficácia do Se na proteção contra a toxicidade do Hg em ratos. O Hg, um poluente ambiental globalmente reconhecido, existe nas formas orgânica e inorgânica e é incapaz de desempenhar qualquer função biológica benéfica, sendo considerado exclusivamente tóxico tanto para a saúde humana quanto para os ecossistemas.

No ambiente, as bactérias desempenham um papel crucial no ciclo do Hg, intermediando a transformação de compostos de Hg por meio de reações de oxidação, redução, metilação e desmetilação, o que influencia significativamente a especiação e distribuição do Hg em sistemas naturais.

A exposição ao Hg apresenta riscos significativos à saúde, especialmente por meio do consumo de peixes contaminados, onde o Hg tende a se acumular. Entretanto, estudos revelaram que o Se se acumulava junto ao Hg em certas espécies de peixes e que as correlações entre as suas concentrações eram negativas, indicando que o Se potencialmente atua como um antagonista natural contra a toxicidade do Hg.

Existe uma vasta literatura que destaca as interações entre Se e Hg, e o antagonismo tornou-se um dos exemplos mais proeminentes desta interação. Ao estudar o antagonismo, os esforços têm sido voltados à avaliação dos efeitos protetores do Se contra a toxicidade do Hg investigando a influência de diferentes espécies e concentrações de Se sobre o acúmulo de Hg. Contudo, devido à diversidade de modelos em estudo, animais, plantas e microrganismos, e à variedade de combinações de espécies e concentrações de Se e Hg, a coexposição pode levar à redução, aumento ou não ter efeito sobre a toxicidade, indicando que os mecanismos de interação variam com as condições experimentais, mostrando a complexidade desta interação.

Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo sistemático para avaliar, além da capacidade de *E. coli* ATCC 11775 de acumular Se, o potencial efeito que diferentes espécies e concentrações de Se exercem no crescimento celular e na bioacumulação de Se por *E. coli*. Além disso, a resistência bacteriana ao Hg e os efeitos interativos entre Se e Hg em culturas de *E. coli* também foram avaliados. *E. coli* é uma escolha apropriada para este estudo por ser uma bactéria Se-redutora e, especialmente pela linhagem ATCC 11775 selecionada ser deficiente em genes que metabolizam Hg, permitindo uma análise específica da metabolização do Se. Para a realização deste estudo, um protocolo

experimental para a exposição de células foi desenvolvido e um método analítico usando a técnica de Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) para determinar Se em biomassa bacteriana e em sobrenadante de meio de cultivo foi otimizado.

## 2. Revisão bibliográfica

Esta revisão inicia abordando aspectos relacionados à importância do selênio (Se), tanto para a saúde humana quanto relativos ao ambiente. Em seguida, uma revisão sobre as bactérias Se-redutoras e o metabolismo de Se em *E. coli* fundamentará a discussão sobre a bioacumulação de Se por bactérias. Além disso, no tópico sobre a interação entre Se e Hg, serão abordados os aspectos relativos à toxicidade do Hg, resistência bacteriana ao Hg, antagonismo do Se e os efeitos interativos entre Se e Hg em bactérias. Por fim, serão apresentados aspectos práticos referentes às metodologias analíticas já descritas para a determinação de Se em células bacterianas e meios de cultivo.

### 2.1. Selênio

O elemento selênio (Se), um não metal (metaloide), foi descoberto pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius em 1817 e foi incorporado à tabela periódica junto com oxigênio, enxofre, telúrio e polônio, membros do grupo 16. Embora o enxofre e o selênio compartilhem algumas propriedades físicas e químicas semelhantes<sup>1</sup>, em sistemas biológicos a química redox do Se permite que este elemento desempenhe um papel crítico que o enxofre não consegue realizar<sup>2,3</sup>, sendo o Se o único elemento especificado no código genético<sup>4</sup>.

O Se, 30º metaloide de ocorrência natural mais abundante na crosta terrestre, existe nos estados de oxidação -II, 0, IV e VI, nas formas inorgânica e orgânica, e em 6 isótopos estáveis: Se<sup>74</sup>, Se<sup>76</sup>, Se<sup>77</sup>, Se<sup>78</sup>, Se<sup>80</sup> e Se<sup>82</sup>. As espécies mais oxidadas, selenato [Se(VI)] e selenito [Se(IV)] são solúveis, móveis, biodisponíveis e bioacumuláveis, mas potencialmente tóxicas aos sistemas biológicos em relativamente baixas concentrações<sup>5</sup>. O Se(VI) é a forma predominante em sistemas aquáticos, enquanto o Se(IV) é a forma mais comum em águas residuais. Em contraste, o Se elementar [Se(0)], é insolúvel em água, considerado não tóxico e pode existir em 11 formas alotrópicas diferentes, a exemplo da forma amorfa de cor vermelha<sup>6</sup>. A espécie mais reduzida seleneto [Se(-II)], está presente em compostos orgânicos como a selenocisteína (SeCys), compostos metilados voláteis como o seleneto de dimetila (DMSe) e em compostos inorgânicos, como o seleneto de hidrogênio (H<sub>2</sub>Se), altamente tóxico e reativo<sup>7,8</sup>.

A extração de Se da natureza não é uma atividade economicamente viável, sendo sua maior parte obtida como subproduto do processo de refinamento eletrolítico do cobre<sup>6</sup>, o que contrasta com sua grande importância comercial.

O Se e seus compostos são altamente atrativos para diversos segmentos industriais devido às suas propriedades, incluindo aquelas fotoelétricas e semicondutoras. O elemento faz parte de dispositivos fotográficos, retificadores de corrente, fotocélulas e fotocopiadoras. Além disso, o Se é utilizado na composição de tintas, vidros, cerâmicas, pigmentos, borrachas vulcanizadas e ligas de alta resistência, entre outros<sup>6</sup>.

De acordo com a Selenium-Tellurium Development Association (STDA), 10% da demanda total de Se está relacionada a sua essencialidade para a vida. O Se é usado na nutrição animal, em preparações veterinárias para prevenir e tratar doenças, e em fertilizantes químicos para corrigir deficiências do solo. Na medicina, compostos de Se estão presentes em medicamentos de uso tópico e como suplementos dietéticos para o controle de certas doenças<sup>9</sup>.

Avanços recentes indicam que o Se tem potencial para melhorar a vida humana de diversas maneiras, incluindo seu uso em células solares mais eficientes<sup>10</sup>, em revestimentos de nanoclusters em aplicações ortopédicas<sup>11</sup> e como “detector de Se amorfo” em instrumentos mamográficos<sup>12</sup>.

### *2.1.1A importância do Se para a saúde*

A necessidade de Se para a vida e o seu papel benéfico para a saúde humana são conhecidos há várias décadas. Contudo, entre a descoberta do Se (em 1817) e seu reconhecimento como micronutriente essencial se passaram cento e quarenta anos. Foi em 1954 que Pinsent<sup>13</sup> relatou que o Se era essencial para a expressão de uma atividade enzimática específica em *E. coli*. Logo após, em 1957, Schwarz e Foltz<sup>14</sup> forneceram a primeira evidência experimental de que o Se era essencial para a saúde de animais.

Estudos detalhados sobre os papéis bioquímicos específicos do Se explicaram que sua essencialidade se deve à presença na glutathione peroxidase (GPx), uma selenoproteína com função antioxidante<sup>15,16</sup>. Atualmente, foram identificadas 25 selenoproteínas elaboradas pelo organismo humano, todas contendo Se na forma do aminoácido selenocisteína (SeCys), o 21º aminoácido<sup>4,17</sup>. Muitas dessas proteínas desempenham funções antioxidante ou são componentes essenciais de diversas vias metabólicas, incluindo o transporte de Se (selenoproteína P), manutenção do status redox intracelular (tioredoxina redutases) e a produção de hormônios tireoidianos (iodotironina

desiodinases)<sup>18,19</sup>. Assim, o papel do Se como micronutriente essencial é mediado basicamente por sua incorporação em selenoproteínas e, em doses adequadas, contribui para o bom funcionamento da saúde, trazendo benefícios importantes como a prevenção de certos tipos de câncer e proteção contra doenças cardiovasculares, autoimunes, neurodegenerativas, diabetes tipo 2, infertilidade e viroses, incluindo o HIV<sup>18-20</sup>.

A essencialidade do Se para a manutenção da vida também foi evidenciada pela alta incidência de doenças como a cardiomiopatia de Keshan e a osteoartropatia de Kashin-Beck, as quais foram correlacionadas a áreas com deficiência endêmica de Se. Isso revela a ligação crítica entre a deficiência do elemento e a manifestação das doenças<sup>21</sup>.

No entanto, a história do Se na biologia foi inicialmente marcada por sua toxicidade, o que gerou uma discussão por um contraste entre seus efeitos benéficos e tóxicos ao longo do último século. Em 1934, a primeira demonstração experimental da toxicidade do Se foi realizada por Franke, que correlacionou a ocorrência de um distúrbio fatal em rebanhos ovinos e bovinos como os altos níveis de Se nas culturas forrageiras em regiões dos Estados Unidos<sup>22</sup>.

Embora a intoxicação por Se, ou selenose, seja rara em humanos, casos bem documentados de selenose crônica endêmica na China, causada pela ingestão de alimentos com alta concentração de Se, descreveram uma condição caracterizada por efeitos nocivos, incluindo deformidades nas unhas, lesões na pele, e danos permanentes ao sistema nervoso<sup>23</sup>. A exposição por inalação a compostos de Se, como o altamente tóxico seleneto de hidrogênio (H<sub>2</sub>Se), resulta principalmente em efeitos respiratórios, tais como espasmos brônquicos e pneumonia química e, possivelmente, efeitos cardiovasculares<sup>24</sup>.

O mecanismo da toxicidade do Se pode estar associado à geração de espécies de radicais livres que induzem danos ao DNA e à sua reatividade com tióis que afeta a integridade de proteínas de reparo do DNA<sup>24,25</sup>. Este efeitos estão relacionados ao aumento do risco de alguns tipos de câncer<sup>26</sup>, diabetes tipo II<sup>27</sup> e esclerose lateral amiotrófica<sup>28</sup>.

A exposição nutricional é a via dominante de absorção de Se pelos seres humanos. A ocorrência de Se em qualquer fonte alimentar é consequência de sua concentração no solo, a qual varia significativamente em nível global<sup>6,29</sup>. Por conta disto, a quantidade de Se ingerida varia em todo o mundo, de 7,0 até 4.990 µg de Se por dia. Consequentemente, as recomendações de ingestão diária de Se variam de acordo com a localização geográfica

e os hábitos alimentares da população<sup>30,31</sup>. Nos Estados Unidos, por exemplo, o FDA recomenda a ingestão diária de 55 µg de Se para indivíduos adultos<sup>32</sup>, enquanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>33</sup> brasileira propõe a ingestão diária de 37 µg desse micronutriente. Entretanto, ponderando o risco-benefício do Se à saúde, a World Health Organization (WHO)<sup>34</sup> estabeleceu limite de ingestão máximo tolerável de 400 µg de Se por dia para indivíduos adultos, para garantir uma faixa segura de ingestão diária de Se. Contudo, há evidências recentes de que a administração a longo prazo de apenas 200 µg de Se por dia está associada ao aumento da incidência de diabetes tipo II<sup>27</sup>.

Embora a água potável não seja considerada uma fonte nutricional de Se, as diretrizes para a qualidade da água potável estabelecida pela WHO recomendam a concentração de 40 µg L<sup>-1</sup> de Se como limite máximo permitido<sup>35</sup>, enquanto o limite de 10 µg L<sup>-1</sup> foi estabelecido em países, incluindo Brasil, Canadá, Austrália, Japão e EUA<sup>36</sup>. Contudo, resultados de estudos recentes sobre a toxicidade de baixos níveis de Se(VI), demonstraram que o Se, mesmo abaixo dos limites atuais, pode oferecer riscos para a saúde e, por isso, a questão da toxicidade do Se tem atraído o debate para a redução do limite seguro em água potável para 1,0 µg L<sup>-1</sup> de Se<sup>5</sup>.

Portanto, o estreito intervalo entre a dose diária recomendada e o limite máximo tolerável evidencia a dualidade do Se entre sua essencialidade e toxicidade e a importância de estabelecer níveis seguros de exposição às diferentes espécies deste elemento e suas interações.

### *2.1.2A relação do Se com o meio ambiente*

O Se é liberado no meio ambiente por fontes naturais e antropogênicas. Na crosta terrestre, o Se está presente em concentrações que variam entre 0,05 a 0,5 mg kg<sup>-1</sup><sup>37</sup>. Estima-se que 40% do conteúdo total de Se da crosta terrestre é proveniente das rochas<sup>38</sup>. Além de naturalmente presente, diversas atividades antropogênicas, incluindo a agrícola, industrial e mineração, representam cerca de 40% das emissões totais de Se para os ambientes atmosférico e aquático<sup>39-41</sup>.

Processos biogeoquímicos, incluindo intemperismo de rochas, interações rocha-água, atividade vulcânica e a atividade biológica, somados às fontes de emissões antropogênicas, controlam as transformações dos compostos de Se, a transferência do Se entre as matrizes ambientais (onde é assimilado por plantas, animais e humanos através da cadeia alimentar) e governam a distribuição desigual do Se no mundo<sup>29,42</sup>.

Na atmosfera, o Se está presente em baixas concentrações, variando entre 1,0 a 10,0 ng m<sup>-3</sup>, na forma de compostos orgânicos voláteis (DMSe, DMDSe e metanoselenol), compostos inorgânicos voláteis (seleneto de hidrogênio e dióxido de selênio) e Se elementar associado a cinzas ou partículas<sup>6,39</sup>. Cerca de 50-65% das emissões de Se para a atmosfera são provenientes de processos naturais<sup>6,42</sup>.

Na maioria dos solos, o conteúdo médio de Se varia de 0,01 a 2,0 mg kg<sup>-1</sup>, sendo a média mundial de 0,4 mg kg<sup>-1</sup>, podendo atingir concentrações tão altas quanto 1.200 mg kg<sup>-1</sup> em diversas partes do mundo<sup>43</sup>. A depender da concentração, os solos podem ser considerados seleníferos, em concentrações superiores a 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de Se, ou deficientes, em concentrações inferiores a 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de Se<sup>44</sup>.

O teor de Se no solo juntamente com as características físico-químicas do solo (estado redox e pH) e a atividade microbiológica influenciam a assimilação deste micronutriente pelas plantas<sup>45</sup>. Conseqüentemente, o teor de Se pode variar, entre 10 µg kg<sup>-1</sup> a 6,0 mg kg<sup>-1</sup>, em fontes alimentares de origem vegetal, incluindo grãos, cereais, legumes e castanhas<sup>6</sup>. O Se(VI) é a forma de Se mais facilmente absorvida pelas plantas, cerca de dez vezes mais do que o Se(IV), porém a principal forma de Se obtida de vegetais é a selenometionina<sup>45</sup>, em contraste, Se(IV) e Se(VI) são as formas usuais em suplementos alimentares<sup>6</sup>.

Em sistemas aquáticos o Se é encontrado em concentrações que variam de µg L<sup>-1</sup> a mg L<sup>-1</sup>, predominantemente na forma de Se(VI)<sup>5,46</sup>. A concentração média mundial de Se em águas superficiais é de 0,02 µg L<sup>-1</sup> e inferior a 0,08 µg L<sup>-1</sup> em água do mar<sup>43</sup>. Em águas subterrâneas os níveis podem variar de 0,1 a 6.000 µg L<sup>-1</sup> de Se, mas raramente atingem ou excedem 1,0 µg L<sup>-1</sup> de Se<sup>46</sup>, enquanto águas contaminadas podem atingir níveis tão altos quanto 33 mg L<sup>-1</sup> de Se<sup>25</sup>.

O estado de oxidação do Se é o principal determinante das características dos seus compostos inorgânicos no meio ambiente. Toxicidade, atividade biológica, mobilidade, biodisponibilidade e bioacumulação aumentam na sequência: Se(0) < Se(VI) < Se(IV) < Se(II)<sup>5,43</sup>. O Se orgânico dissolvido, na forma de aminoácidos e proteínas, também pode ser bioacumulado e tóxico para os peixes e outros animais<sup>47</sup>.

Embora o Se possa causar toxicidade aguda em altas concentrações, o efeito mais deletério sobre os organismos aquáticos é devido às suas propriedades bioacumulativas. Os organismos em ambientes aquáticos expostos ao Se acumulam-no principalmente através da dieta e não diretamente através da água<sup>48</sup>.

No ambiente aquático, uma concentração de  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se é capaz de causar efeitos deletérios em peixes do topo da cadeia alimentar devido ao fator de bioacumulação em tecidos que pode ser de até 2.000 vezes a concentração de Se na água<sup>37</sup>. Investigações sobre as causas da morte de peixes concluíram que o Se expressa a sua toxicidade em animais principalmente através da cadeia alimentar<sup>47,49</sup>.

Baseado em estudos sobre os efeitos deletérios do Se sobre os organismos aquáticos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA), criou um critério de medida de risco ecotoxicológico do Se para a proteção da vida aquática, o qual prevê um limite de concentração de Se total em tecido de peixe entre 8,5 a 11,3 mg kg<sup>-1</sup> de peso seco e de 1,5 a 3,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  na coluna de água<sup>50</sup>.

Somados, os efeitos das fontes de emissões difusas, a estreita margem de segurança entre essencialidade e toxicidade e propensão para biomagnificação, o Se tem sido cada vez mais reconhecido como um contaminante global com potencial risco ecológico e humano, perdendo apenas para o mercúrio<sup>51</sup>.

## **2.2. Bactérias Se-redutoras**

O Se é um micronutriente essencial do qual os seus compostos são prontamente metabolizados pelos organismos dos três domínios da vida<sup>52</sup>. Consequentemente, o metabolismo do Se é ambientalmente onipresente, expandindo a diversidade metabólica dos sistemas biológicos, o que contribui significativamente para as suas biotransformações no ciclo biogeoquímico global<sup>52-55</sup>.

Nestes ciclos, o Se circula ativamente entre ambientes óxicos e anóxicos e os microrganismos amplamente distribuídos no domínio Bacteria<sup>52,56,57</sup> são os agentes responsáveis por transformar os compostos de Se através de uma série de reações metabólicas, que incluem reações de redução, oxidação, metilação e desmetilação que, por sua vez, envolvem conversões entre espécies Se(VI), Se(IV), Se(0) e Se(II-)<sup>53,55,57,58</sup>. Assim, a especiação de Se nos sistemas naturais é fortemente dependente da atividade microbiana<sup>59</sup>.

Embora seja possível uma bactéria metabolizar Se realizando todos os tipos de reações, normalmente a maioria das bactérias realiza um ou dois destes processos. Enquanto as reações de oxidação e desmetilação são frequentemente desconsideradas devido às baixas taxas em que ocorrem<sup>57</sup>, as reações de redução são altamente ativas e predominantes entre muitos isolados bacterianos<sup>53,56,57,60,61</sup>.

As bactérias que reduzem Se, bactérias Se-redutoras, são filogeneticamente diversas e metabolicamente versáteis. Os mecanismos de redução são distintos entre bactérias filogeneticamente diferentes. As reações metabólicas de redução de Se mediadas por bactérias Se-redutoras podem ocorrer sob condições aeróbicas e anaeróbicas e por via dissimilatória ou assimilatórias<sup>56</sup>.

A redução dissimilatória é mediada por bactérias Se-redutoras que são respiradoras de Se (Se-respiring bacteria)<sup>52,54,56,60</sup>. Estas bactérias, amplamente distribuídas na natureza, utilizam o Se como um receptor terminal de elétrons na respiração anaeróbia, reduzindo-o a Se elementar, Se(0). Há bactérias que utilizam Se(VI), selenato-respiradoras, e as que utilizam Se(IV), selenito-respiradoras. A redução dissimilatória do Se(VI) é generalizada em ambientes naturais, onde as bactérias selenato-respiradoras são onipresentes e de natureza metabolicamente ativa<sup>52,55,56</sup>. Qualquer uma entre as enzimas capazes de catalisar a redução de Se(VI) a Se(0), nitrato redutase ligada à membrana, nitrato redutase periplasmática e selenato redutase respiratória, pode estar envolvida na respiração do Se(VI), sendo a selenato redutase a enzima específica para esta redução<sup>56</sup>.

Embora a redução do Se(IV) para Se(0) também ocorra na natureza, até o momento, o número de bactérias selenito-respiradoras identificadas é muito reduzido e os mecanismos de redução dissimilatória do Se(IV) são pouco conhecidos<sup>56</sup>. Além disso, nenhuma enzima selenito redutase respiratória foi relatada<sup>59</sup>.

Portanto, a redução dissimilatória de Se(VI) para Se elementar, representa a transformação de uma espécie de Se móvel e tóxica em uma espécie insolúvel e menos tóxica e, conseqüentemente, exerce um processo ambiental significativamente positivo na imobilização de Se no ambiente<sup>52,57,60</sup>.

A redução assimilatória de Se, como Se(IV) e Se(VI), está diretamente relacionada a sua atividade bioquímica como um micronutriente essencial, visto que a redução do Se resulta na sua incorporação em selenoproteínas<sup>53,62-64</sup>. Entretanto, o Se pode ser tóxico para as células, mesmo em concentrações relativamente baixas, e uma via adicional de redução, paralela à via de assimilação em selenoproteínas, resulta em um processo de desintoxicação de Se, mediante a redução de Se tóxico para Se elementar, menos tóxico<sup>63</sup>.

Além de Se elementar, algumas bactérias como *E. coli* são capazes de transformar Se em compostos metilados voláteis de Se, como DMSe e DMDS<sub>2</sub>, através da redução assimilatória de Se<sup>65,66</sup>. Apesar das limitações e das baixas taxas de conversão, a remoção

de Se na forma de espécies metiladas voláteis representa um processo importante de desintoxicação de Se, visto que as formas DMSe e DMDSe são de 500 a 700 vezes menos tóxicas que as formas oxidadas<sup>67</sup>. Contudo, a metilação bacteriana de Se com significativa transferência de Se de ambientes aquáticos e terrestres para a atmosfera é realizada, principalmente, por bactérias sulfato-redutoras<sup>68</sup>.

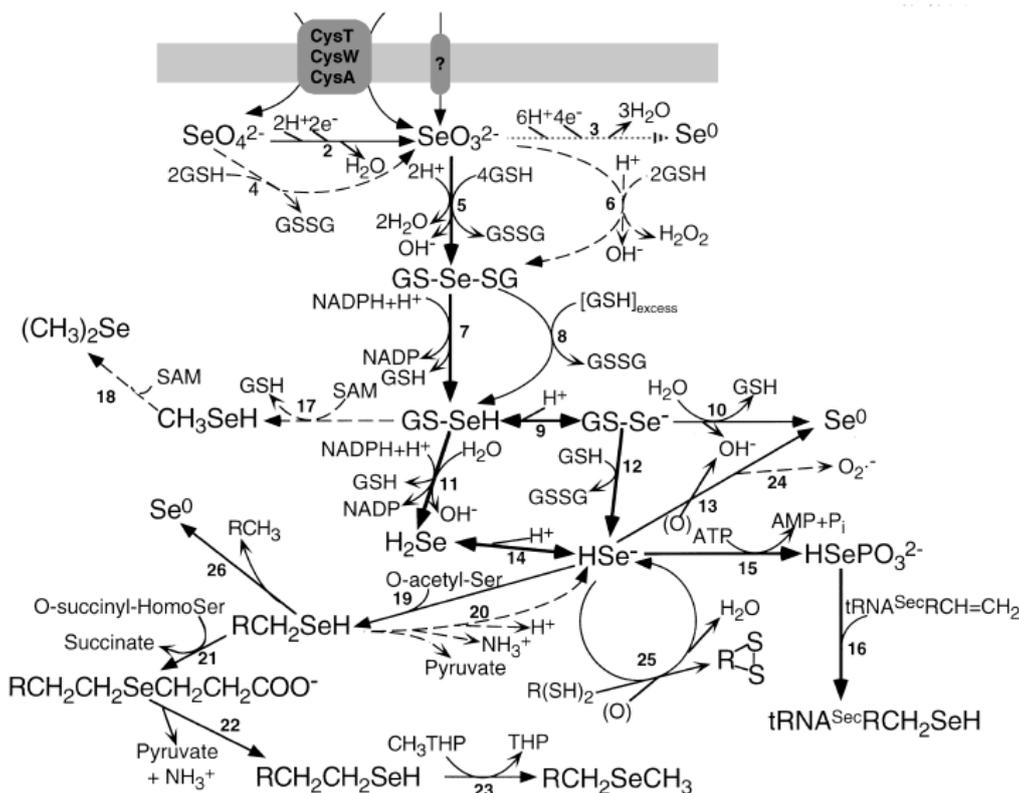
Na redução assimilatória, mediante o processo de desintoxicação de Se, as bactérias Se-redutoras conseguem tolerar níveis tóxicos de Se<sup>60</sup>. *E. coli*, por exemplo, é capaz de crescer na presença de 40 mM (3,2 g L<sup>-1</sup>) de Se(VI) e 20 mM (1,6 g L<sup>-1</sup>) de Se(IV)<sup>63</sup>. Além disso, estes dados ajudam a demonstrar a diferença de toxicidade entre estas espécies de Se, visto que o Se(IV) é 2 vezes menos tolerado, e portanto mais tóxico, do que o Se(VI), o que também é corroborado pelas observações de que no ambiente Se(IV) induz o processo de desintoxicação mais ativamente do que o Se(VI)<sup>69</sup>.

Em síntese, as bactérias Se-redutoras responsáveis pela redução de Se(VI) e Se(IV) a Se elementar no ambiente, devido aos diferentes processos metabólicos, podem ser divididas basicamente entre aquelas que respiram Se(VI) e aquelas que desintoxicam Se(IV). Os processos metabólicos envolvidos na redução assimilatória de Se serão melhor abordados no tópico seguinte, com ênfase no metabolismo de Se em *E. coli*.

### **2.3. Metabolismo de Se em *E. coli***

*E. coli* é um exemplo bem estudado de bactéria Se-redutora capaz de reduzir ambas as formas oxidadas de Se, Se(IV) e Se(VI)<sup>63,69-72</sup>. Em *E. coli*, a redução assimilatória do Se está diretamente relacionada a sua atividade bioquímica como um micronutriente essencial, no entanto, também revela a toxicidade deste elemento<sup>63</sup>. Assim, fundamentalmente, o destino metabólico do Se em *E. coli* segue a via de redução assimilatória, através de potenciais processos metabólicos, tanto essenciais quanto tóxicos, para ser incorporado em selenoproteínas e acumulado como Se elementar.

Muitos dos processos metabólicos envolvidos no metabolismo de Se foram investigados em células de *E. coli*. Turner *et al.*<sup>63</sup> compilaram muitas destas contribuições para descrever e traçar um mecanismo global com as potenciais reações envolvidas no metabolismo de Se em *E. coli*, desde a entrada do Se nas células até sua assimilação em selenoproteínas e formação de Se elementar, bem como os mecanismos envolvidos na toxicidade do Se(IV). A Figura 1 ilustra o metabolismo de Se em *E. coli* segundo o trabalho de Turner e colaboradores (1998).



**Figura 1.** Metabolismo de Se em *E. coli*. Retirado de: Turner, R. J.; Weiner, J. H.; e Taylor, D. E. *BioMetals*, (11), 1998, pg. 224<sup>63</sup>.

A assimilação de Se inicia pelo transporte de Se(IV) e/ou Se(VI) para dentro das células por diferentes permeases. Acredita-se que o Se(VI) entre na célula através do sistema sulfato permease (*cysA*, *cysU*, *cysW*)<sup>62</sup>. Além disso, a captação de Se(VI) em *E. coli* também requer a proteína de transporte YbaT e uma porina funcional da membrana externa<sup>72</sup>. Por outro lado, foi demonstrado que o transporte de Se(IV) pode ocorrer através de transportadores de sulfato quando em altas concentrações, porém com afinidade 50 vezes menor da permease de sulfato pelo Se(IV) em comparação ao sulfato. No entanto, é provável que exista um transportador de Se(IV) alternativo, visto que a repressão da expressão da permease de sulfato não inibe completamente a absorção de Se(IV)<sup>71</sup>.

Uma vez dentro da célula, o Se(VI) é reduzido a Se(IV) por ação da enzima selenato redutase, um processo essencial para a incorporação do Se na forma de Se(VI)<sup>72</sup>. A selenato redutase de *E. coli* K-12 é uma molibdoenzima com subunidades YgfK, YgfM e YgfN, localizadas no citoplasma<sup>72</sup>. No entanto, outro estudo sugeriu que esta redução também pode ser catalisada pelas enzimas nitrato redutase A e nitrato redutase Z<sup>63</sup>.

A partir desse ponto, o Se(IV), inicia uma série de reações de redução que devem ocorrer para ser incorporado em selenoproteínas. O Se(IV) reage com tióis (RSH)

seguindo a reação de Painter<sup>73,74</sup>. A glutathione (GSH)<sup>73,75,76</sup> e a tioredoxina redutase (TRX)<sup>77-79</sup> são os compostos tiol envolvidos nesta reação, sendo a glutathione considerada como o principal componente do metabolismo de Se<sup>76</sup>. Assim, o resultado da reação de redução do Se(IV) com a glutathione é a selenodiglutathione (GS-Se-SG)<sup>80,81</sup>. Posteriormente, a selenodiglutathione é reduzida a glutathioselenol (GS-SeH). A redução adicional deste composto resulta em seleneto de hidrogênio (H<sub>2</sub>Se), o qual fornece o intermediário reativo (HSe<sup>-</sup>) necessário para a incorporação do Se em selenocisteína<sup>63</sup>. O seleneto pode ser incorporado ao aminoácido selenocisteína através de uma via específica<sup>17,62,82</sup>. A via específica é governada por genes *sel*, que codificam a selenofosfato sintetase, *selD*, e a selenocisteína sintetase, *selA*. A selenofosfato sintetase (*selD*) é a enzima responsável por gerar a forma ativa de Se, o selenofosfato, a partir do seleneto. O selenofosfato é então usado para carregar a serina-tRNA<sup>Sec</sup> com Se através da selenocisteína sintetase (*selA*), gerando selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup><sup>70,84,85</sup>. Assim, a síntese de selenocisteína e sua incorporação dirigida pelo códon UGA desempenham um papel crucial em proteínas redox específicas em *E. coli*, como a formato desidrogenase<sup>79,84</sup> e hidrogenase NiFSe<sup>86</sup>.

Em uma via alternativa a via específica (a dos genes *sel*), o Se, como selenol (HSe<sup>-</sup>), é diretamente incorporado à serina através do gene *cysK* (O-acetilserina(tiol)-liase) para sintetizar selenocisteína livre<sup>87</sup>. A partir daí decorrem dois destinos para o Se como selenocisteína livre. O Se pode ocasionalmente ser carregado especificamente em tRNA<sup>Cys</sup> pela cisteinil-tRNA sintetase (*CysT*) para ser incorporado a proteínas<sup>88</sup>. O Se pode ainda ser incorporado de forma não específica à selenometionina<sup>89,90</sup> (SeMet, o 22º aminoácido), através da via de síntese da metionina. A selenometionina pode ser assimilada indiscriminadamente em proteínas substituindo a metionina através da misacilação do tRNA<sup>Met</sup><sup>91,92</sup>.

Em síntese, a via específica (genes *sel*) é a principal via para a síntese de selenocisteína em *E. coli* e garante a incorporação precisa e controlada da selenocisteína nas selenoproteínas, enquanto a outra via (gene *cysK*) serve como alternativa sob certas condições, especialmente quando há disponibilidade ilimitada (elevadas concentrações) de Se no ambiente<sup>88,89</sup>.

Por outro lado, foi descrito que, mesmo em concentrações baixas (1,25 μM) de Se(IV), a assimilação de Se torna-se tóxica para as células devido à presença de tióis no meio de crescimento. Isso induz uma via adicional de redução de Se, que ocorre em

paralelo à via de assimilação de Se em selenoproteínas, permitindo a desintoxicação de Se na forma de Se elementar<sup>69,93</sup>.

Tuner e colaboradores<sup>63</sup> descreveram que a série de reações envolvidas na via de desintoxicação de Se em células de *E. coli* inicia com o Se(IV) reagindo espontaneamente com a glutatona (GSH) e gerando o primeiro produto, a selenodiglutationa (GS-Se-SG), da mesma forma como na via assimilatória. Porém, é a partir deste ponto que, em condições tóxicas, a via de desintoxicação de Se é induzida. Isso porque a estabilidade da selenodiglutationa é influenciada pela razão molar entre glutatona reduzida e o Se(IV). Quando a concentração de glutatona (GSH) é baixa, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pode ser produzido. Nos casos em que a glutatona (GSH) está presente em excesso molar pode ocorrer uma redução adicional da selenodiglutationa para formar glutatioselenol (GS-SeH), um composto a partir do qual inicia uma série de reações. O glutatioselenol pode: (i) reagir com NADPH-glutatona redutase e produzir  $H_2Se$  volátil; (ii) produzir compostos metilados voláteis de Se (DMSe e DMDS<sub>2</sub>Se)<sup>65</sup>; (iii) se decompor espontaneamente em glutatiolselenolato (GS-Se<sup>-</sup>), um intermediário instável. O glutatiolselenolato por sua vez, pode: (a) sofrer hidrólise para formar Se elementar e glutatona e (b) reagir com glutatona reduzida e produzir selenol (HSe<sup>-</sup>). Uma vez formado, o selenol pode: (I) ser facilmente oxidado a Se elementar pelo oxigênio, gerando radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e (II) reagir com um excesso de glutatona e formar seleneto de hidrogênio ( $H_2Se$ ) volátil.

Além da toxicidade do Se(IV) na reação com a glutatona reduzida, ainda pode ocorrer a toxicidade induzida pela produção da selenocisteína livre. Dada a toxicidade da L-cisteína para a maioria das bactérias entéricas, é provável que a selenocisteína livre também seja altamente tóxica. Para evitar a toxicidade da selenocisteína, a atividade enzimática da selenocisteína liase facilita a degradação da selenocisteína livre e proporciona uma terceira via para a produção de Se elementar<sup>94</sup>.

Portanto, na série de reações entre o Se(IV) e a glutatona, a toxicidade deve ser associada aos produtos transitórios da via de redução, incluindo as espécies reativas de oxigênio<sup>80</sup>,  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ , e seleneto de hidrogênio,  $H_2Se$ <sup>8</sup>. Dessa forma, a formação de Se elementar provavelmente protege as células, por extinguir o acúmulo de  $H_2Se$ , espécies de Se altamente tóxica e reativa. Além disso, em resposta ao estresse oxidativo causado pelos radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), acontece a indução da expressão de enzimas com propriedades antioxidantes, como a catalase e as superóxido dismutases SodA e SodB, essenciais para a defesa de células de *E. coli* contra o Se(IV)<sup>69</sup>. Contudo, quando a

capacidade antioxidante da célula se esgota, os efeitos prejudiciais das espécies reativas  $O_2^{\cdot -}$  resultam em última instância em morte celular<sup>95</sup>.

O metabolismo de Se em células de *E. coli* descreve os processos metabólicos das duas faces do Se, essencial e tóxica, e o destino do Se em selenoproteínas e depositado como Se elementar.

#### **2.4. Bioacumulação de Se por bactérias**

Em *E. coli* o destino metabólico do Se, como Se(IV) e Se(VI), segue a via de redução assimilatória e através de potenciais processos metabólicos, tanto essenciais quanto tóxicos, resulta na incorporação em selenoproteínas e, em certas condições, na acumulação como Se elementar. Portanto, o metabolismo de Se em células de *E. coli* demonstra as vias pelas quais esta bactéria é capaz de bioacumular Se.

Ao revisar a literatura, foram encontrados muitos estudos dedicados à investigar o metabolismo de Se em bactérias buscando elucidar os processos metabólicos da assimilação de Se em selenoproteínas<sup>70,90,94-98</sup> e/ou os processos envolvidos na desintoxicação de Se<sup>69,71,72,99-103</sup>. A maioria dessas investigações concentrou-se principalmente no estudo da metabolização de Se na forma de Se(IV), enquanto uma pequena parcela dedicou-se a comparar a metabolização das espécies Se(IV) e Se(VI)<sup>69-72,95,98,103</sup>. É importante mencionar que os estudos de metabolização de Se em *E. coli* realizados exclusivamente com a espécie Se(VI) são escassos<sup>104,105</sup>, apesar de esta bactéria ser uma das poucas capazes de reduzir Se(VI) de forma assimilatória.

Com base nesses estudos anteriores, a resposta das células de *E. coli* ao Se pode ser especulada conforme a espécie e o nível de concentração de Se ao qual são expostas. Em concentrações que variam de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ , espera-se que o Se seja prontamente incorporado a SeCys para a síntese de selenoproteínas<sup>70,90,95,96</sup> e em concentrações superiores a 50  $\mu\text{M}$ , espera-se que o Se(IV) possa manifestar sua toxicidade através do mecanismo de estresse oxidativo, em condições aeróbias, e produzir Se elementar<sup>69,100</sup>.

Entre os estudos que analisaram o conteúdo de Se bioacumulado na biomassa bacteriana, destacam-se aqueles que avaliaram a assimilação de Se em selenoproteínas e realizaram a análise de especiação de Se, permitindo a identificação das diferentes formas químicas de Se presentes nas células bacterianas<sup>70,90,95,96,98,106</sup>. Por outro lado, alguns estudos se dedicaram a quantificar o Se total metabolizado, revelando variações

significativas na capacidade de bioacumulação entre diferentes cepas bacterianas e nas condições ambientais a que foram submetidas<sup>65,101,103,107-111</sup>.

Nos estudos de assimilação de Se em selenoproteínas a avaliação da incorporação é feita no extrato proteico da biomassa de células após o crescimento em meio de cultura contendo Se. Neste contexto, os estudos de Lacourciere<sup>96</sup>, com culturas de *E. coli* MC4100 suplementadas com 0,1  $\mu\text{M}$  de Se(IV), e de Tuve<sup>90</sup>, com culturas de *E. coli* “strain B” suplementadas com 2  $\text{mg L}^{-1}$  (25  $\mu\text{M}$ ) de Se(IV), relataram que 90% e 100% do Se acumulado foi encontrado incorporado a selenoproteínas, respectivamente. Além disso, ambos estudos excluíram a possibilidade de formação de Se elementar nestas condições.

Poucos estudos avaliaram a assimilação de Se para ambas as espécies Se(IV) e Se(VI) em células de *E. coli*. Wittwer<sup>70</sup> (1983) descobriu que Se(IV) e Se(VI) apresentaram níveis comparáveis de incorporação de Se em selenoproteínas em culturas de *E. coli* K12 suplementadas com baixas concentrações de Se, de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ . Além disso, o autor destacou que não houve a formação de Se(0). Spallholz *et al.*<sup>95</sup> (1976) determinou que >96% do Se encontrado junto às células de *E. coli* foi incorporado em selenoproteínas após a exposição a  $\approx 40 \mu\text{M}$  de Se(IV) ou Se(VI). No entanto, a formação de Se(0) foi observada pela redução do Se(IV), mas não do Se(VI), contribuindo para que a quantidade total de Se(IV) assimilada fosse de três a quatro vezes maior do que a do Se(VI). Os autores atribuíram a ausência de Se elementar na exposição ao Se(VI) a uma possível limitação na taxa de redução Se(VI) em Se(IV).

Esses estudos demonstraram, portanto, que não havia diferenças entre as espécies Se(IV) e Se(VI) em baixas concentrações no que diz respeito à incorporação de Se em selenoproteínas. Além disso, eles mostraram que a redução a Se elementar ocorre em concentrações superiores a 10  $\mu\text{M}$  e, ainda, que esta redução ocorre para Se(IV) e não para Se(VI).

Resultados semelhantes a estes obtidos com *E. coli* foram encontrados para a cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC 6803, no estudo de Gouget *et al.*<sup>112</sup>. A análise de especiação de Se na biomassa de células, após 24 h de exposição a 40  $\mu\text{M}$  de Se(IV) ou Se(VI), revelou que o Se foi incorporado às células na forma de Se(IV) e de compostos orgânicos, em índices de 20% e 80% para Se(IV) e de 10% e 90% para Se(VI), respectivamente.

Recentemente, Moreno *et al.*<sup>65</sup>, relataram que *E. coli* ATCC 25922 (além de *S. aureus*) apresentou alta capacidade de bioacumular Se. A análise da biomassa de células,

após o crescimento bacteriano na presença de Se(IV) nas concentrações 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> (equivalentes a 12,5 e 25 µM, respectivamente), relevou que 35 ± 5% e 58,3 ± 0,8%, respectivamente, do Se adicionado à cultura foi bioacumulado. Além disso, este foi o primeiro estudo a demonstrar que *E. coli* é capaz de biotransformar Se(IV) em DMSe e DMDS<sub>2</sub>Se. No estudo sequencial a este, os mesmos autores revelaram que a selenocisteína (SeCys) é a forma de Se responsável por 80% do total de Se acumulado, além da formação de SeNPs biogênicas<sup>66</sup>.

Por outro lado, deve ser esperado que diferentes cepas de *E. coli* em diferentes concentrações de Se possam levar a resultados distintos. Wang<sup>101</sup> e colaboradores encontraram, em estudos com a cepa de *E. coli* K12 cultivada em uma concentração de Se(IV) tão elevada quanto 1 mM, um nível de acumulação de Se de 9,0% daquele adicionado, com remoção de Se do meio de cultivo após 10 h de exposição, o que representa um resultado menos expressivo do que o encontrado no estudo de Moreno *et al.*<sup>65</sup>.

Há poucos estudos publicados sobre a bioacumulação de Se por *E. coli* exposta a altas concentrações de Se(VI). Um estudo recente avaliou a taxa de redução de 100 mg L<sup>-1</sup> (equivalente a 1,25 mM) de Se(VI) a Se(0) usando *E. coli* EWB32213, e foi observado que a taxa da primeira redução, de Se(VI) para Se(IV), foi mais rápida (completada em 1,5 dias) do que a taxa da segunda redução, de Se(IV) para Se(0) (parcialmente reduzida para Se(0) após 10 dias)<sup>104</sup>. Este estudo, além de esclarecer sobre a cinética da redução, conseguiu demonstrar que a redução do Se(VI) a Se(0) ocorre em concentrações tão altas quanto 100 mg L<sup>-1</sup>.

A metabolização do Se(IV) e Se(VI) em altas concentrações foi avaliada em bactérias. Sarret<sup>98</sup> monitorou o acúmulo de Se em *Ralstonia metallidurans* CH3, constatando que a exposição a 2 mM de Se(IV) induziu a um aumento na duração da fase *lag* (indicação de toxicidade). Inicialmente, em 48 h, o Se foi acumulado como Se(0) e seleneto de alquila (provavelmente selenocisteína) em proporções equivalentes, e no final de 96 h, Se(0) foi a forma de Se predominante. Por sua vez, a exposição a 2 mM Se(VI) não proporcionou aumento na fase *lag* e, ao final de 72 h, o seleneto de alquila foi a principal forma de Se acumulada, havendo um acúmulo de Se aproximadamente 10 vezes menor na exposição ao Se(VI) do que com Se(IV). Estes resultados demonstram a diferença de toxicidade das espécies de Se, sendo o Se(IV) mais tóxico por ter aumentado a duração da fase *lag* (adaptação) e produzido Se(0) (desintoxicação).

O destino de Se(IV) e Se(VI) metabolizados por *Rhodobacter sphaeroides* foi estudado por Van Fleet-Stalder<sup>103</sup>. Embora as células das culturas suplementadas com 1,0 ou 100 ppm de Se(IV) (equivalentes a 12,5 e 1.250 µM, respectivamente) apresentassem quantidades muito maiores de Se total acumulado (63% e 94%, respectivamente) do que experimentos análogos com Se(VI) (11% e 9,6%, respectivamente), as formas químicas de Se encontradas nas células não eram muito diferentes entre Se(IV) [36% de Se(0) e 60% de seleneto de alquila] e Se(VI) [13% de Se(0) e 84% de seleneto de alquila] em baixa concentração, mas mudava significativamente em alta concentração para Se(IV) [97% de Se(0)], mas não para Se(VI) [15% de Se(0) e 81% de seleneto de alquila]. Portanto, em altas concentrações, o metabolismo de Se(IV) é diferente do Se(VI).

A capacidade de cepas de *E. coli* em reduzir Se(IV) a Se(0) tem sido avaliada para uso em aplicações biotecnológicas, como a produção biogênica de nanopartículas de Se (SeNPs) funcionais<sup>107,113,114</sup> e em processos de biorremediação da poluição causada por Se<sup>102,115</sup>. As SeNPs biosintetizadas pela cepa de *E. coli* ATCC 35218, em meio contendo 1 mM de Se(IV), além de promover a remoção de 89% do Se adicionado em 72h de exposição, apresentaram características com potencial uso como suplemento nutricional de Se<sup>107</sup>. A cepa de *E. coli* GIM1.223 cultivada com 250 µM de Se(IV) foi capaz de produzir pontos quânticos de CdSe (seleneto de cádmio) com propriedades para ser empregado como biomarcador de importância na área médica<sup>114</sup>. SeNPs biogênicas sintetizadas, pela cepa *E. coli* K12 cultivada em meio suplementado com 2 mM de Se(IV), apresentaram atividade antimicrobiana e podem representar uma abordagem viável para reduzir o crescimento de bactérias sem antibióticos, além de superar as desvantagens dos métodos sintéticos de produção de SeNPs que empregam produtos químicos tóxicos<sup>113</sup>.

Por outro lado, a modificação genética tem sido usada para produzir ou aumentar a expressão de determinadas características específica de cepas bacterianas visando contribuir para o desenvolvimento de novos processos de biorremediação de ambientes contaminados com Se. Uma modificação feita para super expressar a enzima selenito redutase CsrF em *E. coli* aumentou a capacidade de biossíntese de SeNPs, as quais foram utilizadas para a remoção de múltiplos corantes por adsorção<sup>115</sup>. A cepa de *E. coli* JM109 também teve a sua capacidade de produção de SeNPs aumentada quando cultivada em meio deficiente em fosfato<sup>102</sup>.

Portanto, estudos de bioacumulação de Se por células bacterianas podem ajudar na compreensão do metabolismo de Se e destacam a importância de considerar o efeito

de diferentes espécies e concentrações de Se. Além disso, eles revelam o uso promissor da bactéria *E. coli* em aplicações biotecnológicas sustentáveis.

## 2.5. Interação entre Se e Hg

O mercúrio (Hg) é um metal pesado classificado como o 6<sup>a</sup> mais tóxico entre 6 milhões de compostos. Esse elemento presente em pequenas quantidades no meio ambiente, sendo o 16<sup>o</sup> mais raro da Terra<sup>116</sup>, em três formas químicas, mercúrio elementar ou metálico Hg(0), mercúrio inorgânico, como os íons mercurioso Hg(I) e mercúrico Hg(II), e mercúrio orgânico, como o metilmercúrio, MeHg<sup>117</sup>. Os compostos orgânicos de mercúrio, particularmente o MeHg, afetam predominantemente o sistema nervoso central<sup>118,119</sup>.

O mercúrio pode ser liberado no ambiente por fontes naturais e antropogênicas. O Hg e seus compostos passam por uma série de transformações, mediadas por fatores bióticos e abióticos, em ciclos complexos entre a atmosfera e os ecossistemas aquáticos e terrestres, governando sua distribuição e destino em nível global<sup>120-123</sup>. A influência desses fatores na ciclagem do Hg está relacionada às interconversões entre suas formas, que ocorrem através de reações de oxidação de Hg(0), redução de Hg(II), metilação de Hg(II) e desmetilação de MeHg, influenciando sua biodisponibilidade para os organismos<sup>124</sup>.

Entre os fatores bióticos, se encontram as bactérias Hg-resistentes e as sulfato-redutoras. Algumas bactérias desenvolveram um sistema de resistência baseado em genes *mer* agrupados em um operon (operon *mer*), que permite superar a toxicidade dos compostos de Hg no ambiente através da desintoxicação. Dois tipos principais de sistemas operon *mer* foram descritos: os determinantes de espectro estreito, que conferem resistência apenas ao Hg inorgânico, e os determinantes de amplo espectro, que conferem resistência a compostos orgânicos e inorgânicos de Hg<sup>116,125,126</sup>.

Em sistemas de espectro estreito, a redutase mercúrica, codificada pelo gene *merA*, media metabolicamente a redução de Hg(II) a Hg(0) volátil<sup>127</sup>. Essa enzima foi caracterizada em cepas de *Pseudomonas*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* portadoras de plasmídeos<sup>128,129</sup>.

Em sistemas de amplo espectro, além do gene *merA*, a liase organomercurial, codificada pelo gene *merB*, media a desmetilação de MeHg produzindo Hg(II) e, então, a redutase mercúrica reduz Hg(II) a Hg(0) volátil<sup>130</sup>.

Genes determinantes de resistência ao Hg foram encontrados em bactérias gram-negativas e gram-positivas isoladas de diferentes ambientes. Elas variam em número e identidade de genes envolvidos, podendo ser codificados por operon *mer* localizado em plasmídeos<sup>128</sup>, cromossomos<sup>131</sup> e componentes de transposons<sup>130</sup>.

Se por um lado as bactérias Hg-resistentes desintoxicam Hg, por outro as bactérias sulfato-redutoras são as principais responsáveis pelo processo de metilação de Hg(II), formando espécies de Hg mais tóxicas, principalmente o metilmercúrio (MeHg)<sup>132,133</sup>.

O Hg é um conhecido poluente global, com níveis elevados detectados em várias partes do mundo, que afeta a saúde dos seres humanos e dos ecossistemas<sup>120,134-136</sup>. Em sistemas aquáticos contaminados, especialmente por MeHg, o Hg é transferido para os organismos e pode se bioacumular nos tecidos contaminando a biota e levando ao fenômeno de biomagnificação de Hg através da cadeia alimentar aquática, representando um problema crítico tanto do ponto de vista ecológico quanto de saúde pública, visto que o consumo de peixes contaminados com Hg são a fonte predominante de exposição humana a este metal pesado<sup>137,138</sup>.

Historicamente e de forma controversa, o mercúrio desempenhou algum papel benéfico a saúde, como no tratamento da sífilis e infecções de pele. Atualmente, ainda persistem o uso de Hg em amálgamas dentárias e como conservante em vacinas<sup>139</sup>. No entanto, tem sido demonstrado que a toxicidade do Hg causa efeitos deletérios a saúde dos indivíduos expostos, com efeitos tóxicos dependentes de muitos fatores, incluindo a forma química e dosagem de Hg<sup>136</sup>. Entre os efeitos adversos causados pela exposição ao Hg estão alterações no sistema cardiovascular, reprodutivo, renal, imune<sup>134,135</sup> e, sobretudo desordens neurológicas, como demência, Alzheimer e Parkinson<sup>118,119</sup>.

O mercúrio tem um alto potencial indutor de estresse oxidativo e pode exercer efeitos tóxicos ao interagir com muitas enzimas importantes envolvidas na regulação de antioxidantes. A toxicidade do mercúrio está associada à sua capacidade de formar complexos estáveis com moléculas contendo sulfidríla, incluindo os resíduos de cisteína da glutatona (GSH) levando à inativação de enzimas com importante ação antioxidante<sup>140-142</sup>. Os compostos de mercúrio também tem como alvo os selenetos, presentes na selenocisteína, podendo inibir as funções bioquímicas de selenoenzimas, como a glutatona peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TrxR), que desempenham funções fundamentais na catalisação de reações redox para a síntese de DNA e defesa antioxidante<sup>143-145</sup>. A afinidade do mercúrio pelo selênio (em selenetos e selenol) é cerca

de 1 milhão de vezes maior do que a sua afinidade pelo enxofre (em sulfidril e tiol), revelando o Se como o principal alvo da toxicidade do Hg<sup>119,144</sup>.

Controversamente, as selenoproteínas desempenham funções importantes na proteção contra a toxicidade do Hg por se ligarem ao Hg através do seu grupo selenol altamente reativo e, devido suas propriedades antioxidantes, ajudam a eliminar as espécies reativas de oxigênio induzidas pelo Hg<sup>146,147</sup>.

Os mecanismos de proteção estão relacionados aos processos de acumulação e desintoxicação que são mediados pelo próprio organismo, incluindo a capacidade do Se em perturbar a distribuição de Hg no organismo e induzir a formação de compostos de coordenação Hg-Se estáveis e inertes<sup>148,149</sup>. Por isso, a função protetiva do Se contra a toxicidade do Hg em sistemas biológicos é conhecida como antagonismo.

Esse antagonismo de Se e Hg foi observado pela primeira vez por Parizek et al. em 1967, onde a coadministração de Se preveniu a necrose renal e a mortalidade em ratos que receberam injeção de cloreto de mercúrio<sup>150</sup>. Mais recentemente, dados experimentais demonstram que o tratamento com Se modifica a retenção cerebral de Hg e modula a neurotoxicidade e o estresse oxidativo no tecido nervoso de animais. A hipótese é que a eficácia da proteção do Se contra a neurotoxicidade do Hg pode ser determinada tanto pela dose dos elementos quanto pela sua forma química<sup>151</sup>.

Em outro estudo, realizado em ratos, foi relatado que várias formas de Se, incluindo selenato e selenito, quando administradas juntamente com cloreto de mercúrio, reduziram a toxicidade do Se e do Hg. Os autores confirmaram o papel do altamente reativo selenol nas selenoproteínas P no processo de desintoxicação do Hg pelo aumento da possibilidade de ligação Se-Hg e concluíram que a administração de Se representa um tratamento promissor contra a toxicidade do Hg<sup>152</sup>.

Segundo alguns autores, a suplementação nutricional de Se pode ajudar a garantir quantidades adequadas para fins de desintoxicação de Hg. Em um estudo realizado com populações ribeirinhas do rio Amazonas expostas a elevadas concentrações de Hg e Se, devido à dieta baseada no consumo de peixes e de castanhas-do-Pará, respectivamente, foi observado que um elevado consumo de Se é crítico para compensar efeitos deletérios do Hg<sup>153</sup>. A suplementação nutricional de Se em peixes, por meio de biomassa de *B. subtilis* enriquecida com Se, pode reativar a viabilidade das enzimas inibidas pelo mercúrio e promover um efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo induzido por Hg<sup>154</sup>.

Por outro lado, embora a literatura ofereça poucos exemplos, efeitos sinérgicos tóxicos na interação entre Se e Hg também foram relatados. A toxicidade sinérgica refere-se a uma situação em que a administração de dois compostos tóxicos resulta numa toxicidade global maior do que as suas respostas individuais<sup>140</sup>. Em um estudo com zebrafish, a combinação de níveis elevados de Se e Hg causou efeitos negativos em todos os aspectos da reprodução, em comparação a grupos tratados com níveis elevados desses elementos individualmente. Esse resultado foi atribuído ao efeito sinérgico entre Se e Hg<sup>155</sup>.

Os estudos com bactérias revelam a complexidade dos efeitos interativos entre Se e Hg, fornecendo insights tanto sobre os efeitos antagônicos quanto aos efeitos sinérgicos desses elementos. Um efeito protetor significativo do Se contra a toxicidade do Hg foi relatado em um estudo com células de *E. coli*, no qual foi observado que o Hg(II), uma vez dentro da célula, tem a capacidade de capturar o Se(II-), levando à formação de partículas precipitadas de HgSe<sup>156</sup>. Por outro lado, em *Tetrahymena malaccensis* a interação Se-Hg resultou em desintoxicação de Se em determinadas combinações e na desintoxicação de Hg em outras, demonstrando que a interação Se-Hg sofre influência das espécies e concentrações de Se e Hg envolvidas<sup>157</sup>. Esse efeito de proteção mútua também foi observado em *Pseudomonas fluorescens*, o qual foi atribuído em parte à formação de SeHg<sup>158</sup>. Em outro estudo com *P. fluorescens*, a porcentagem de Se bioacumulada diminuiu com o aumento do Se(IV) adicionado na presença de Hg(II). Além disso, a desintoxicação do Hg foi modificada, levando à diminuição da volatilização de Hg(0) e favorecendo a imobilização no composto HgSe<sup>159</sup>. Em culturas de *Desulfovibrio desulfuricans*, a presença de Hg(II) diminuiu o conteúdo de Se intracelular, indicando o efeito antagonista entre Se e Hg, sugerindo o efeito tóxico do Se em alta concentração. Os autores sugeriram que o efeito antagonista da interação ocorre por limitar a biodisponibilidade de Se e Hg pela formação do composto HgSe<sup>160,161</sup>.

A interação entre Se e Hg é bastante complexa e ainda sendo objeto de estudo, pois sua relação depende de diversas variáveis, como as espécies e as concentrações desses elementos, o organismo exposto, bem como o tempo e o ambiente de exposição. Portanto, pode-se esperar que esta interação entre Se e Hg seja multifacetada.

## 2.6. Determinação de Se total em culturas bacterianas

Para assegurar uma resposta analítica de qualidade ao determinar qualquer analito em amostras ambientais e biológicas, é crucial desenvolver uma estratégia de análise sistemática alinhada à sequência analítica. A estratégia de análise a ser traçada deve ser guiada pela informação analítica desejada, pelas características do analito e da amostra, bem como pela técnica analítica disponível.

A quantificação de um analito em matrizes biológicas, frequentemente em baixos níveis de concentração, pode ser realizada por diversas técnicas analíticas tanto para determinar seu conteúdo total quanto para determinar suas formas individuais (análise de especiação). Para isso, a etapa crucial de uma análise é a seleção de uma técnica analítica apropriada ao tipo de determinação requerida. Independentemente do tipo de determinação, essa seleção envolve um compromisso entre a exatidão e precisão necessárias e o tempo e de recursos disponíveis para a análise. Assim, para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos, são desenvolvidos e otimizados métodos de análise que sejam sensíveis e exatos, estabelecendo parâmetros como limite de detecção e quantificação, seletividade e sensibilidade, dentre outros<sup>162</sup>.

Para a determinação de um analito, geralmente é necessária uma etapa prévia de preparo de amostras. O método de preparo de amostras deve tornar compatível a amostra com a técnica analítica. A maioria das técnicas analíticas requer que a amostra esteja em forma de solução<sup>163</sup>. O método de preparo deve ser capaz de dissolver todos os elementos, decompor a matéria orgânica e converter todas as formas do analito em uma única forma. Geralmente, o método de preparo utilizado para este fim é baseado na decomposição por via úmida, também chamado de digestão ácida, que associa ácidos e aquecimento<sup>162</sup>.

A etapa de preparo de amostras é reconhecida como uma etapa crucial dentre as etapas inerentes à sequência analítica, podendo ser suscetível a erros decorrentes de contaminação e volatilização do analito e por conta de aspectos restritivos como demanda significativa de tempo para execução e custo de análise, entre outras considerações. Neste contexto, a escolha do método de preparo de amostras é impulsionada pela necessidade de garantir resultados precisos e exatos, ao mesmo tempo em que se enfrenta o desafio de reduzir o tempo total de análise, minimizar a manipulação da amostra para evitar contaminações, otimizar o consumo de reagentes e reduzir a geração de resíduos<sup>163,164</sup>.

Neste contexto, a Tabela 1 resume uma série de metodologias analíticas desenvolvidas em diversas configurações, entre métodos de preparo de amostras e técnicas instrumentais, já descritas na literatura, para determinar Se total tanto em células

bacterianas como em meios de cultivo de uma variedade de culturas bacteriana expostas a espécies inorgânicas de Se em uma ampla faixa de concentrações.

**Tabela 1.** Metodologias analíticas para a determinação de Se total aplicadas em estudos de avaliação da bioacumulação de Se por bactérias e remoção de Se do meio de cultivo.

<b>Técnica analítica</b>	<b>Método de preparo de amostras</b>	<b>Espécie e concentração de Se</b>	<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Referência</b>
Voltametria de redissolução anódica (ASV)	Biomassa bacteriana e meio de cultivo	Se(VI)	<i>Dessulfomicrobium</i>	Hockin e Gadd (2006) <sup>165</sup>
	Digestão ácida (0,5 mL HNO <sub>3</sub> + 0,02 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) a 130°C. Redução de Se(VI) para Se(IV) com HCl concentrado	25, 50 e 100 µM	<i>sp.</i>	
Espectrometria de absorção molecular UV e visível (UV-Vis)	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>L. paracasei</i>	Mörschbacher et al. (2018) <sup>166</sup>
	Digestão ácida (4,0 mL HNO <sub>3</sub> ) assistida por radiação micro-ondas (120 °C por 10 min)	30 e 60 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. plantarum</i>	
	Biomassa bacteriana e meio de cultivo	Se(IV) e Se(VI)	<i>E. coli</i>	Ji e Wang (2017) <sup>104</sup>
	Digestão ácida (HNO <sub>3</sub> ). Redução de Se(VI) para Se(IV) com HCl concentrado	10 – 25 mg L <sup>-1</sup>		
	Meio de cultivo	Se(IV) 0,5 – 2,5 mM	<i>Ochrobactrum sp.</i>	Piacenza et al. (2019) <sup>167</sup>
Espectrometria de absorção atômica (AAS)	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>R. sphaeroides</i>	Bebien et al. (2001) <sup>168</sup>
	Digestão ácida (HNO <sub>3</sub> ) a 150 °C por 3 h. Espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS)	1,0 mM		

	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>Enterococcus sp</i>	Pusztahelyi et al.
	Digestão ácida (3,0 mL HNO <sub>3</sub> + 2,0 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a 120 °C por 2 h. Espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS)	600 mg L <sup>-1</sup>	<i>Bifidobacterium sp</i> <i>Lactobacillus sp</i> <i>Lactococcus sp</i>	(2015) <sup>169</sup>
	Meio de cultivo	Se(IV)	<i>S. salivarius</i>	Krittaphol et al.
	Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG AAS)	100 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	(2011) <sup>111</sup>
Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>S. thermophiles</i>	Krausova et al.
	Digestão ácida (3,0 mL HNO <sub>3</sub> ) assistida por radiação micro-ondas (240 °C por 10 min)	1,0 – 50 mg L <sup>-1</sup>	<i>E. faecium</i>	(2019) <sup>170</sup>
	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>Streptococcus sp</i>	Hyrslava et al.
	Digestão ácida (3,0 mL HNO <sub>3</sub> ) assistida por radiação micro-ondas (190 °C por 10 min)	5,0 – 100 mg L <sup>-1</sup>	<i>Lactococcus sp</i> <i>Enterococcus sp</i>	(2022) <sup>171</sup>
	Biomassa bacteriana e meio de cultivo	Se(IV) e SeNPs	<i>E. coli</i>	Moreno-Martin et
		1,0 e 2,0 mg L <sup>-1</sup>	<i>S. aureus</i>	al. (2021) <sup>65</sup>
	Digestão ácida (1,0 mL HNO <sub>3</sub> + 0,5 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) assistida por radiação micro-ondas	Se(IV) e SeNPs	<i>L bulgaricus</i>	Palomo-Siguero et al. (2016) <sup>109</sup>
		1,0 e 10 mg L <sup>-1</sup>		
		Se(IV)	<i>P. acidilactici</i>	Kousha et al.
		0,5 – 4,0 mg L <sup>-1</sup>		(2017) <sup>106</sup>

	Meio de cultivo	Se(IV) e Se(VI) 1,0 e 100 mg L <sup>-1</sup>	<i>R. sphaeroides</i>	Van Fleet-Stalder et al. (2000) <sup>103</sup>
	Meio de cultivo	Se(IV) e Se(VI) 4,0 e 40 µM	<i>Synechocystis</i> sp.	Gouget et al. (2005) <sup>112</sup>
	Biomassa bacteriana	Se(IV) e Se(VI)	<i>R. metallidurans</i>	Sarret et al.
	Digestão alcalina (NaOH 1 M – dodecilsulfato de sódio a 20%) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,0 mM		(2005) <sup>98</sup>
Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)	Meio de cultivo	Se(IV) 1,0 mM	<i>E. coli</i>	Wang et al. (2011) <sup>101</sup>
	Biomassa bacteriana	2,0 – 3,0 g L <sup>-1</sup>	Leveduras	Vacchina et al. (2021) <sup>172</sup>
	Digestão ácida (HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			
	Meio de cultivo	Se(IV) 0,25 – 1,0 mM	<i>E. coli</i>	Kora e Rastogi (2017) <sup>107</sup>
	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>E. durans</i>	Pieniz et al.
	Digestão ácida (6,0 mL HNO <sub>3</sub> + 1,0 mL HClO <sub>4</sub> )	0,5 – 4,0 mg L <sup>-1</sup>		(2017) <sup>110</sup>
	Biomassa bacteriana	Se(IV)	<i>E. coli</i>	Zhu et al.
	Digestão ácida (4,0 mL HNO <sub>3</sub> + 1,0 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	100 µM e 1,0 mM		(2020) <sup>102</sup>
Biomassa bacteriana e meio de cultivo	Se(IV) e Se(VI)	<i>P. fluorescens</i>	Hapuarachchi et al. (2004) <sup>108</sup>	
	Digestão ácida (HNO <sub>3</sub> 50%)	1,0 – 10 mM		

Os métodos de preparo de amostras listados na Tabela 1 representam a diversidade de combinações possíveis para decompor uma amostra. O preparo de amostras de células bacterianas e meios de cultivo geralmente são feitos por digestão ácida, com aquecimento convencional<sup>102,104,108,110,165,168,169,172</sup> ou assistida por radiação micro-ondas<sup>65,106,109,166,170,171</sup>, sendo entre os ácidos, o ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) uma escolha comum, o qual pode ou não ser associado a outros ácidos, como ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )<sup>165</sup> e ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ )<sup>110</sup>, ou ao peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>65,102,106,109,169,172</sup>. No entanto, em alguns dos trabalhos listados, não foram encontradas informações precisas sobre os métodos de preparo de amostras empregados, principalmente os relativos as amostras de meio de cultivo<sup>101,103,107,111,112,167</sup>, não sendo possível saber se as amostras foram analisadas diretamente, sem etapa prévia de preparo de amostras, ou não.

Entre as técnicas analíticas empregadas, as técnicas espectrométricas predominam entre os estudos de determinação de Se total elencados na Tabela 1, notavelmente a espectrometria com ICP é a mais usada. Em comparação às demais técnicas listadas, a análise por ICP apresenta vantagens como maior sensibilidade e mais baixos limites de detecção, além de sua capacidade única de realizar análises multielementares simultaneamente. Contudo, devido aos elevados custos de aquisição, manutenção e operacionais, a espectrometria com ICP pode não ser vantajosa para análises monoelementares<sup>173</sup>.

Cabe mencionar que as técnicas de Voltametria de Redissolução Anódica (ASV), Espectrometria de Absorção Atômica dom Geração de Hidreto (HG AAS) e alguns métodos de espectrometria de absorção molecular UV-Vis determinam Se na forma de Se(IV). Assim, para a determinação de Se total, após o preparo de amostras, uma etapa adicional é necessária para que ocorra a redução do Se(VI) a Se(IV), acarretando em maior tempo de análise. Ainda assim, entre essas técnicas, a HG AAS garante um tempo total de análise mais curto<sup>162</sup>.

Entre as técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) listadas, F AAS e HG AAS, a HG AAS apresenta menor limite detecção e maior sensibilidade do que a F AAS, sendo esta última mais adequada para aplicações onde o Se está presente em níveis de  $\text{mg L}^{-1}$ <sup>162</sup>. Contudo, considerando o uso das técnicas de AAS, nesta revisão da literatura, não foram encontrados estudos usando a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) para análise de biomassa bacteriana, mesmo sendo essa uma técnica amplamente usada para a determinação de Se em matrizes biológicas<sup>174,175</sup>.

No presente estudo, a GF AAS foi a técnica escolhida para a determinação de Se em biomassa de células de *E. coli* digeridas e para a análise direta de sobrenadante do meio de cultivo. A escolha baseou-se na capacidade desta técnica de determinar o analito usando pequenos volumes de amostra (10 – 50 µL) com sensibilidade e exatidão satisfatórias, além de ter um menor custo operacional comparado ao ICP-MS. Adicionalmente, a possibilidade de uso de método de preparo de amostras convencional e de análise direta de amostras pode representar uma vantagem econômica e de tempo de análise em relação às demais técnicas analíticas.

É conhecido que os efeitos da matriz da amostra podem impactar na precisão da análise por GF AAS. No entanto, medidas de controle de qualidade e a validação do método podem assegurar a exatidão e confiabilidade aos resultados obtidos por esta técnica<sup>36,175</sup>.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito que diferentes espécies e concentrações de Se exercem na bioacumulação de Se por *Escherichia coli* ATCC 11775, bem como o efeito da presença de Hg sobre essa bioacumulação, utilizando um método analítico otimizado e validado usando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 1) Desenvolver um protocolo experimental padronizado para estudar diferentes tipos de exposição de *E. coli* aos elementos Se e Hg;
- 2) Otimizar e validar um método analítico utilizando a técnica de GF AAS para a determinação de Se total em biomassa bacteriana digerida e por análise direta do sobrenadante do meio de cultivo;
- 3) Avaliar a resistência de *E. coli* aos elementos Se e Hg;
- 4) Avaliar o efeito individual de espécies e concentrações de Se, do Hg e dos efeitos interativos entre Se e Hg no desenvolvimento celular e na bioacumulação de Se por *E. coli* a partir de análise estatística.

## 4. Material e métodos

### 4.1 Instrumentação

Para a determinação de Se por GF AAS, foi usado um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) PinAAcle 900T equipado com autoamostrador AS 900. O sistema de correção de absorção de fundo é baseada no efeito Zeeman. Foi usado um tubo de grafite THGA com revestimento de grafite pirolítico e plataforma de L'vov integrada. Como fonte de radiação, foi usada uma lâmpada de descarga sem eletrodos de selênio, operada a 280 mA (todos Perkin Elmer, EUA). A avaliação do sinal foi feita pela absorvância integrada (área do sinal analítico) na linha analítica de 196,03 nm, com fenda espectral de 2,0 nm.

A determinação de Se por ICP-MS foi realizada em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado ICPMS-2030, equipado com autoamostrador AS-10, nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica, sistema mini tocha e cela de colisão (todos Shimadzu, Japão).

O preparo das amostras analisadas por ICP-MS foi feito pelo método de decomposição assistida por ultrassom usando um processador ultrassônico (sonorreator) do tipo cup-horn (Qsonica®, EUA).

As pesagens foram realizadas em balança analítica EU60 (Gibertini Elettronica, Itália).

A esterilização de vidrarias, soluções e materiais utilizados nos experimentos biológicos foi feita em autoclave Vitale Plus (Cristófoli, Brasil).

A manipulação de qualquer material contendo *E. coli*, bem como de vidrarias e soluções esterilizadas, foi realizada em capela de fluxo laminar vertical classe 100 (modelo 400, Pachane, Brasil).

A incubação dos ensaios de interação foi feita em um agitador orbital com banho termostaticado para tubos de ensaio Excella E25 (New Brunswick Scientific, EUA) e a incubação da bactéria em placas foi feita em estufa bacteriológica B 6120, (Thermo electron Corporation, Alemanha).

As medidas de densidade óptica ( $OD_{600nm}$ ), para avaliação do desenvolvimento celular bacteriano, foram realizadas pela leitura da absorvância em 600 nm em um espectrofotômetro UV-visível Biomate 3S (Thermo Scientific, EUA).

Uma centrífuga de bancada (modelo Universal 320, Hettich, Alemanha) foi usada para separar a biomassa de células do meio de cultivo.

#### 4.2 Reagentes e soluções

Água ultrapura com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA), foi utilizada para o preparo e diluições de soluções padrão, preparo e diluição das amostras e enxágue final dos frascos descontaminados previamente em solução ácida.

Ácido clorídrico 37% (m m<sup>-1</sup>) e ácido nítrico 65% (m m<sup>-1</sup>) (Synth, Brasil) foram purificados por destilação abaixo do seu respectivo ponto de ebulição em sistema de destilação de sub-ebulição em quartzo (Marconi, Brasil).

Para a determinação de Se, as soluções de calibração foram preparadas diariamente a partir da diluição sequencial da solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Se (Sigma-Aldrich, Alemanha). Para a determinação de Se por GF AAS, as curvas de calibração foram preparadas em ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 0,2% (v v<sup>-1</sup>) com concentração de 4 a 240 µg L<sup>-1</sup>. Para a determinação de Se por ICP-MS, as curvas de calibração foram preparadas em HNO<sub>3</sub> 0,2% (v v<sup>-1</sup>) com concentração de 0,5 a 6,0 µg L<sup>-1</sup>.

Uma solução de 10,0 ± 0,2 g L<sup>-1</sup> de paládio (Pd) em 15% (v v<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha) e uma solução de 10,0 ± 0,2 g L<sup>-1</sup> de magnésio (Mg) em 15% (v v<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram utilizadas para preparar o modificador químico usado na determinação de Se por GF AAS.

O material de referência certificado NIST 1577b bovine liver (National Institute of Standards and Technology, EUA) foi utilizado para a avaliação da exatidão do método de decomposição assistida por ultrassom.

O meio de cultura usado para o cultivo de *E. coli* foi o LB *broth* (Sigma-Aldrich, Alemanha), conhecido também como Lennox *broth* ou Luria Bertani *Broth*. O LB é um meio nutritivo composto por 10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Tanto o meio LB utilizado nos ensaios de interação quanto o meio LB para placas (adição de 2% de Agar) foram preparados em água destilada e esterilizados em autoclave.

A solução tampão fosfato salino (PBS), usada na diluição seriada do método de contagem de unidade formadora de colônias (CFU) e para a lavagem da biomassa de células de *E. coli*, foi preparada com 137 mM de cloreto de sódio, 2,7 mM cloreto de

potássio e 10 mM de fosfato (fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico) com pH final ajustado para 7,4.

Para a adição de Se nos ensaios de interação dos experimentos de exposição de células foram preparadas soluções padrão com concentração de 0,03 a 3,0 mM de Se (IV) e Se (VI) pela dissolução de quantidades apropriadas de selenito de sódio e selenato de sódio, respectivamente (Sigma-Aldrich, Alemanha).

A adição de Hg nos ensaios de interação dos experimentos de exposição de células foi feita através de uma solução padrão 1,5 mM de Hg(II) preparada pela dissolução de quantidade apropriada de cloreto de mercúrio (Sigma-Aldrich, Alemanha).

### **4.3 Descontaminação e esterilização do material**

A limpeza das vidrarias em geral foi feita por imersão em uma solução de HNO<sub>3</sub> 10% (v v<sup>-1</sup>) por um período mínimo de 24 horas. Após, a retirada da solução ácida, os frascos foram enxaguados com água ultrapura e secos à temperatura ambiente.

A esterilização de soluções, vidrarias e materiais em geral utilizados no experimento com *E. coli* foi feita em autoclave à 121 °C, 1,2 kgf cm<sup>2</sup>, por 30 minutos.

Após os experimentos, todo material em contato com o microrganismo passou por um processo de desinfecção por imersão em hipoclorito de sódio 1% por pelo menos 30 minutos, seguido de lavagem com detergente e enxágue com água destilada.

### **4.4 Protocolo experimental de exposição de células de *E. coli***

Para investigar a bioacumulação de Se por *E. coli*, um protocolo experimental de exposição de células de *E. coli* ao Se e Hg foi padronizado. Os diferentes tipos de exposição a esses elementos, individual ou combinada, foram realizados por ensaios de interação preparados a partir de uma cultura de *E. coli* ATCC 11775.

#### *4.4.1 Cultivo de E. coli*

A cepa liofilizada de *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 11775<sup>™</sup> foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, EUA). Após reidratação, a bactéria foi propagada em meio LB e incubada a 37 °C por 24 h, conforme recomendação do fabricante. Posteriormente, a cultura foi cultivada em meio sólido (placa de agar) e armazenada a 4 °C, sendo repicada mensalmente antes de sua utilização nos experimentos de exposição.

#### 4.4.2 Experimentos de exposição de células de *E. coli*

Os ensaios de interação *E. coli* – Se foram preparados a partir de uma suspensão diluída e padronizada de células de *E. coli*. Inicialmente, 100 mL de meio LB (20 g L<sup>-1</sup>) foram inoculados com uma alça de *E. coli* e mantidos a 37 °C, 200 rpm, por 20 horas. Esse inóculo resultou em uma suspensão concentrada de células (OD<sub>600nm</sub> de ≈ 1,7). Alíquotas desse inóculo foram acrescentadas a um meio LB estéril (15 g L<sup>-1</sup>), resultando em uma suspensão diluída de células com uma OD<sub>600nm</sub> de 0,33, correspondente a uma concentração de células viáveis na faixa de 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

Dessa suspensão de células (OD<sub>600nm</sub> de 0,33), 10 mL foram transferidos para tubos de ensaios para o preparo das replicatas dos ensaios de interação, seguido pela adição dos elementos Se e/ou Hg, conforme o tipo de exposição. Réplicas de controle foram preparadas sem a presença desses elementos, com a finalidade de servir como referência do desenvolvimento basal bacteriano nas condições ambientais em estudo.

A exposição de células de *E. coli* ao Se e Hg variou de acordo com a forma como os elementos foram adicionados, individualmente ou combinados, gerando quatro experimentos de exposição distintos:

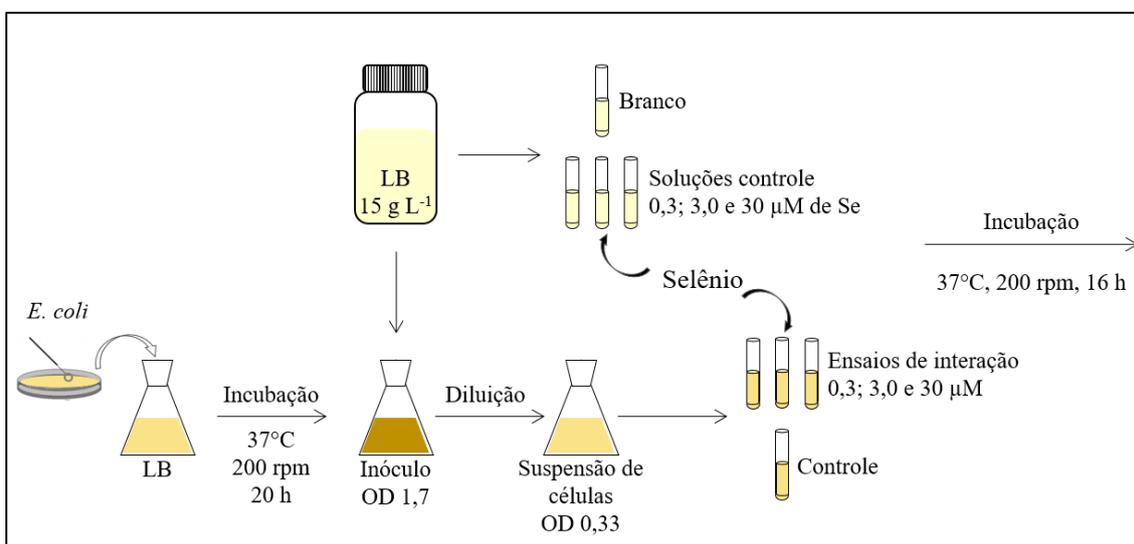
- a) Experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se: o Se foi adicionado aos ensaios de interação por meio de soluções de selenito de sódio [Se(IV)] ou selenato de sódio [Se(VI)], atingindo concentrações de 0,3; 3,0; e 30 µM. (equivalentes a 0,024; 0,24 e 2,4 mg L<sup>-1</sup> de Se, respectivamente).
- b) Experimento de exposição de células de *E. coli* ao Hg: os ensaios de interação com Hg envolveram a adição de uma solução de cloreto de mercúrio [Hg(II)] para obter a concentração de 15 µM de Hg (equivalentes a ±3,0 mg L<sup>-1</sup>).
- c) Experimento de coexposição de células de *E. coli* ao Se e Hg – Pré-tratamento com Se: primeiramente, os ensaios de interação foram tratados com Se [0,3; 3,0 e 30 µM de Se(IV) ou Se(VI)] e, após 2 h de exposição ao Se, com 15 µM de Hg(II).
- d) Experimento de coexposição de células de *E. coli* ao Se e Hg – Pós-tratamento com Se: os ensaios de interação foram tratados primeiramente com 15 µM de Hg(II) e, após 2 h de exposição ao Hg, foram tratados com Se [0,3; 3,0 e 30 µM de Se(IV) ou Se(VI)].

Soluções controle, individuais ou combinadas, de Se e Hg foram preparadas em meio LB (15 g L<sup>-1</sup>) em duplicata, nas mesmas concentrações usadas nos ensaios de interação. Estas soluções controle, além de servirem como referência para cálculos de

recuperação de Se na biomassa e sobrenadante, foram utilizadas no teste de adição e recuperação do analito na matriz para avaliação da exatidão do método na determinação de Se por análise direta do sobrenadante por GF AAS. O meio LB ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) sem a presença dos elementos foi usado como branco no controle de contaminação bacteriana ao longo do experimento e nas medidas analíticas.

Após o preparo, as replicatas de ensaios de interação, controle, soluções controle de Se e do branco foram incubadas em agitador orbital com banho termostaticado a  $37^\circ\text{C}$  por período total de 16 horas, em todos experimentos de exposição.

O protocolo experimental padronizado para um experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se, desde o preparo do inóculo até a incubação dos ensaios de interação, controles e soluções, está ilustrado na Figura 2.



**Figura 2.** Procolo experimental de preparo dos ensaios de interação, controle, soluções controle de Se e branco de um experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se.

Cada um dos quatro tipos de experimentos de exposição foram repetidos em dias diferentes. O experimento de exposição individual ao Se foi repetido três vezes, gerando um conjunto de dados igual a 9 ( $n = 9$ ) para os resultados de bioacumulação de Se e igual a 6 ( $n = 6$ ) para os resultados de viabilidade celular, para cada espécie e concentração de Se. O experimento de exposição individual ao Hg foi repetido quatro vezes, gerando um conjunto de dados igual a 12 ( $n = 12$ ) para os resultados de viabilidade celular. Cada tipo de experimento de coexposição, pré e pós-tratamento, foi repetido duas vezes, gerando um conjunto de dados igual a 7 ( $n = 7$ ) para os resultados de bioacumulação de Se (%) e

igual a 7 (n = 7) para os resultados de viabilidade celular, para cada espécie e concentração de Se.

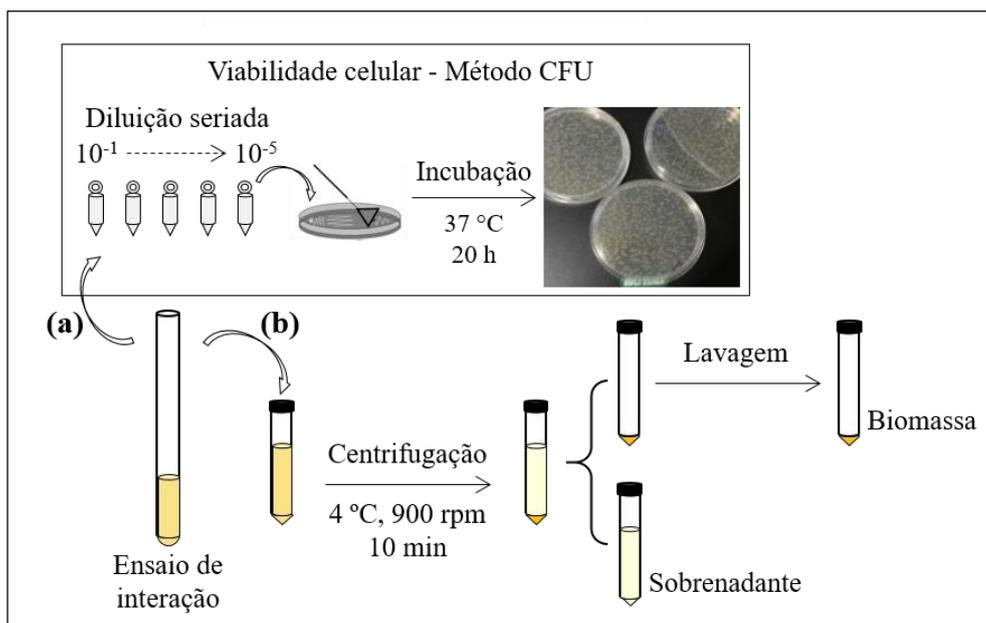
#### 4.4.3 Coleta, tratamento e preparo de amostras

Ao final do experimento de exposição, passado o período de 16 h de incubação, uma alíquota de 0,1 mL dos ensaios de interação e do controle foi coletada para a avaliação da viabilidade celular de *E. coli* pelo método CFU, conforme descrito no tópico 4.5.

O restante do conteúdo dos ensaios de interação e do controle foi centrifugado para separar as células de *E. coli* (biomassa) do meio de cultivo (sobrenadante). Para isso, os ensaios foram transferidos para frascos de polipropileno com fundo cônico e centrifugados à 4 °C, 9000 rpm (7711 RFC), por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para frascos de polipropileno e armazenados a 4 °C até análise por GF AAS no dia seguinte.

A biomassa de células sedimentada passou por um processo de lavagem que teve como finalidade a remoção de Se ou Hg fracamente adsorvidos e qualquer resíduo de meio de cultivo, assegurando que apenas Se e/ou Hg bioacumulados estivessem presentes na biomassa. Para o processo de lavagem, a biomassa foi ressuspensa em tampão fosfato salino (PBS), agitada em vortex e centrifugada. Este procedimento foi repetido por duas vezes e o sobrenadante (tampão PBS) retirado e descartado.

A Figura 3 ilustra os procedimentos de (a) retirada de alíquota e diluição seriada para a avaliação da viabilidade celular e de (b) separação das amostras e lavagem da biomassa, que foram realizados com os ensaios de interação e controle após a exposição.



**Figura 3.** Procedimentos de (a) avaliação da viabilidade celular e (b) separação das amostras e lavagem da biomassa, realizados com os ensaios de interação e controle após a exposição.

Um método de preparo de amostras por via úmida com aquecimento condutivo em sistema aberto foi empregado para decompor as amostras de biomassa de células. Para isso,  $200\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3\text{ }14\text{ mol L}^{-1}$  e  $50\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2\text{ }30\%$  ( $\text{v v}^{-1}$ ) foram adicionados ao frasco contendo o conteúdo total da biomassa de células e homogeneizados por agitação em vortex. Em seguida, o frasco foi mantido em banho a  $85 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min, sendo posteriormente deixado esfriar à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, as amostras de biomassa digeridas e os sobrenadantes foram diluídos com água ultrapura até o volume final adequado e analisados por GF AAS.

#### 4.5 Teste de viabilidade celular

Para avaliar o efeito individual ou conjunto do Se e do Hg sobre o desenvolvimento de *E. coli*, os ensaios de interação foram submetidos ao teste de viabilidade celular ao final do período de incubação.

A viabilidade celular foi verificada através do método de contagem de unidade formadora de colônias (CFU). Para isso, uma alíquota de  $100\text{ }\mu\text{L}$  de cada replicata dos ensaios de interação e do controle foi diluída em séries de 10, 100, 1000, 20000 e 200000 vezes em tampão fosfato salino (PBS), conforme ilustrado na Figura 3(a). Uma alíquota

de 50  $\mu\text{L}$  da última diluição foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski sobre placa com meio LB sólido. Este procedimento foi feito em triplicata para cada replicata de ensaio. As placas foram mantidas em estufa à 37 °C, por 20 h. Após o período de incubação, foi feita a contagem manual das colônias formadas e a concentração de células viáveis nos ensaios de interação e no controle foi expressa como  $\log_{10}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ .

A viabilidade de *E. coli* no controle foi estabelecida como desenvolvimento basal bacteriano nas condições ambientais estudadas na ausência de Se e Hg. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) entre o controle e os 4 tipos de experimento de exposição de células.

#### **4.6 Curva de crescimento celular**

Curvas de crescimento bacteriano foram construídas para avaliar o desenvolvimento celular de *E. coli* durante um longo tempo de incubação, com o objetivo de verificar o período em que ocorre a fase de crescimento celular exponencial (fase log). Isso permitiu estabelecer o período de incubação total de células de *E. coli* na exposição ao Se e Hg nos experimentos. Para isso, os ensaios de interação e o controle de um experimento com células de *E. coli* expostas individualmente a esses elementos foram incubados à 37 °C em agitador orbital a 200 rpm por até 72 horas.

Para a construção das curvas de crescimento,  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  versus tempo (h), o crescimento celular foi avaliado ao longo de 72 h de incubação pela medida da densidade óptica ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) de alíquotas dos ensaios de interação e do controle, coletadas em determinados intervalos de tempo.

#### **4.7. Determinação de Se por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite**

A bioacumulação de Se por *E. coli* foi avaliada pela quantificação de Se em amostras de biomassa digeridas utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS). Além disso, a determinação de Se nas amostras dos sobrenadantes do meio de cultivo e das soluções controle de Se foi realizada por análise direta por GF AAS. Todas as amostras analisadas foram diluídas apropriadamente para a faixa linear e acidificadas (até 0,2% de  $\text{HNO}_3$ ) logo antes da análise.

Para as determinações, 20 µL de amostra foram injetados no atomizador juntamente com 5 µL de uma solução 0,2% de Pd e 0,12% de Mg (equivalente a uma massa de 10 µg de Pd e 6 µg de Mg), usada como modificador químico, utilizando um programa de temperatura otimizado, como descrito na Tabela 2.

Argônio (Ar) foi utilizado em fluxo constante de 250 mL min<sup>-1</sup> como gás de purga em todas as etapas do programa de aquecimento, exceto durante a etapa de atomização, quando o fluxo de Ar foi interrompido.

**Tabela 2.** Programa de temperatura para determinação de Se por GF AAS.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura, °C</b>	<b>Rampa, °C s<sup>-1</sup></b>	<b>Permanência, s</b>
Secagem 1	120	8	25
Secagem 2	160	8	45
Pirólise	1200	10	20
Atomização	1850	0	4
Limpeza	2300	1	3

A curva analítica na faixa de 4 a 240 µg L<sup>-1</sup> foi estabelecida com padrões de calibração de Se total (0,2% de HNO<sub>3</sub>). Todas as medidas foram feitas em triplicata e a avaliação do sinal de absorção foi feita pela absorvância integrada (área do sinal analítico).

#### **4.8. Determinação de Se por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado**

No sentido de avaliar a exatidão do método de determinação de Se por GF AAS, os resultados de bioacumulação de Se obtido pelo método proposto foram comparados aos dados obtidos por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), usada como uma técnica independente.

Para cumprir com este objetivo, réplicas de experimentos de exposição de células de *E. coli* foram feitas exclusivamente para este fim. As amostras de biomassa (conteúdo total) e de sobrenadante (alíquotas) dos ensaios de interação e controle, soluções controle de Se e branco, foram submetidas a um processo de decomposição assistida por ultrassom, usando um método adaptado do proposto por Jesus e Arruda (2020)<sup>176</sup>. Para isso, 300 µL de HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup> e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v v<sup>-1</sup>) foram adicionados sobre uma alíquota

de 100 µL de sobrenadante, solução controle de Se ou branco e sobre o conteúdo total da biomassa (previamente coletada em microtubo + 100 µL de água). Após homogeneização em vortex, os microtubos foram acomodados no suporte de um processador ultrassônico de alta potência do tipo cup-horn (Qsonica®, Connecticut, EUA). A mistura foi submetida a um programa de sonicação em uma potência de 150 W, por 3 min, em 6 ciclos de pulsos de amplitude de 60%, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3.** Programa de ciclos de sonicação utilizado no método de preparo de amostras.

<b>Etapa</b>	<b>Amplitude do pulso, %</b>	<b>Tempo, s</b>	<b>Potência, W</b>
<b>On</b>	60	20	150
<b>Off</b>	0	10	0

As amostras decompostas foram apropriadamente diluídas à faixa linear para a determinação de Se em ICP-MS equipado com uma minitocha e célula de colisão de hélio. As condições de operação, incluindo energia de radiofrequência (RF), vazão de gás de plasma (argônio), vazão de gás nebulizador e vazão do gás auxiliar, estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições operacionais usadas para a determinação de Se por ICP-MS.

<b>Configuração Instrumental</b>	
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Temperatura da câmara (°C)	5
Potência da radiofrequência (kW)	1,2
Vazão do gás principal (L min <sup>-1</sup> )	8,0
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,7
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,1
Voltagem da cela de colisão (V)	- 21
Vazão de He (mL min <sup>-1</sup> )	6,0
Filtro de energia (V)	7,0

Os isótopos <sup>76</sup>Se, <sup>77</sup>Se e <sup>78</sup>Se foram monitorados e a aquisição de dados foi obtida em modo contínuo. A quantificação de Se foi realizada por calibração externa com o isótopo <sup>78</sup>Se e as medidas foram realizadas em quintuplicata.

A exatidão do método de preparo assistido por ultrassom foi avaliada usando material de referência certificado NIST 1577b de fígado bovino. Para tanto, 0,5 mg desse material de referência foi decomposto e analisado nas mesmas condições que foram aplicadas às amostras de biomassa.

#### **4.9. Cálculos de recuperação de Se**

Os dados da determinação de Se nas amostras analisadas por GF AAS e ICP-MS, inicialmente obtidos em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Se, foram convertidos em porcentagem (%) de Se bioacumulado, no caso de amostras de biomassa, ou em % de Se recuperado, no caso de amostras de sobrenadante ou das soluções controle de Se.

A porcentagem de Se bioacumulado foi calculada a partir da concentração de Se encontrada na biomassa e nas respectivas soluções controle de Se, estas consideradas como 100%, utilizando a Equação 1:

$$\text{Se bioacumulado (\%)} = (\text{concentração de Se encontrada na amostra} / \text{concentração de Se encontrada na solução controle}) \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

A porcentagem de Se recuperado no sobrenadante foi calculada da mesma forma que a porcentagem de Se bioacumulado.

O cálculo da porcentagem de Se recuperado nas soluções controle de Se considerou o valor teórico de concentração de Se adicionado aos ensaios de interação como 100%, conforme a Equação 2:

$$\text{Se recuperado (\%)} = (\text{concentração de Se encontrada} / \text{valor teórico}) \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

O balanço de massa, calculado com a finalidade de avaliar a recuperação total do Se adicionado aos ensaios de interação, foi determinado pela soma da % de Se bioacumulado e da % de Se recuperada no sobrenadante.

#### **4.10. Figuras de mérito**

Os indicadores quantitativos de desempenho relacionados à exatidão dos resultados obtidos pelo método analítico otimizado para a determinação de Se por GF

AAS, foram avaliadas a partir do seguinte: limite de detecção, limite de quantificação, faixa linear dinâmica, sensibilidade, exatidão e precisão.

O limite de detecção (LOD), expresso como a quantidade mínima detectável com uma dada certeza analítica, é uma medida da concentração ou massa de analito que, quando excedida, permite o reconhecimento de que a quantidade de analito na amostra é maior que a da solução branco<sup>177,178</sup>. O LOD foi calculado utilizando-se o desvio padrão (s) de dez medidas de absorvância sucessivas de uma solução branco (HNO<sub>3</sub> 0,2% v v<sup>-1</sup>) e o coeficiente angular (S) da curva de calibração (também definido como sensibilidade), conforme Equação 3.

$$\text{LOD} = 3s / S \quad \text{Equação 3}$$

O limite de quantificação (LOQ), definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente com risco de erro inferior a 5%, foi calculado pela Equação 4.

$$\text{LOQ} = 10s / S \quad \text{Equação 4}$$

A avaliação da sensibilidade foi realizada pela massa característica ( $m_0$ ), que consiste na massa de analito necessária para produzir um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s, equivalente a 1% do sinal analítico de absorção<sup>177</sup>. Este parâmetro foi calculado conforme a Equação 5, na qual  $m_0$  é a massa de analito correspondente a uma massa intermediária da curva de calibração externa e  $A_{\text{int}}$  é o valor da absorvância integrada, em segundos, produzida por esta massa do analito.

$$m_0 = \frac{\text{volume injetado } (\mu\text{L}) \times \text{concentração } (\mu\text{g L}^{-1}) \times 0,0044 \text{ (A-s)}}{A_{\text{int amostra}} - A_{\text{int branco}}} \quad \text{Equação 5}$$

A precisão do método analítico para a determinação de Se por GF AAS foi estimada em termos de repetibilidade, com medidas feitas no mesmo dia (um experimento de exposição ao Se) e de precisão intermediária, com medidas feitas em três dias diferentes (três experimento de exposição ao Se). Para este estudo, para cada réplica de experimento, três réplicas de ensaio de cada espécie de Se [Se(IV) e Se(VI)] em cada nível de concentração (0,3; 3,0 e 30,0  $\mu\text{M}$ ) foram analisadas em triplicata, sob as mesma

condições experimentais e pelo mesmo analista. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (RSD).

A exatidão do método de determinação de Se por GF AAS proposto foi avaliada por dois processos: por teste de adição e recuperação do analito e por comparação com técnica analítica de referência.

As soluções controle de 0,3; 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  de Se (preparadas como Se(IV) e Se(VI) em meio LB estéril, individualmente ou combinadas com 15  $\mu\text{M}$  Hg) foram utilizadas como testes de adição e recuperação do analito. Ressalta-se que a determinação de Se por GF AAS nestas soluções controle foi feita por análise direta, sem prévio preparo da amostra.

No sentido de avaliar a exatidão do método por comparação com técnica analítica de referência, a técnica de ICP-MS foi usada como uma técnica independente. As médias percentuais de Se bioacumulado obtidas de experimentos independentes (três réplicas para GF AAS e duas para ICP-MS) foi calculada para cada espécie e concentração de Se e então comparadas por análise variância (ANOVA). Além disso, a exatidão das medidas realizadas pela técnica de ICP-MS foi avaliada usando um material de referência certificado (NIST 1577b - Fígado bovino).

#### **4.11. Análise estatística**

A existência de diferenças significativas no crescimento celular de *E. coli* e na porcentagem de Se bioacumulado em células de *E. coli* foi avaliada por análises de variância (ANOVA), realizadas com os resultados obtidos dos experimentos de exposição de células de *E. coli* ao Se e Hg no software R v.3.6.3.

Cada avaliação foi realizada conforme o efeito a ser avaliado; diferentes espécies de Se [Se(IV) e Se(VI)] e níveis de concentração de Se (0,3, 3,0 e 30  $\mu\text{M}$ ); presença de Hg (0 e 15  $\mu\text{M}$ ); diferentes tipos de coexposição ao Se e Hg (pré e pós tratamentos) e diferentes técnicas analíticas (GF AAS e ICP-MS).

Para todas as análises, os pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias da ANOVA foram verificados com o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respectivamente. O nível de significância  $\alpha=0,05$  foi utilizado para todas as análises. Os testes de comparações múltiplas foram realizados utilizando o teste de Tukey com p-valores ajustados ao número de comparações. As tabelas geradas no software estão disponíveis em Anexo.

## 5. Resultados e discussão

Este capítulo inicia descrevendo como foi conduzida a otimização do programa de temperatura da técnica de GF AAS escolhida como método analítico para a determinação de Se em biomassa bacteriana digerida e por análise direta de sobrenadante de meio de cultivo.

No tópico seguinte, são descritas as figuras de mérito do método analítico otimizado, avaliadas por indicadores quantitativos de desempenho como sensibilidade, linearidade, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. A descrição desses parâmetros trata da eficácia e da confiabilidade do método analítico.

Posteriormente, são apresentados os resultados da bioacumulação de Se por *E. coli* após exposição ao Se nas formas de Se(IV) e Se(VI), individualmente ou combinado com Hg(II), e uma discussão sobre o efeito que a espécie e a concentração de Se, bem como a presença de Hg, exercem na bioacumulação de Se por bactérias.

Por fim, é feita uma discussão sobre o balanço de massa de Se nos experimentos de exposição, analisando a distribuição do Se entre as diferentes frações dos ensaios de interação (biomassa e sobrenadante), proporcionando uma compreensão da dinâmica do Se no sistema estudado.

### 5.1. Otimização do programa de temperatura para a determinação de Se por GF AAS

Muitas soluções aquosas podem ser analisadas segundo os parâmetros instrumentais indicados na Tabela de Condições Recomendadas fornecida pelo fabricante, disponível no manual do equipamento (PinAAcle 900T Atomic Absorption Spectrometer, Perkin Elmer). No entanto, é indicado que cada etapa do programa de temperatura seja otimizada para a determinação de um elemento em uma amostra particular, pois algumas matrizes podem requerer ajustes adicionais.

Um programa de temperatura normalmente é composto de cinco etapas: secagem, pirólise, atomização, limpeza e resfriamento. Neste estudo, as etapas de secagem, pirólise e atomização foram otimizadas com base nos parâmetros recomendados pelo fabricante do equipamento, levando-se em consideração o uso de tubos de grafite THGA com plataforma integrada.

Para a determinação de Se, as condições recomendadas são: duas etapas sequenciais de secagem, sendo a primeira a 110 °C por 20 segundos, seguida de uma segunda a 130 °C por 30 segundos, uma temperatura de pirólise de 1300 °C e uma temperatura de atomização de 1900 °C, além do uso de 5 µg de paládio (Pd) + 3 µg de magnésio (Mg) como modificador químico. Nessas condições, 20 µL de uma solução padrão de 100 µg L<sup>-1</sup> de Se (2 ng) deveriam apresentar uma absorvância integrada de 0,2 para alcançar a sensibilidade instrumental esperada, dada por uma massa característica de 45 pg, considerando uma leitura líquida de 0,0044 de absorvância.

Para otimizar o programa de temperatura, uma série de medidas de absorvância integrada foi realizada analisando dois tipos de solução padrão de Se total de 100 µg L<sup>-1</sup>. Ambas as soluções padrão foram preparada em água ultrapura com 0,2% (v v<sup>-1</sup>) de HNO<sub>3</sub>, sendo que uma dessas soluções simulou a matriz, contendo 3,75 g L<sup>-1</sup> de meio de cultura LB. Esta solução padrão teve a finalidade de representar a maior concentração de LB que poderia estar presente em amostras de sobrenadante dos meios de cultivo após diluição adequada à faixa linear, sem que afetasse significativamente o sinal analítico.

Quanto à massa de modificador químico usada na otimização do programa de temperatura, utilizou-se uma massa estabelecida em estudos prévios. Os resultados para o padrão de Se contendo 1,5 g L<sup>-1</sup> de meio de cultura LB foram melhores com uma massa de 10 µg Pd + 6 µg Mg (atingida com 5 µL de uma solução de Pd 0,2% + Mg 0,12%) em comparação com a massa recomendada de 5 µg Pd + 3 µg Mg.

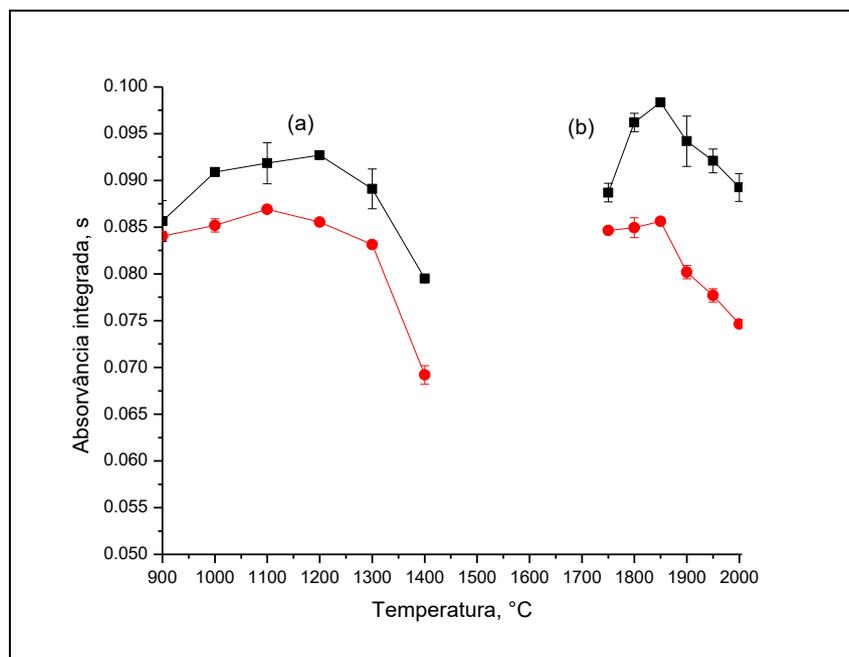
Para otimizar a etapa de secagem, que visa evaporar o solvente da amostra sem projeção de respingos, levou-se em consideração a recomendação de dividir essa etapa em duas etapas sequenciais. Assim, a remoção de vapor no interior do tubo, principalmente quando a solução padrão contendo LB (matriz) foi analisada, ocorreu nas temperaturas de secagem de 120 °C por 25 segundos e de 160 °C por 45 segundos.

As temperaturas ótimas de pirólise (Tp) e atomização (Ta) foram estabelecidas através de curvas temperatura *versus* absorvância integrada, conforme apresentado na Figura 4.

Para a construção da curva de temperatura de pirólise, foram realizadas medidas de absorvância integrada em diferentes temperaturas de pirólise (Tp), variando em torno da Tp recomendada de 1300 °C, enquanto a temperatura de atomização (Ta) foi sempre a Ta recomendada de 1900 °C.

Analisando a curva de pirólise na Figura 4, observou-se que as temperatura de pirólise que apresentaram as maiores sensibilidades (avaliada pela massa característica,

*m*<sub>0</sub>) para ambos os padrões de Se total, sem e com LB, ficaram entre 1000 e 1200 °C. Considerando que a temperatura de pirólise (*T*<sub>p</sub>) deve ser tão alta quanto possível para remover o máximo de componentes da matriz antes da etapa de atomização, sem que haja perda do analito e, portanto, sem perda de sensibilidade, optou-se por ajustar a temperatura de pirólise para 1200 °C.

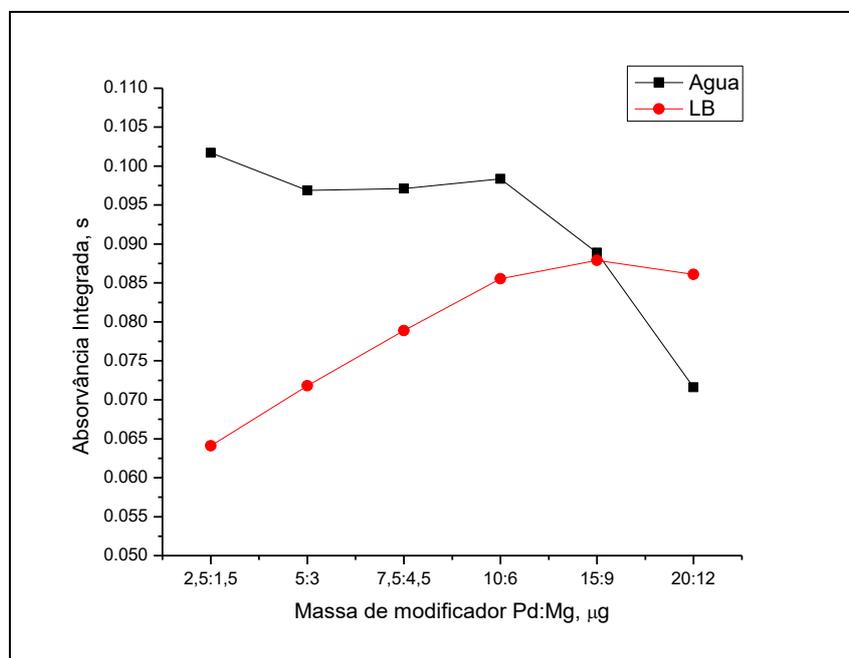


**Figura 4.** Curva de temperatura de pirólise (a) e de atomização (b) a partir de uma solução analítica de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  Se (2 ng) preparada em (■) água e em (●) LB 3,75  $\text{g L}^{-1}$ . Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ( $n = 2$ ). Condições experimentais:  $T_a$  fixa em 1900 °C;  $T_p$  fixa em 1200 °C; 10  $\mu\text{g Pd} + 6 \mu\text{g Mg}$  como modificador químico.

Para a construção da curva de temperatura de atomização ( $T_a$ ), foram realizadas medidas da absorvância integrada com a temperatura de pirólise fixada em 1200 °C, enquanto a temperatura de atomização foi variada em torno da  $T_a$  recomendada de 1900 °C.

Considerando que a temperatura de atomização ( $T_a$ ) deve ser suficientemente alta para garantir a completa volatilização do analito e proporcionar o maior sinal analítico, a análise da curva absorvância integrada *versus* temperatura (Figura 4) revelou que o ponto de máxima absorvância foi alcançado em 1850 °C para ambos os padrões de Se, sem e com LB. Portanto, a temperatura de 1850 °C foi selecionada como temperatura de atomização.

Adicionalmente, considerando que a massa de modificador químico usada para a otimização do programa de temperatura foi escolhida com base nos resultados de um estudo prévio, onde a concentração de LB nas amostras de sobrenadante era de no máximo  $1,5 \text{ g L}^{-1}$ , fez-se necessário verificar se a massa de modificador de  $10 \text{ }\mu\text{g}$  de Pd +  $6 \text{ }\mu\text{g}$  de Mg seria adequada para estabilizar o analito na presença de concentrações de LB tão altas quanto  $3,75 \text{ g L}^{-1}$ , presente nas amostras de sobrenadante de ensaios de interação posteriores. Para isso, medidas de absorvância integrada de soluções padrão de Se total de  $100 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , preparadas sem e com LB ( $3,75 \text{ g L}^{-1}$ ), foram realizadas utilizando o programa de temperatura otimizado e variando-se a massa do modificador, mantendo a proporção de 5:3 de Pd:Mg.



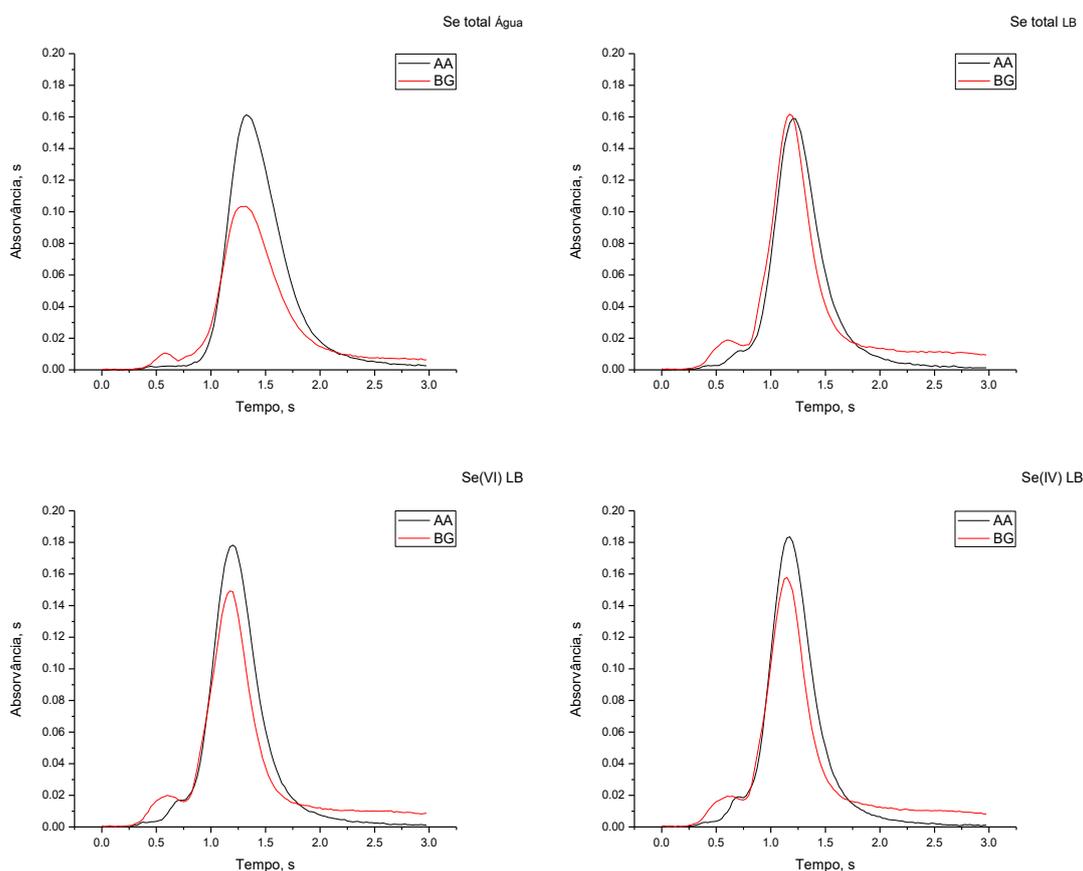
**Figura 5.** Efeito da massa de modificador químico Pd:Mg ( $\mu\text{g}$ ) a partir de uma solução padrão de  $100 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  Se ( $2 \text{ ng}$ ) preparada em (■) água e em (•) LB  $3,75 \text{ g L}^{-1}$ . Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ( $n = 2$ ). Condições experimentais:  $T_p$   $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_a$   $1850 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Analisando a curva de absorvância integrada *versus* massa de Pd:Mg na Figura 5, é possível observar o efeito da massa de modificador na estabilização do analito no tubo de grafite. A sensibilidade para Se em LB atinge um platô com a massa de modificador de  $10 \text{ }\mu\text{g}$  de Pd +  $6 \text{ }\mu\text{g}$  de Mg. No entanto, a sensibilidade para Se em água diminuiu com massas maiores do que essa. Com a massa de  $15 \text{ }\mu\text{g}$  de Pd +  $9 \text{ }\mu\text{g}$  de Mg, a sensibilidade

para Se foi a mesma para as soluções padrão sem e com LB. Contudo, com essa massa, o perfil do sinal analítico não retornava mais à linha de base. Deste modo, a massa de modificador para as determinações de Se em soluções contendo maior concentração de LB (matriz) continuou sendo a massa de 10 µg Pd + 6 µg Mg.

É válido mencionar que o Mg (5 µg) também foi testado como modificador químico, porém a sensibilidade alcançada ( $m_0 = 138$  pg) foi menor do que a obtida quando esse esteve combinado com Pd ( $m_0 = 89$  pg).

Ainda nesse estudo, foi possível verificar que o sinal analítico retornava à linha base em 3 segundos, um intervalo satisfatório para ser empregado como tempo de integração do sinal. Esse resultado pode ser observado na Figura 6, que mostra o perfil do sinal analítico do Se obtido a partir de diferentes soluções padrão.



**Figura 6.** Perfil de absorvância de Se, sinal analítico (—) e sinal de fundo (—), obtido a partir de uma solução padrão de 100 µg L<sup>-1</sup> (2 ng) de Se total em água, Se total em LB (3,75 g L<sup>-1</sup>), Se(IV) em LB (3,75 g L<sup>-1</sup>) e Se(VI) em LB (3,75 g L<sup>-1</sup>). Condições experimentais: Tp de 1200 °C, Ta de 1850 °C e 10 µg de Pd + 6 µg de Mg.

É importante ressaltar que o nível de absorção de fundo (background), que acompanhou o sinal analítico (Figura 6), foi adequadamente compensado pelo sistema de correção de absorção de fundo baseado no efeito Zeeman, tendo em vista que os valores de absorvância integrada do sinal de fundo foram inferiores a 0,8, e que as recuperações do analito variaram de 99% a 105%.

O programa de temperatura otimizado para determinação de Se por GF AAS está apresentado na Tabela 2, no tópico 4.7.

## **5.2. Avaliação de desempenho do método analítico para a determinação de Se por GF AAS**

Com o método analítico otimizado, foram analisadas as figuras de mérito, que tratam sobre a eficácia e da confiabilidade do método analítico, avaliadas por indicadores quantitativos de desempenho como linearidade, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), sensibilidade, precisão e exatidão,

A curva de calibração, estabelecida a partir de soluções padrão de Se total em um intervalo linear compreendendo concentrações do analito que variaram de 4,0 a 240  $\mu\text{g L}^{-1}$ , apresentou boa linearidade ( $R > 0,9997$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,9994$ ).

O limite de detecção (LOD) obtido foi de 0,48  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o limite de quantificação (LOQ) de 1,59  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A sensibilidade para Se foi determinada em termos de massa característica ( $m_0$ ) a partir de medidas de absorvância integrada de soluções padrão de Se total de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , preparadas sem e com LB (3,75  $\text{g L}^{-1}$ ). Valores de massa característica de 89 e 103 pg foram encontrados para o analito em água e em LB, respectivamente. Idealmente, nenhuma diferença de sensibilidade entre os padrões deveria ter sido observada, considerando que foram determinadas em temperaturas ótimas. Além disso, a sensibilidade experimental observada (89 e 103 pg) foi menor do que a sensibilidade instrumental esperada, de 45 pg/0,0044 A-s. Esse resultado ocorreu devido à absorvância integrada observada ter sido aproximadamente metade (em torno de 0,1) do valor esperado (0,2), mesmo em condições ótimas de determinação.

Adicionalmente, considerando que as formas de Se presentes nas amostras (sobrenadantes dos ensaios de interação) serão Se(IV) e Se(VI), a sensibilidade para Se foi verificada a partir de soluções padrão de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de selenito de sódio [Se(IV)] e selenato de sódio [Se(VI)] contendo 3,75  $\text{g L}^{-1}$  de meio de cultura LB. Valores de massa

característica de 94 e 92 pg foram encontrados para Se(IV) e Se(VI), respectivamente. A similaridade entre a sensibilidade para Se total em água (89 pg) e para Se(IV) (94 pg) e Se(VI) (92 pg) em LB tornou viável o uso da calibração externa com soluções padrão de Se total preparadas em água, além de possibilitar a análise direta de amostras de sobrenadante dos ensaios de interação e de soluções controle de Se (ambas contendo LB).

A Tabela 5 apresenta os resultados de linearidade, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) e sensibilidade ( $m_0$ ) obtidos com o método analítico para a determinação de Se por GF AAS.

**Tabela 5.** Figuras de mérito para a determinação de Se por GF AAS.

Regressão linear (4,0 – 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$A_{\text{int}} = - 0,0001 + 0,0011c$
$R^2$	0,9994
Limite de detecção ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,48
Limite de quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1,59
Massa característica* (pg)	89

\* Massa característica instrumental ( $m_0$ ): 45 pg

Para a avaliação da precisão e da exatidão do método analítico utilizou-se os resultados da bioacumulação de Se obtidos da determinação de Se na biomassa bacteriana por GF AAS após decomposição, que serão discutidos no tópico seguinte.

A precisão do método analítico para a determinação de Se na biomassa foi estimada em termos de repetibilidade e de precisão intermediária. Para esses estudos, três replicatas de ensaio de cada uma das espécies de Se [Se(IV) e Se(VI)] em cada um dos três níveis de concentração (0,3; 3,0 e 30  $\mu\text{M}$ ) foram analisadas em triplicata pelo mesmo analista e sob as mesmas condições experimentais.

Para a repetibilidade, foram avaliadas os valores das replicatas de um experimento feito no mesmo dia ( $n = 3$ ) e para a precisão intermediária foram avaliadas as medidas das replicatas de três experimentos feitos e analisados em dias diferentes (3 experimentos,  $n = 9$ ). Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (RSD) e apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Precisão do método para a quantificação de Se na biomassa bacteriana por GF AAS, em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Os valores representam a média de Se bioacumulado (%) juntamente com o desvio padrão relativo (RSD, %) para cada combinação de espécie e concentração de Se.

Biomassa	Repetibilidade (n = 3)		Precisão Intermediária (n = 9)		
	Média, %	RSD, %	Média, %	RSD, %	
Se(IV)	0,3 µM	18,83	7,24	18,50	7,61
	3,0 µM	5,83	3,27	6,09	4,43
	30 µM	42,45	7,05	41,13	18,81
Se(VI)	0,3 µM	17,66	4,47	17,75	5,61
	3,0 µM	5,08	5,35	5,21	9,23
	30 µM	14,57	11,62	15,82	12,34

A precisão do método analítico em termos de repetibilidade (n = 3) apresentou valores entre 3,3 – 7,2% para Se(IV) e entre 5,4 – 11,6% para Se(VI). Os resultados obtidos em termos de precisão intermediária (n = 9) foram inferiores a 12,3%, exceto para o ensaio 30 µM de Se(IV), que apresentou um desvio de 18,8%.

A precisão do método é considerada aceitável de acordo com as diretrizes da AOAC International (Association of Official Analytical Chemists)<sup>199</sup> para requisitos de desempenho de métodos padrão, que indicam uma precisão esperada (repetibilidade) de 11% dentro da faixa de concentração do analito de até 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

A exatidão do método analítico proposto foi avaliada por comparação dos resultados da bioacumulação de Se obtidos por ICP-MS, usada como técnica analítica de referência. Vale ressaltar que, para as determinações de Se por GF AAS, as amostras de biomassa foram submetidas a um método de decomposição por via úmida com aquecimento condutivo, enquanto para as determinações de Se por ICP-MS, amostras de biomassa de outros dois experimentos independentes foram submetidas a um método de decomposição por via úmida assistida por ultrassom.

Uma ANOVA foi conduzida para avaliar a existência de diferenças significativas na porcentagem média de Se bioacumulado por *E. coli* obtida pelas técnicas analíticas GF AAS (média de replicatas de 3 experimentos, n = 3) e ICP-MS (média de replicatas de dois experimentos, n = 2). Os resultados obtidos dessa análise são apresentados na Tabela 7, e a Tabela A, presente nos Anexos, contém os dados gerados.

**Tabela 7.** Exatidão do método analítico para a quantificação de Se na biomassa bacteriana por GF AAS comparado à técnica analítica de referência, ICP-MS, avaliada por análise de variância. Os valores representam o percentual médio de Se bioacumulado (%)  $\pm$  desvio padrão para cada combinação de espécie e concentração de Se.

Biomassa		GF AAS (n = 3)	ICP-MS (n = 2)	ANOVA (n = 6)
Se(IV)	0,3 $\mu$ M	18,5 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 1,4	18,9 $\pm$ 1,0
	3,0 $\mu$ M	6,1 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4
	30 $\mu$ M	41,1 $\pm$ 2,0	39,9 $\pm$ 0,4	40,5 $\pm$ 1,5
Se(VI)	0,3 $\mu$ M	17,7 $\pm$ 0,4	17,9 $\pm$ 1,1	17,8 $\pm$ 0,7
	3,0 $\mu$ M	5,2 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,1
	30 $\mu$ M	15,8 $\pm$ 1,6	13,5 $\pm$ 1,5	14,6 $\pm$ 1,8

A ANOVA (p-valor = 0,978) revelou que não houve diferença significativa entre os resultados de Se bioacumulado obtidos pelo método proposto, GF AAS, e os obtidos pela técnica independente, ICP-MS.

A exatidão da técnica de ICP-MS e, conseqüentemente, do método de decomposição assistida por ultrassom, foi previamente avaliada pela determinação de Se em material de referência padrão *NIST 1577b bovine liver*. A decomposição do material de referência foi feita nas mesmas condições de análise aplicadas às amostras de biomassa. Os resultados obtidos mostraram que não há diferença significativa entre o valor encontrado ( $0,77 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e o valor certificado ( $0,73 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (teste t,  $t_{\text{calc}} = 1,51$ ;  $t_{\text{crit}} = 4,30$ , com nível de confiança de 95%). A concordância dos resultados foi de  $105,09\% \pm 5,03\%$ .

A exatidão do método também foi avaliada para a análise direta dos sobrenadantes dos ensaios de interação (meio de cultivo LB) pelo método analítico de GF AAS, através da recuperação de Se em soluções controle de Se de cada réplica de experimento de exposição ao Se, individual e combinada com Hg(II), preparadas em duplicata e analisadas em triplicata. Essas soluções serviram como testes de adição e recuperação do analito na matriz. Os percentuais médios de Se recuperado nessas soluções controle são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores percentuais de Se recuperado nas soluções controle de Se(IV) e Se(VI) nos experimentos de exposição individual ou combinado com Hg(II). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada combinação de espécie e concentração de Se.

Soluções	Se (n = 6)		pré-tratamento (n = 4)		pós-tratamento (n = 4)	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
<b>0,3 <math>\mu</math>M</b>	101 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	100 $\pm$ 5
<b>3,0 <math>\mu</math>M</b>	99 $\pm$ 2	103 $\pm$ 1	100 $\pm$ 3	101 $\pm$ 4	101 $\pm$ 2	103 $\pm$ 3
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2	103 $\pm$ 2	105 $\pm$ 4	102 $\pm$ 1	103 $\pm$ 4

A recuperação percentual média de Se nessas soluções controle foi satisfatória para Se(IV) e Se(VI) em todos os níveis de concentração e tipos de exposição, com valores variando de 99% a 105%. Isso indica que a análise direta dos sobrenadantes do meio de cultivo pelo método de GF AAS apresenta elevada precisão e exatidão.

Portanto, os resultados dessa avaliação de desempenho comprovam que o método analítico proposto para determinação de Se por GF AAS demonstra desempenho consistente com os requisitos necessários para a análise precisa e exatada da biomassa bacteriana digerida, bem como para a análise direta do sobrenadante do meio de cultivo.

### 5.3. Bioacumulação de Se por *E. coli*

Neste tópico, serão relatados os resultados do estudo que avaliou o potencial de *E. coli* ATCC 11775 em bioacumular Se e investigou o efeito de diferentes espécies e concentrações de Se no desenvolvimento celular e na bioacumulação de Se. Também será discutido o desenvolvimento de um experimento de exposição de células de *E. coli* em diferentes condições de cultivo, incluindo a concentração inicial de células, o tempo de incubação e as concentrações e espécies de Se.

#### 5.3.1 Experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se: estudo preliminar A

Neste primeiro experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se, foram utilizadas concentrações de 30, 60 e 120  $\mu$ M de Se nas formas de Se(IV) e Se(VI).

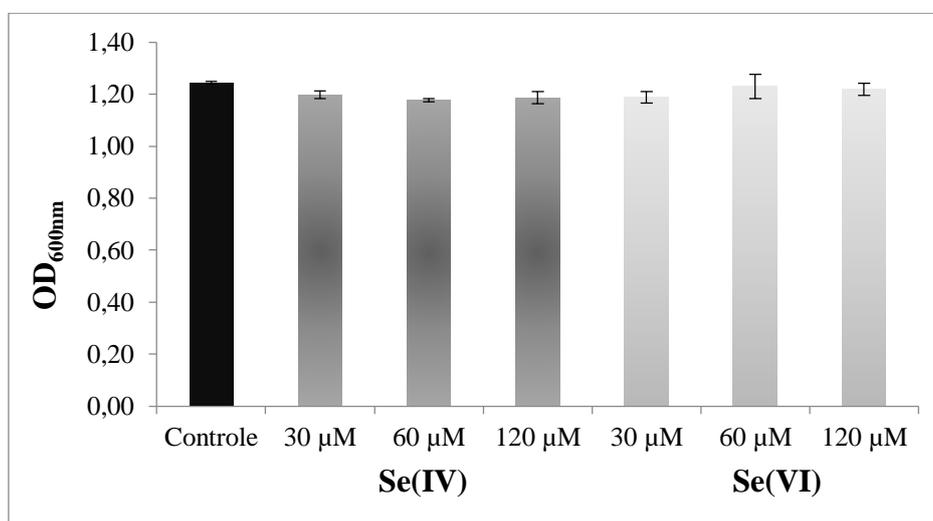
A escolha dessas concentrações foi baseada na Dose Diária Recomendada (RDA) de 55  $\mu$ g Se para indivíduos adultos, estabelecida pelo FDA<sup>32</sup>. As concentrações de Se

correspondem, respectivamente, às massas de 25, 50 e 100  $\mu\text{g}$  de Se, representando aproximadamente a metade, a dose e o dobro da RDA.

Os ensaios de interação foram preparados individualmente pela diluição de 1,0 mL de inóculo (suspensão concentrada de células) em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de meio LB estéril, resultando em uma concentração inicial de células com uma  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  que variou em torno de 0,4. Após 2 horas de incubação, o Se foi adicionado e os ensaios foram mantidos a 37 °C sob agitação por 20 h. O controle, os ensaios de interação e as soluções controle de Se foram preparados em duplicatas, e o experimento foi repetido em dias diferentes, gerando duplicata de experimentos.

Ao final de cada experimento, avaliou-se o efeito do Se(IV) e Se(VI) no crescimento celular e na bioacumulação de Se por *E. coli*.

Os resultados do crescimento celular (Figura 7) não revelaram diferenças entre os ensaios de interação com Se(IV), Se(VI) e o controle. No entanto, é importante mencionar que o método usado para avaliar o desenvolvimento celular baseia-se na medida da densidade óptica ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ), que contabiliza tanto células vivas quanto mortas, não permitindo avaliar a viabilidade celular. Portanto, não foi possível determinar se a presença de Se inibiu ou estimulou o desenvolvimento celular de *E. coli*.



**Figura 7.** Crescimento celular de *E. coli*. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes,  $n = 4$ .

Para avaliar a bioacumulação de Se, a biomassa de células foi digerida com 0,5 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  em banho-maria a  $85 \pm 5$  °C por 30 min. As amostras digeridas

foram diluídas e analisadas por GF AAS. Na Tabela 9, os resultados da bioacumulação de Se por *E. coli* estão expressos em porcentagem (%) de Se bioacumulado.

**Tabela 9.** Valores percentuais de Se bioacumulado por células de *E. coli* após exposição ao Se(IV) e Se(VI). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de um experimento, n = 2.

Biomassa	Se bioacumulado (%)	
	Se(IV)	Se(VI)
30 $\mu$ M	34,6 $\pm$ 3,4	16,3 $\pm$ 0,8
60 $\mu$ M	40,9 $\pm$ 5,6	18,1 $\pm$ 2,6
120 $\mu$ M	29,0 $\pm$ 0,5	17,2 $\pm$ 2,5

Os resultados mostram que quantidades significativas de Se, superiores a 16%, foram bioacumuladas por *E. coli* (Tabela 9). Quando as células foram expostas ao Se(IV), os valores variaram entre 29,0% e 40,9%, enquanto para Se(VI) os valores ficaram em torno de 17%. Assim, o percentual médio de Se bioacumulado na presença de Se(IV) foi duas vezes maior em comparação com Se(VI). Isso indica que a bioacumulação de Se por *E. coli* depende da espécie de Se.

Quando avaliado o efeito da concentração de Se em cada espécie, observou-se que o percentual médio de Se bioacumulado aumentou com a concentração de Se(IV) até 60  $\mu$ M, enquanto não houve diferença entre as concentrações de Se(VI). Isso indica que a bioacumulação de Se por *E. coli* depende da concentração de Se(IV), mas não de Se(VI).

Esses resultados sugerem que *E. coli* ATCC 11775 pode bioacumular quantidades significativas de Se e que tanto a espécie quanto a concentração de Se influenciam a bioacumulação de Se.

Entretanto, as variações na concentração inicial de células, devido à diluição individual no preparo dos ensaios de interação, e a avaliação imprecisa do desenvolvimento celular podem ter afetado a qualidade dos resultados. Portanto, um novo experimento foi desenvolvido para padronizar esses parâmetros experimentais.

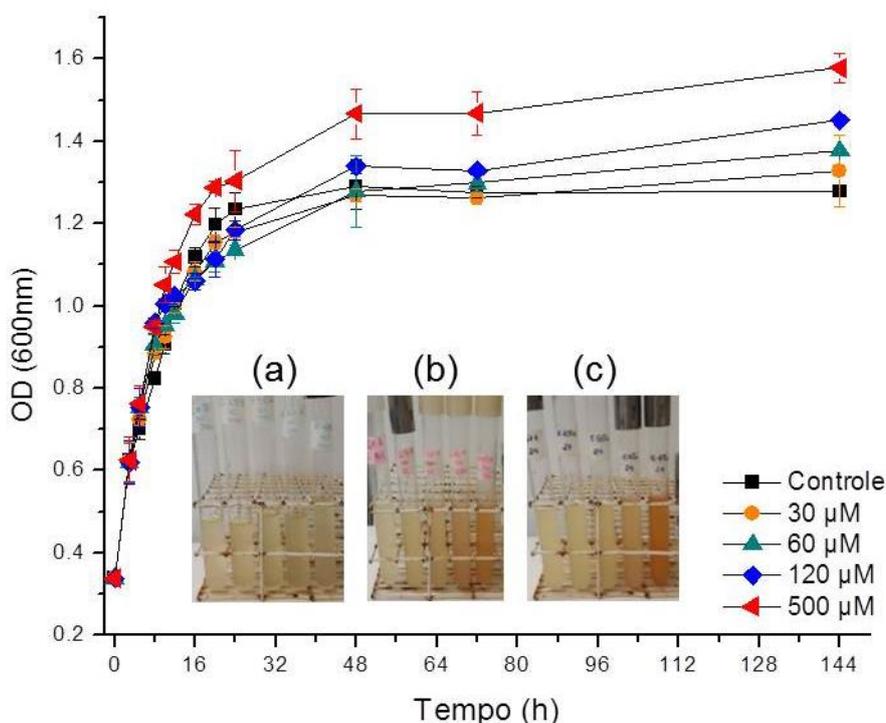
### 5.3.2 Experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se: estudo preliminar B

Para este experimento, a concentração inicial de células foi padronizada e a exposição de células de *E. coli* ao Se foi realizada com Se(IV) nas concentrações de 30, 60, 120 e 500  $\mu$ M. A concentração de 500  $\mu$ M de Se corresponde aproximadamente a

uma massa de 400  $\mu\text{g}$  de Se, que representa o limite diário máximo tolerável de Se ingerido em uma dieta para indivíduos adultos, conforme estabelecida pela WHO/FAO<sup>34</sup>.

A padronização da concentração inicial de células foi realizada diluindo o conteúdo total do inóculo em meio LB estéril até resultar em uma suspensão de células com  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0,33, a qual foi usada para preparar os ensaios.

O período de exposição bacteriana ao Se foi otimizado pela avaliação do desenvolvimento celular de *E. coli* ao longo do tempo, na ausência e na presença de 30, 60, 120 e 500  $\mu\text{M}$  de Se(IV). Para isso, curvas de crescimento celular foram obtidas a partir de medidas de  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  dos ensaios realizadas em diferentes intervalos de tempo durante um período total de 144 horas (6 dias), como mostrado na Figura 8.



**Figura 8.** Curvas de crescimento celular de *E. coli* exposta a 30, 50, 120 e 500  $\mu\text{M}$  de Se(IV) e no controle. (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 2$ ). Imagens inseridas no gráfico correspondem respectivamente ao controle e aos ensaios de interação em ordem crescente de concentração, coletados nos intervalos 0 h (a), 8 h (b) e 24 h (c) da curva de crescimento.

Considerando que o comportamento e a bioquímica celular sofrem alterações durante o desenvolvimento celular, e que isso pode ser representado por uma curva

sigmoide com até quatro fases distintas do crescimento bacteriano (*lag*, exponencial, estacionária e declínio) <sup>179,180</sup>, observou-se que as curvas de crescimento obtidas tanto para o controle quanto para os ensaios de interação com Se(IV) exibiram duas fases do desenvolvimento celular, a fase exponencial, de 0 a 20 h, e a fase estacionária, de 20 h a 144 h.

Assim, considerando que o Se é acumulado principalmente durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, devido à alta atividade metabólica e viabilidade celular<sup>65,109</sup>, foi estabelecido um tempo de incubação de células de *E. coli* na presença de Se(IV) de 16 h, visto que a partir desse ponto aparentemente inicia-se a desaceleração do crescimento exponencial.

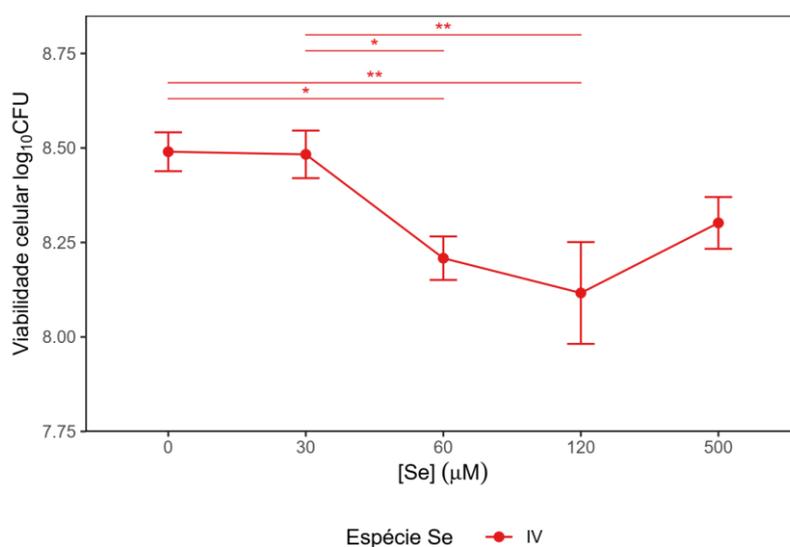
Vale ressaltar que alguns ensaios de interação de Se(IV) apresentaram valores de OD<sub>600nm</sub> maiores do que o controle, quando comparados em um mesmo intervalo de tempo, ao mesmo tempo em que uma alteração na coloração dos ensaios foi observada, como pode ser notado nas curvas e imagens na Figura 8. Na Figura 8(a), no tempo 0 h, observa-se que os ensaios de interação e o controle possuem a mesma coloração. Na Figura 8(b), em 5 h de incubação, o ensaio de interação de 500 µM de Se(IV) já apresenta alteração em relação a sua cor inicial e, ao mesmo tempo, valores de OD<sub>600nm</sub> maiores do que o controle. Na Figura 8(c), após 24 h de incubação, a coloração alaranjada é perceptível em todos os ensaios com Se(IV) e se intensifica à medida que a concentração de Se aumenta. Esta coloração alaranjada era esperada na interação entre *E. coli* + Se visto que *E. coli* é uma bactéria Se-redutora, capaz de reduzir o Se(IV) para Se elementar, Se(0), o qual possui esta coloração característica<sup>99,100</sup>. Portanto, nos casos em que os ensaios de interação apresentaram valores de OD maiores do que no controle, o aumento da turbidez foi causado pela formação de Se(0) e não pelo aumento do número de células.

Assim, definidos a concentração inicial de células (OD<sub>600nm</sub> 0,33) e o tempo de incubação (16 h), o experimento de exposição de *E. coli* a 30 a 500 µM de Se(IV) foi realizado para avaliar o efeito das concentrações de Se na viabilidade celular e na bioacumulação de Se. O experimento foi repetido em dias diferentes, gerando triplicata de experimentos.

Após 16 h de incubação a aparente formação de Se elementar foi observada nos ensaios de interação de Se(IV) pela mudança de coloração, reproduzindo o que foi observado anteriormente nas curvas de crescimento celular. Cabe ressaltar que não foram observadas alterações na coloração das soluções controle de Se(IV) (ausência de *E. coli*), quando comparadas aos seus respectivos ensaios de interação, o que demonstra que a

formação de Se elementar é resultado da redução do Se(IV) através do metabolismo de *E. coli*.

O efeito das concentrações de Se(IV) sobre o crescimento de *E. coli* foi avaliado pela viabilidade celular utilizando o método de contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Os dados obtidos, expressos como  $\log_{10}(\text{CFU mL}^{-1})$ , foram comparados por ANOVA para avaliar a existência de diferenças significativas na viabilidade celular de *E. coli* entre as diferentes concentrações de Se(IV) e o controle. Os resultados desta análise são apresentados na Figura 9, e a Tabela B, presente nos Anexos, contém os dados gerados.



**Figura 9.** Viabilidade celular média ( $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ) de *E. coli* exposta a diferentes concentrações de Se(IV). 0  $\mu\text{M}$  de Se(IV) representa o controle. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 9$ . Asteriscos representam p-valores ajustados para os testes de comparações múltiplas de Tukey. \*: p-valor  $\leq 0.05$ ; \*\*: p-valor  $\leq 0.01$ .

Os resultados da ANOVA revelaram que a viabilidade média de *E. coli* difere significativamente entre as concentrações de Se(IV) ( $F(1,13) = 9,41$ , p-valor = 0,009). O teste de Tukey não mostrou diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular entre o controle e o ensaio de interação de 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV), mesmo com a formação de Se elementar. No entanto, efeitos inibitórios no crescimento celular de *E. coli* foram observados a partir de 60  $\mu\text{M}$  de Se(IV), sendo a viabilidade celular

significativamente menor nos níveis de 60 e 120  $\mu\text{M}$  em comparação à viabilidade no controle e no ensaio de 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV).

A produção de Se elementar por células bacterianas é reconhecida como um mecanismo de resistência às altas concentrações de Se, no qual o Se(IV) é reduzido a Se elementar, insolúvel e menos tóxico<sup>63,100,114</sup>. Segundo os estudos sobre o metabolismo do Se realizados em *E. coli*, há casos em que, além da deposição de Se elementar, pode ocorrer a produção de radicais superóxido, agentes de estresse oxidativo, o que causa inibição do crescimento celular<sup>69,63</sup>. Devido a isso, a formação de Se elementar tem sido relacionada à toxicidade do Se, porém no estudo de Tetteh et al. (2014)<sup>100</sup> foi relatado que quando as culturas de *E. coli* foram tratadas com 50 a 500  $\mu\text{M}$  de Se(IV), as culturas adquirem coloração vermelha devido à formação de Se(0) sem apresentar inibição no crescimento bacteriano.

Quanto à avaliação do efeito das concentrações de Se(IV) na bioacumulação de Se, devido à presença de Se(0) na biomassa de células – identificada pela coloração alaranjada atribuída aos ensaios, a qual se intensificou com o aumento da concentração de Se(IV) – optou-se por analisar apenas os sobrenadantes dos ensaios. Dessa forma, a bioacumulação de Se foi estimada por diferença a partir do percentual de Se recuperado nos sobrenadantes analisados por GF AAS, sem preparo prévio de amostra. Os resultados expressos em porcentagem (%) de Se bioacumulado estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Valores percentuais de Se recuperado na solução controle, no sobrenadante e bioacumulado após exposição de células de *E. coli* ao Se(IV). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes.

Ensaio	% Se		
	Solução controle (n = 2)	Sobrenadante (n = 6)	Bioacumulado (n = 6)
Se(IV) 30 $\mu\text{M}$	93,9 $\pm$ 2,9	53,6 $\pm$ 3,4	46,4 $\pm$ 3,4
Se(IV) 60 $\mu\text{M}$	96,3 $\pm$ 6,7	39,4 $\pm$ 2,8	60,6 $\pm$ 2,8
Se(IV) 120 $\mu\text{M}$	95,2 $\pm$ 2,2	42,2 $\pm$ 1,5	57,8 $\pm$ 1,5
Se(IV) 500 $\mu\text{M}$	97,8 $\pm$ 0,4	25,9 $\pm$ 0,4	74,1 $\pm$ 0,4

Conforme apresentado na Tabela 10, as recuperações de Se obtidas nas soluções controle de Se foram satisfatórias em toda a faixa de concentração, 30 a 500  $\mu\text{M}$ , com

valores superiores a 94%. Em relação à bioacumulação, *E. coli* demonstrou capacidade de acumular quantidades significativas de Se, com valores superiores a 46% do Se.

Ao avaliar o efeito da concentração de Se(IV) na bioacumulação, observou-se um aumento nas porcentagens de Se bioacumulado conforme a concentração aumentava, atingindo valores de até 74%. Este resultado era esperado, considerando observações anteriores sobre a formação de Se(0).

Portanto, os resultados deste experimento demonstraram a capacidade de *E. coli* ATCC 11775 de reduzir Se(IV) a Se(0) a partir de uma concentração de 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV), bioacumulando quantidades significativas de Se e conseqüentemente removendo Se do meio. Além disso, observou-se que a concentração de Se(IV) influencia tanto a bioacumulação de Se quanto o desenvolvimento bacteriano.

Por fim, comparamos os resultados obtidos neste experimento (B) com os do experimento anterior (A) em relação ao crescimento celular e à bioacumulação de Se, a partir dos resultados de um ensaio de interação de mesma concentração e espécie de Se, neste caso, 120  $\mu\text{M}$  de Se(IV).

No experimento B, observou-se que a coloração do ensaio mudou para alaranjada após 8 h de incubação, devido à formação de Se elementar, e ao final de 16 h de incubação, a porcentagem de Se bioacumulado foi estimada em 58%. Já no experimento A, mesmo após 20 h de incubação, não houve mudança perceptível na coloração, e a porcentagem de Se bioacumulado foi de 29%, metade da obtida no experimento B. Essa diferença na bioacumulação de Se provavelmente está relacionada à produção de Se(0).

No entanto, considerando que *E. coli* é capaz de reduzir Se(IV) a Se(0) por um mecanismo de resistência a altas concentrações de Se<sup>63,100,114</sup>, era esperado que a formação de Se(0) ocorresse nos ensaios de ambos os experimentos. Comparando as condições experimentais de cada experimento, encontramos que a concentração inicial de células é um dos fatores que difere entre eles.

No experimento B, a concentração inicial de células foi menor ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,33) em comparação com o experimento A ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  em torno de 0,6, quando Se foi adicionado ao ensaio). Porém, em ambos os experimentos os ensaios atingiram uma concentração final de células em torno de 1,2 de  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ , em média. Assim, visto que diferentes concentrações iniciais de células resultaram em concentrações finais similares, pode-se inferir que esses experimentos apresentaram diferentes taxas de crescimento celular e atividade metabólica. Essas diferenças influenciaram as taxas de bioacumulação de Se, descartando a suposição de que uma maior concentração inicial de células resultaria em

um maior acúmulo de Se. Assim, essa observação não explica por que a produção de Se(0) ocorreu no experimento B e não no A.

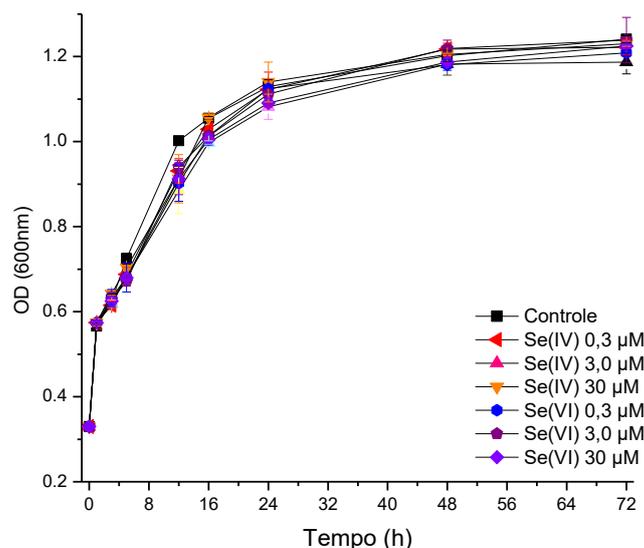
Então, a proporção entre as concentrações de Se e concentrações de células foi analisada. No experimento A, considerando que o Se foi adicionado após 2 h de ambientação e neste momento a OD<sub>600nm</sub> era de 0,6, a proporção de Se:célula (120:0,6) foi de 200. No experimento B, a proporção de Se:célula (120:0,33) foi de 360. Logo, a proporção Se:célula em B é maior do que em A e suficiente para desencadear o mecanismo de resistência resultando em produção de Se elementar e, assim, em maior taxa de Se bioacumulado.

Com base nessa comparação, concluímos que a ativação do mecanismo de resistência bacteriana ao Se, com a consequente formação de Se elementar, depende da proporção entre a concentração de Se e a concentração inicial de células. Esses resultados corroboram a hipótese de que diferentes concentrações iniciais de células podem levar a resultados distintos, mesmo quando expostas à mesma concentração de Se, e, portanto, o conceito “altas concentrações de Se” é empírico. Em síntese, esta análise demonstra como diferentes condições experimentais podem influenciar a bioacumulação de Se por *E. coli*, evidenciando a complexidade envolvida na interpretação dos resultados. Dessa forma, destaca-se a importância de realizar experimentos padronizados de exposição de células.

Assim, com base nos resultados obtidos até o momento e considerando a etapa seguinte deste estudo, que envolve investigar a influência do Hg na bioacumulação de Se por *E. coli*, foi necessário testar concentrações de Se que não causassem inibição do crescimento celular e comparar diferentes espécies de Se. Portanto, para atender a esses requisitos, três níveis de concentração, 0,3; 3,0 e 30 µM de Se, nas formas de Se(IV) e Se(VI), foram investigadas em um protocolo experimental padronizado para exposição de células.

### *5.3.3 Experimento de exposição de células de E. coli ao Se*

Primeiramente, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações, 0,3; 3,0 e 30 µM, e espécies de Se, Se(IV) e Se(VI), no crescimento celular. Para isso, curvas de crescimento celular foram obtidas (Figura 10) através de medidas de OD<sub>600nm</sub> dos ensaios de interação e controle em determinados intervalos de tempo ao longo de um período total de 72 horas.



**Figura 10.** Curvas de crescimento celular de *E. coli* no controle e na exposição a 0,3, 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV) e Se(VI). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 2$ .

Como mostra o gráfico da Figura 10, os perfis das curvas de crescimento celular obtidas, tanto para o controle quanto para os ensaios de interação, foram semelhantes ao longo de todo o período de exposição, caracterizados por duas fases distintas: fase exponencial e fase estacionária. *E. coli* atingiu a fase estacionária em aproximadamente 20 horas, e no intervalo de 16 h o controle e os ensaios de interação apresentaram diferenças mínimas no crescimento celular ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ). Neste intervalo de tempo, este padrão de crescimento foi consistente com os resultados observados no experimento preliminar B, no qual a exposição a concentrações de 30 a 500  $\mu\text{M}$  de Se(IV) foi investigada. Portanto, o período de incubação de 16 h foi considerado adequado para exposição de células de *E. coli* a baixas concentrações de Se.

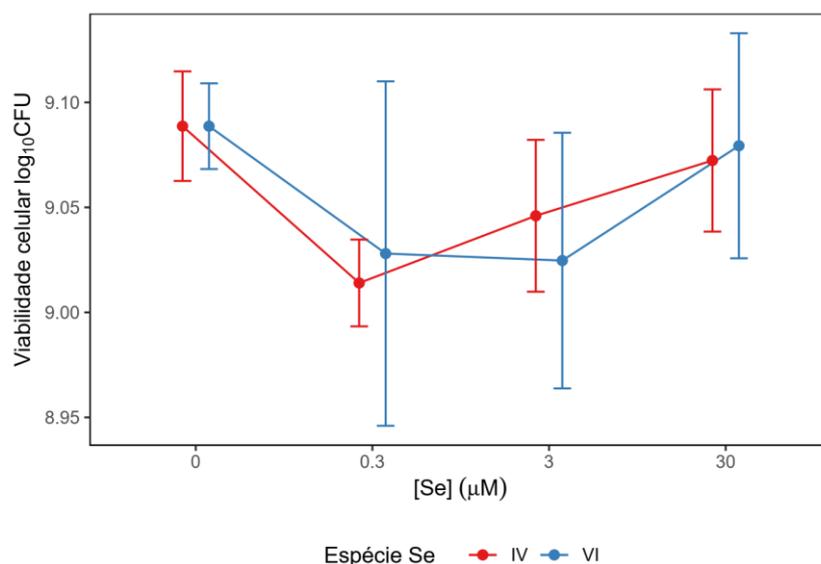
Cabe mencionar que, ao longo de todo o período avaliado, não foram encontradas diferenças significativas na  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  entre o controle e os ensaios de interação. Isso contrasta com os resultados observados nas curvas de crescimento do experimento preliminar B, onde as diferenças de  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  entre o controle e os ensaios foram correlacionados à formação de Se(0), evidenciada pela coloração alaranjada desses ensaios. No entanto, apesar de não terem sido observadas alterações na coloração, isso não significa que a redução do Se em baixas concentrações não tenha ocorrido.

Com o tempo de incubação definido (16 h), um experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se, nas formas de Se(IV) e Se(VI), em três níveis de concentração

0,3, 3,0 e 30  $\mu\text{M}$ , foi realizado. Para isso, os ensaios de interação e o controle, preparados em triplicata, e as soluções controle de Se foram incubados à 37 °C e 200 rpm por 16 h. O experimento foi repetido em dias diferentes, gerando triplicata de experimentos.

Ao final de cada experimento de exposição, o efeito da espécie e nível de concentração de Se na resposta celular de *E. coli* foi avaliado quanto ao crescimento celular e a bioacumulação de Se.

O crescimento celular de *E. coli* foi analisado a partir dos resultados obtidos no teste de viabilidade celular (CFU). Os dados obtidos, expressos como  $\log_{10}(\text{CFU mL}^{-1})$ , foram comparados por ANOVA para avaliar a existência de diferenças significativas na viabilidade celular de *E. coli* entre as diferentes espécies e concentrações de Se e o controle. Os resultados desta análise são apresentados na Figura 11, e a Tabela C, presente nos Anexos, contém os dados gerados.



**Figura 11.** Viabilidade celular média de *E. coli* em diferentes espécies e concentrações de Se. A concentração de 0  $\mu\text{M}$  de Se representa o controle. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

Como mostra a Figura 11, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-valor} = 0,941$ ) no crescimento celular de *E. coli* entre o controle (ausência de Se) e os ensaios de interação de qualquer espécie ou nível de concentração de Se. Assim, a presença de Se não teve efeito inibitório ou estimulante sobre o

crescimento celular de *E. coli* em nenhuma das espécies ou níveis de concentração estudados.

Esses resultados divergem de achados anteriores<sup>100,182</sup>, pois sendo o Se um microelemento essencial para o crescimento bacteriano, um efeito estimulante do crescimento bacteriano era esperado para Se em baixas concentrações. Segundo o estudo de Ding et al. (2010)<sup>182</sup>, em baixas concentrações (12,5 a 125  $\mu\text{M}$ ), Se(IV) promoveu o crescimento de *E. coli* induzindo a enzima formato desidrogenase para defesa biológica, enquanto que em níveis superiores a 125  $\mu\text{M}$  foi tóxico para as células bacterianas, inibindo o crescimento celular. Conforme relatado por Tetteh et al. (2014)<sup>100</sup>, concentrações de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$  de Se(IV) apresentaram um efeito estimulador do crescimento de até 30%, enquanto que em concentrações a partir de 1,0 mM, Se(IV) inibiu o crescimento celular.

A bioacumulação de Se por *E. coli* foi avaliada com base nos resultados da determinação de Se na biomassa de células digeridas e analisadas por GF AAS. Adicionalmente, a recuperação de Se nos sobrenadantes dos ensaios de interação (meio de cultivo) e nas soluções controle de Se (meio LB) foi determinada por análise direta por GF AAS. A recuperação de Se nos sobrenadantes foi determinada para fins de cálculo de balanço de massa de Se (recuperação total do Se adicionado aos ensaios), enquanto a recuperação de Se nas soluções controle teve como finalidade avaliar a exatidão do método para análise direta por GF AAS. Esses resultados são discutidos nos tópicos 5.2. e 5.5, respectivamente.

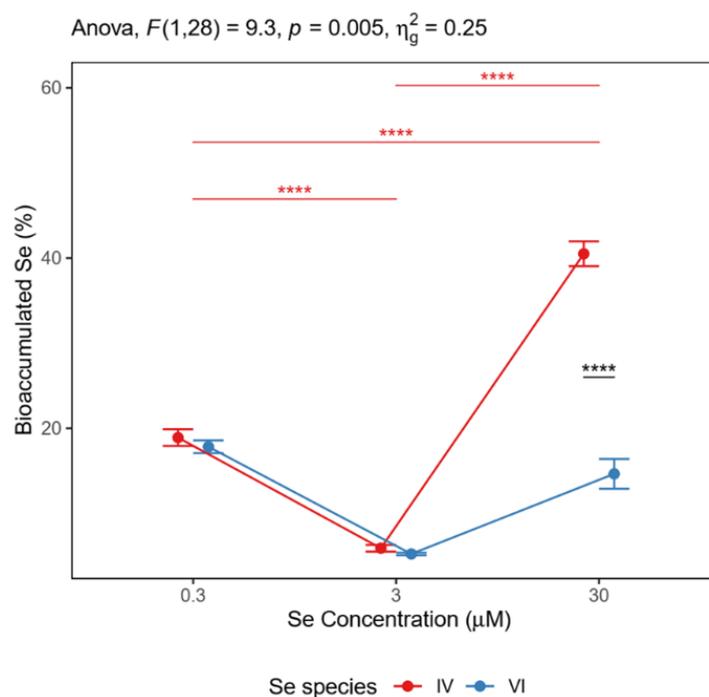
Os dados da determinação de Se nas amostras, obtidos por GF AAS em concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foram convertidos em porcentagem (%) de Se bioacumulado, conforme descrito no tópico 4.9. Os resultados, em %, de Se bioacumulado em células de *E. coli*, obtidos para cada espécie de Se, Se(IV) e Se(VI), e níveis de concentração, 0,3, 3,0 e 30  $\mu\text{M}$ , são mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Valores percentuais de Se bioacumulado em células de *E. coli* após exposição ao Se. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, n = 9.

Biomassa	% Se bioacumulado	
	Se(IV)	Se(VI)
<b>0,3 <math>\mu</math>M</b>	18,5 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,4
<b>3,0 <math>\mu</math>M</b>	6,1 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,2
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	41,1 $\pm$ 2,0	15,8 $\pm$ 1,6

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que quantidades significativas de Se foram encontradas junto à biomassa de células de *E. coli* após a exposição ao Se.

Para avaliar o efeito de cada nível de concentração e espécies de Se na bioacumulação de Se por *E. coli*, uma ANOVA, com nível de significância de  $\alpha=0,05$ , foi conduzida para verificar a existência de diferenças significativas no percentual médio de Se bioacumulado, avaliando estes dois fatores. O teste de Shapiro-Wilk mostrou que os resíduos do modelo seguem a distribuição normal (p-valor = 0,1059) e o teste de Levene foi não significativo (p-valor = 0,557), portanto as variâncias foram consideradas homogêneas entre os grupos. Os testes de comparações múltiplas foram realizados utilizando o teste de Tukey com p-valores ajustados ao número de comparações. Os resultados desta análise são apresentados na Figura 12, e a Tabela A, presente nos Anexos, contém os dados gerados.



**Figura 12.** Percentual médio de Se bioacumulado em diferentes espécies e concentrações de Se. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 9$ . Asteriscos vermelhos representam p-valores ajustados para os testes de comparações pareadas entre concentrações de Se(IV). Asteriscos pretos representam p-valores ajustados para os testes de comparações pareadas entre o percentual de Se bioacumulado na concentrações de 30  $\mu\text{M}$  de Se. \*\*\*\*\*: p-valor  $\leq 0,0001$ .

Os resultados da ANOVA indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas (p-valor = 0,005) na porcentagem média de Se bioacumulado em células de *E. coli* entre as espécies e níveis de concentração de Se testados. Além disso, a análise indicou que esta interação tem dois efeitos: o efeito da concentração de Se em cada espécie de Se e o efeito da espécie sobre cada concentração de Se.

Considerando o efeito de cada espécie de Se sobre cada nível de concentração de Se, os resultados da análise indicam que não há diferenças significativas na porcentagem média de Se bioacumulado entre as espécies de Se nas concentrações 0,3  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,853) e 3,0  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,908). Este resultado está de acordo com o estudo de Wittwer (1983)<sup>70</sup>, que demonstrou que a quantidade de Se incorporada ao tRNA de células de *E. coli* não foi afetada pela espécie de Se em baixas concentrações, de 0,5 a 10  $\mu\text{M}$ .

No entanto, a porcentagem média de Se bioacumulado na concentração de 30  $\mu\text{M}$  foi significativamente maior (p-valor ajustado  $< 0,0001$ ) para Se(IV) ( $41,1 \pm 2,0\%$ ) do

que para Se(VI) ( $15,8 \pm 1,6\%$ ), conforme indicam os asteriscos pretos na Figura 12. Este resultado é consistente com estudos anteriores, como o de Spallholz et al. (1976), que relatou que a quantidade de Se assimilada por *E. coli* foi de três a quatro vezes maior para Se(IV) do que para Se(VI)<sup>95</sup>.

Além disso, após a exposição, observou-se que o ensaio de 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV) apresentou uma coloração visivelmente mais alaranjada do que os demais ensaios de Se(IV) com concentração inferiores, semelhante a observada no experimento B anterior (30 a 500  $\mu\text{M}$  de Se), sugerindo a presença de Se elementar. Por outro lado, nenhuma mudança aparente na coloração foi observada nos ensaios de Se(VI), o que pode indicar que não houve formação de Se elementar ou que os níveis foram muito baixos.

Esses resultados estão em concordância com o que tem sido relatado na literatura sobre o metabolismo do Se em células de *E. coli* expostas a Se(IV) e Se(VI). Empiricamente, os mecanismos de redução de Se levam a dois destinos principais: incorporado à proteínas e depositado como Se elementar<sup>63</sup>. No entanto, o Se(IV) é reduzido em maior proporção (principalmente quando o destino resulta na deposição de Se elementar) do que o Se(VI), presumivelmente porque os mecanismos de captação e redução de Se(IV) são distintos daqueles para Se(VI) para *E. coli*<sup>69,72,104</sup>.

No que se refere ao efeito de cada concentração de Se sobre cada espécie de Se, observamos que não há diferenças significativas na porcentagem média de Se bioacumulado entre as diferentes concentrações de Se(VI) (p-valor = 0,092). No entanto, encontramos diferenças significativas entre as concentrações de Se(IV) (p-valor = 0,000007). O teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que a porcentagem média de Se bioacumulado nos ensaios de Se(IV) foi estatisticamente diferente entre as concentrações de 0,3 e 3,0  $\mu\text{M}$  (p-valor ajustado =  $2,90\text{e-}12$ ), entre as concentrações de 0,3 e 30  $\mu\text{M}$  (valor de p ajustado < 0,0001) e entre as concentrações de 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  (p-valor ajustado < 0,0001), conforme indicam os asteriscos vermelhos na Figura 12.

A porcentagem média de Se bioacumulado no ensaio de 30  $\mu\text{M}$  Se(IV) foi significativamente maior do que nas demais concentrações de Se(IV), sugerindo a presença de Se elementar. Este resultado está de acordo com o estudo de Tetteh (2014), que observou a presença de Se elementar na cultura de *E. coli* tratada com 50  $\mu\text{M}$  de Se(IV), indicada pela coloração alaranjada, mas não na cultura tratada com 10  $\mu\text{M}$  de Se(IV)<sup>100</sup>.

Na literatura, dentre os estudos de bioacumulação de Se por *E. coli* encontrados, a eficiência desta bactéria em bioacumular Se foi estimada apenas no trabalho de Moreno

et al. (2021). Neste estudo, conduzido em atmosfera anaeróbica, um aumento da concentração de Se(IV) de 1,0 para 2,0 mg L<sup>-1</sup> resultou em um aumento de 35 para 58% na taxa de Se bioacumulado<sup>65</sup>.

Portanto, os resultados demonstraram que tanto a espécie quanto a concentração de Se têm efeito na bioacumulação de Se por *E. coli*. Nossos dados indicam que as diferenças na bioacumulação entre as espécies de Se emergem a partir da concentração empírica de 30 µM. Além disso, a bioacumulação de Se depende da concentração de Se(IV), mas não da concentração de Se(VI).

Em síntese, os resultados deste estudo mostram que *E. coli* ATCC 11775 é capaz de bioacumular quantidades significativas de Se, similarmente a muitos microrganismos Se-redutores. Além disso, os resultados indicam que a presença de Se no meio de cultivo não tem efeito na viabilidade de *E. coli*. No entanto, a bioacumulação de Se por *E. coli*, depende tanto da espécie quanto da concentração de Se às quais as células são expostas.

#### **5.4. Bioacumulação de Se por *E. coli* na presença de Hg**

Neste experimento, foi investigado o efeito da presença de Hg(II) na bioacumulação de Se por *E. coli*. Para isso, foram realizados experimentos de coexposição de células de *E. coli* ao Se e Hg, tanto em pré-tratamento com Se quanto em pós-tratamento com Se, utilizando as mesmas condições experimentais do experimento de exposição individual ao Se – com concentrações de 0,3; 3,0 e 30 µM de Se(IV) ou Se(VI).

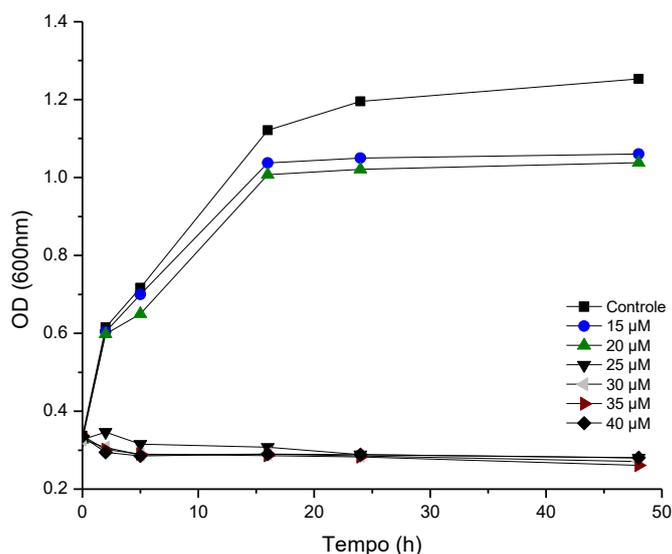
Necessariamente, para avaliar o efeito do Hg na bioacumulação de Se por *E. coli*, foi conduzido um experimento de exposição de células de *E. coli* ao Hg. A exposição individual ao Hg teve como objetivo determinar a concentração de Hg(II) a ser usada nos experimentos de coexposição com Se, além de avaliar o efeito individual do Hg no crescimento celular de *E. coli*, para fins de comparação.

##### *5.4.1 Experimento de exposição de células de *E. coli* ao Hg*

Primeiramente, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de Hg no crescimento celular para definir uma concentração adequada de Hg para os subsequentes experimentos de coexposição com Se.

Para realizar esta primeira investigação, curvas de crescimento celular foram obtidas (Figura 13) através de medidas de OD<sub>600nm</sub> de ensaios de interação *E. coli* + Hg

nas concentrações de 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{M}$  de Hg(II), realizadas em determinados intervalos de tempo ao longo de um período total de 48 horas.



**Figura 13.** Curvas de crescimento celular de *E. coli* no controle e na exposição ao Hg(II) na faixa de concentrações de 15 a 40  $\mu\text{M}$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 2$ .

A análise das curvas de crescimento celular (Figura 13) revela uma clara diferença entre as concentrações de Hg testadas. Os perfis das curvas de crescimento de *E. coli* no controle e nos ensaios de interação de 15 e 20  $\mu\text{M}$  de Hg(II) apresentaram-se semelhantes ao longo do período de incubação, exibindo desenvolvimento celular regular com fase exponencial e estacionária bem definidas. No entanto, o crescimento de *E. coli* nessas concentrações de Hg não alcançou os mesmos níveis ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) observados no controle. Isso sugere que as concentrações de 15 e 20  $\mu\text{M}$  de Hg(II) são subinibitórias, uma condição subtóxica onde o Hg não inibe completamente o crescimento, permitindo o desenvolvimento regular das células, mas reduzindo a taxa de crescimento em comparação ao controle.

Por outro lado, nos ensaios de interação com concentrações de 25 a 40  $\mu\text{M}$  de Hg(II), o crescimento celular foi completamente inibido, sem recuperação da viabilidade celular ao longo de 48 horas, conforme evidenciado pelas curvas de crescimento. (Figura 13). Isso sugere que concentrações de Hg a partir de 25  $\mu\text{M}$  são tóxicas para as células de *E. coli*.

Dessa forma, os efeitos tóxicos induzidos por Hg sobre *E. coli* foram observados em toda a faixa de concentração testada, de 15 a 40  $\mu\text{M}$ , em comparação com o crescimento ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) de *E. coli* no controle. No entanto, o desenvolvimento celular regular demonstrou a resistência de *E. coli* ao Hg em concentrações subinibitórias de até 20  $\mu\text{M}$  de Hg(II).

Na literatura, um dos mecanismos de resistência bacteriana ao Hg é atribuído ao *merA* (redutase mercúrica), um dos genes do operon *mer* responsável pela redução enzimática de Hg(II) a Hg(0) volátil, que se difunde livremente para fora da célula<sup>116</sup>.

Neste sentido, foi encontrado estudos com isolados ambientais e clínicos de *E. coli* resistentes a altas concentrações de Hg(II), de 30 até 300  $\mu\text{M}$ , em que o mecanismo de resistência foi atribuído a volatilização do Hg(II) por ação do *merA* localizados em plasmídeos<sup>183-187</sup>. Nesta perspectiva, realizamos uma pesquisa na plataforma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)<sup>188</sup> no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o resultado indicou a ausência do gene *merA* no genoma de *E. coli* ATCC11775, usada em nosso estudo.

Recentemente, um estudo sobre biorremediação de Hg utilizando *E. coli* (GIM1.223) se intitulou como sendo o primeiro a relatar a remoção de Hg(II) por esta bactéria. Segundo os autores, *E. coli* exposta a 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  reduziu o Hg(II) a Hg(0), no entanto, o mecanismo envolvido não foi citado<sup>156</sup>.

No entanto, mecanismos de resistência de células de *E. coli* ao Hg, alternativos ao *merA*, têm sido propostos. Thomas et al. (2017) sugeriram que a volatilização do Hg(II) em culturas de *E. coli* ATCC 25922 expostas a 0,5  $\mu\text{M}$  Hg(II) pode ter ocorrido via citocromos tipo x<sup>189</sup>. Por outro lado, Colaço et al. (2016) sugeriram que a metaloproteína ZinT poderia desempenhar um papel no sequestro intracelular de Hg(II), induzindo um sistema de efluxo de Hg que reduz a toxicidade do metal<sup>190</sup>. Além disso, estudos indicam que cepas como *E. coli* K-12<sup>191</sup> e *E. coli* O55 (ATCC 12014)<sup>192</sup> empregam um mecanismo adaptativo de resistência para sobreviver ao Hg(II), atribuído aos polissacarídeos extracelulares (EPS). Esses EPS parecem se ligar eficazmente aos íons de mercúrio em solução, tornando-os ineficazes em perturbar os processos bioquímicos normais da célula.

Para compreender a relevância da resistência de *E. coli* ATCC 11775 ao Hg, analisamos na literatura a resistência de cepas de *E. coli* descritas como não portadoras de genes *mer*. Encontramos relatos de resistência a concentrações de Hg(II) semelhantes às do nosso estudo (20  $\mu\text{M}$ ) em cepas como *E. coli* K-12<sup>193</sup>, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>187</sup> e uma cepa não especificada de *E. coli*<sup>194</sup>. No entanto, em um outro estudo, a

mesma cepa de *E. coli* ATCC 25922 mostrou-se sensível a concentrações superiores a 5,0 µM de Hg(II)<sup>184</sup>. Por outro lado, para a cepa de *E. coli* GIM1.223, a menor dose sem efeito inibitório observável no crescimento bacteriano foi de 40 µg L<sup>-1</sup> (> 0,2 µM), enquanto em 80 µg L<sup>-1</sup> (> 0,4 µM) o crescimento foi completamente inibido.<sup>156</sup>

Além disso, consideramos os índices de concentração de Hg(II) presentes em diversos tipos de águas naturais<sup>135</sup>, que variam entre 0,73 ng L<sup>-1</sup> a 20,3 µg L<sup>-1</sup>, para destacar a relevância da resistência de *E. coli* a concentrações de Hg(II) tão altas quanto 20 µM (4,0 mg L<sup>-1</sup>).

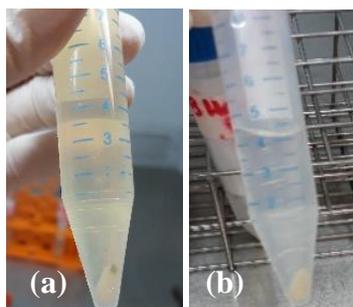
Assim, podemos considerar que *E. coli* ATCC 11775 demonstrou resistência a uma quantidade expressiva de Hg, sugerindo seu potencial para biorremediação em ambientes aquáticos mesmo que contaminados por Hg(II). No entanto, é importante considerar que a indução dos mecanismos de resistência pode ser influenciada por fatores ambientais e experimentais sob estudo.

Diante do exposto, e considerando que a concentração de 20 µM de Hg(II) encontra-se no limiar entre a resistência e a sensibilidade das células de *E. coli* ao Hg, optou-se por utilizar a concentração de 15 µM de Hg(II) nos experimentos subsequentes de exposição de células de *E. coli*, tanto individualmente quanto na coexposição com Se.

Cabe salientar que, na concentração de 15 µM de Hg(II), conforme observado na curva de crescimento na Figura 13, *E. coli* apresentou crescimento exponencial até 16 h. Portanto, um período de incubação de 16 h também é adequado para a exposição ao Hg.

Dessa forma, um experimento de exposição de células de *E. coli* a 15 µM de Hg(II) foi realizado. O experimento foi repetido em dias diferentes, gerando triplicata de experimentos.

Ao final do experimento, durante a etapa de coleta das amostras, observou-se um precipitado de cor escura junto à biomassa após a centrifugação que separou a biomassa do meio de cultivo. No entanto, este precipitado aparentemente não persistiu ou foi dispersado após a lavagem da biomassa com solução tampão fosfato. As imagens da Figura 14 mostram a biomassa resultante desses procedimentos, utilizadas para fins de comparação.



**Figura 14.** Biomassa do ensaio de 15  $\mu\text{M}$  de Hg: (a) após centrifugação para separar as células do meio de cultivo; (b) após lavagem da biomassa com solução tampão fosfato.

Este efeito já foi relatado em trabalhos anteriores, o qual é atribuído a formação do composto HgS insolúvel, após exposição a concentrações subinibitórias de Hg(II). Foi relatado que durante a fase exponencial de crescimento, *E. coli* degrada a cisteína, presente no meio de cultivo, em sulfeto. Essa biossíntese de sulfeto pode promover a formação de espécies Hg(II)-sulfeto dissolvidas e particuladas<sup>142,156,161,189</sup>.

A avaliação do efeito do Hg no crescimento de *E. coli* foi realizada por teste de viabilidade celular, que se baseia na contagem de unidades formadoras de colônias (CFU), conforme descrito no tópico 4.5. Os dados, expressos em termos de  $\log_{10}(\text{CFU mL}^{-1})$ , foram comparados com os dados dos demais tipos de exposição por análise estatística. Esses resultados estão apresentados na Figura 15, no tópico 5.4.2.

A presença de 15  $\mu\text{M}$  de Hg(II) no meio de cultivo resultou em uma diminuição significativa na viabilidade de *E. coli*, corroborando a toxicidade induzida por Hg nesta concentração observada anteriormente pela curva de crescimento celular.

Para avaliar a recuperação total de Hg adicionado aos ensaios, o conteúdo de Hg nas amostras de biomassa (conteúdo total), sobrenadante e soluções controle de Hg foi determinado por ICP-MS após decomposição assistida por ultrassom. Os dados de determinação de Hg nas amostras, obtidos em concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foram convertidos em porcentagem (%) de Hg recuperado.

A porcentagem média de recuperação total de Hg adicionado aos ensaios de interação foi de 96,2%. Do total,  $94,7 \pm 2,8\%$  foi recuperado no sobrenadante, enquanto  $1,5 \pm 0,7\%$  foi encontrado junto a biomassa de células, ( $n = 3$ ).

Na literatura, encontramos evidências de que o acúmulo e a retenção de Hg por cepas não modificadas de *E. coli* estão relacionados à sua afinidade substancial com grupos sulfidríla. Isso permite que o Hg se associe fortemente com tióis de uma variedade de proteínas funcionais, considerando a ampla ocorrência de cisteínas em praticamente

todas as proteínas de *E. coli*. Essas proteínas, uma vez modificadas de forma estável, são inativadas pelo Hg<sup>195</sup>. Isso exemplifica os mecanismos de toxicidade induzida por Hg para os microorganismos. Dentre esses mecanismos, destacam-se o deslocamento de metais essenciais, como zinco<sup>189,190,196</sup> e cobre<sup>197</sup> de sítios ativos de proteínas (metalotioneínas), além da modulação da expressão gênica de proteínas e da associação do Hg a proteínas específicas, como a piruvato quinase<sup>194,198</sup>.

Além disso, Troung et al. (2013) sugeriram que a presença de altas concentrações de sulfetos dissolvidos no meio de cultivo resultou em uma diminuição da concentração de Hg no sobrenadante e em um aumento da porcentagem de Hg na biomassa, possivelmente resultado da formação de HgS<sub>(s)</sub><sup>161</sup>.

No entanto, há uma escassez de estudos que quantificaram o conteúdo de Hg associado às células bacterianas. O estudo de Wang et al. (2018), revelou que 2,2% do Hg adicionado (40 µg L<sup>-1</sup>, equivalente a 0,2 µM) foi encontrado junto à biomassa de células de *E. coli*, sendo 1,1% adsorvido na superfície celular e 1,1% intracelular<sup>156</sup>. Este resultado concorda com os achados do nosso estudo, onde observamos que 1,5% do Hg adicionado foi associado à biomassa de células.

Segundo as diretrizes da AOAC<sup>199</sup> para requisitos de desempenho de métodos padrão, um índice de 96,2% de recuperação total de Hg pode ser considerado aceitável para a faixa de concentração de analito estudada (15 µM de Hg equivale a 3,0 mg L<sup>-1</sup>).

Portanto, este estudo demonstrou que *E. coli* ATCC 11775 apresenta resistência a uma quantidade significativa de Hg, 20 µM. Além disso, a presença de Hg na biomassa foi detectada por ICP-MS, assim como foi observada a presença de um precipitado de cor escura associado à biomassa. Recomenda-se, neste caso, investigações em estudos futuros a fim de explorar sistematicamente essas descobertas.

Além disso, o experimento de exposição de células com 15 µM de Hg(II) proporcionou uma base comparativa valiosa para o estudo subsequente de coexposição com Se.

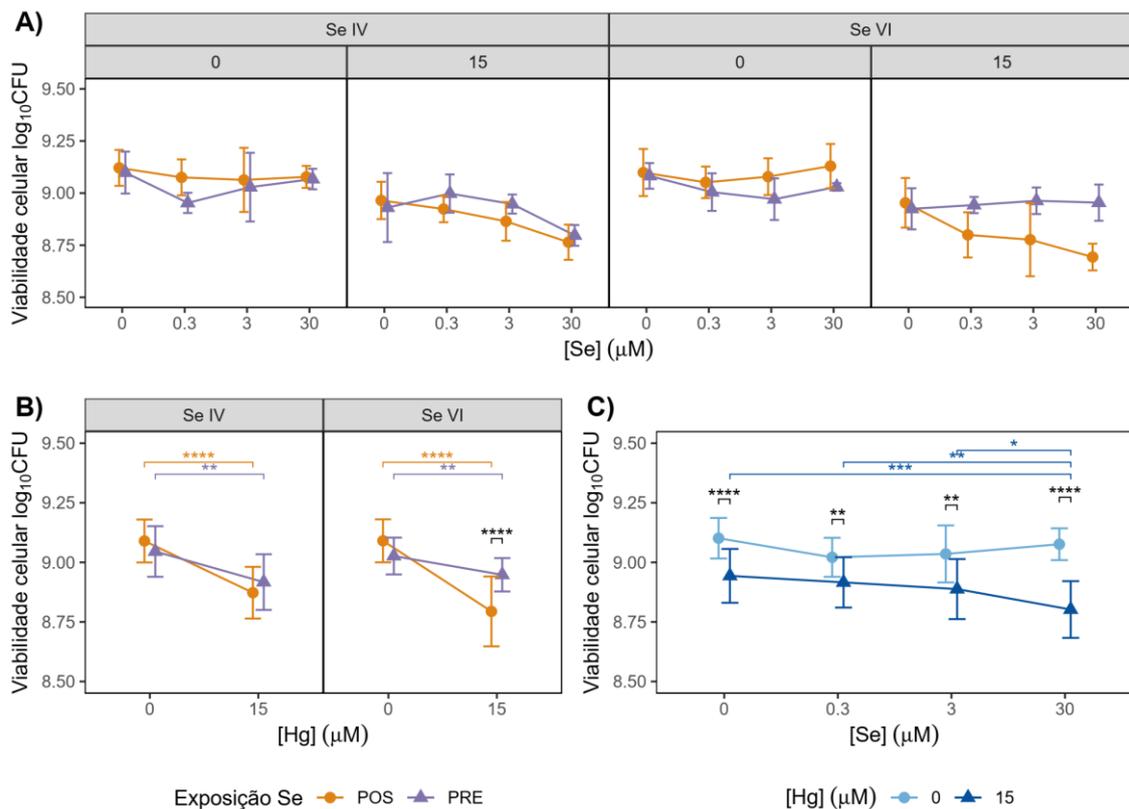
#### 5.4.2 Experimentos de coexposição de células de *E. coli* ao Se e Hg

Para a realização do experimento de coexposição de células de *E. coli* ao Se e Hg, as condições experimentais e as relativas à espécies e concentrações de Se e Hg foram as mesmas usadas nos respectivos experimentos de exposição individual. Além disso, a coexposição foi testada em duas diferentes ordens de exposição das células aos elementos, chamadas de pré-tratamento com Se e pós-tratamento com Se.

No pré-tratamento, as células de *E. coli* foram inicialmente expostas apenas ao Se (pré-tratadas) por um período de 2 h e na sequência foram expostas ao Hg, totalizando um período de 16 h de exposição, sendo 14 h de coexposição. Para o pós-tratamento, apenas a ordem de exposição aos elementos foi invertida, as células de *E. coli* foram expostas primeiramente apenas ao Hg e na sequência expostas ao Se. Cada experimento de coexposição foi repetido em dias diferentes, gerando duplicata de experimentos.

O crescimento celular (dados coletados por contagem de colônias expressos como  $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>) e a bioacumulação de Se (determinação de Se na biomassa por GF AAS) foram os parâmetros avaliados ao final de cada experimento de coexposição.

Para avaliar os efeitos conjuntos do Se e Hg sobre o crescimento celular de *E. coli*, os mesmos foram comparados aos seus efeitos individuais. Para isso, uma ANOVA foi conduzida para verificar a existência de diferenças significativas no crescimento celular de *E. coli* de acordo com quatro diferentes fatores: concentrações de Se (0; 0,3; 3,0 ou 30  $\mu$ M), concentrações de Hg (0 ou 15  $\mu$ M, ou seja, ausência ou presença de Hg, respectivamente), ordem de coexposição (pré ou pós-tratamento) e espécies de Se (Se(IV) ou Se(VI)). O teste de Shapiro-Wilk mostrou que os resíduos do modelo seguem a distribuição normal (p-valor=0,384) e o teste de Levene foi não significativo (p-valor=0,866), portanto as variâncias foram consideradas homogêneas entre os grupos. Os resultados da análise de variâncias são mostrados na Figura 15.



**Figura 15.** Viabilidade média (log<sub>10</sub> CFU) de *E. coli* sob diferentes espécies de Se (Se(IV) e Se(VI)), concentrações de Se (0, 0,3, 3,0 e 30 µM), concentrações de Hg (0 e 15 µM), e ordem de coexposição (pré e pós-tratamento). A concentração de 0 µM representa o controle. Viabilidade média de *E. coli* para (A) todas as combinações entre os quatro fatores, (B) na interação entre espécie de Se, ordem de coexposição e concentração de Hg e (C) na interação entre as concentrações de Se e de Hg. Asteriscos representam p-valores ajustados para os testes de comparações múltiplas de Tukey. \*: p-valor ≤ 0,05; \*\*: p-valor ≤ 0,01; \*\*\*: p-valor ≤ 0,001 e \*\*\*\*: p-valor ≤ 0,0001.

Os resultados da ANOVA indicam que não houve interação envolvendo todos os quatro fatores avaliados (p-valor = 0,228) sobre crescimento celular de *E. coli*.

No entanto, como indicado na Figura 15(B), há interação entre espécie de Se, a ordem de coexposição e a concentração de Hg (p-valor = 0,043). Os dados gerados dessa análise estão disponíveis na Tabela D, presente nos Anexos. Os testes de comparações múltiplas (Tukey) revelaram que, para ambas as espécies de Se, a presença de Hg tem efeito negativo significativo no crescimento celular em ambas as ordens de coexposição, pré (p-valor ≤ 0,01) e pós (p-valor ≤ 0,0001), conforme indicam os asteriscos coloridos. Além disso, o teste também mostrou que com a espécie Se(VI) houve

um efeito inibitório significativamente maior (p-valor  $\leq 0,0001$ ) no pós-tratamento do que no pré-tratamento, conforme indicam os asteriscos pretos.

A ANOVA também indicou que há interação entre concentração de Se e concentração de Hg (p-valor = 0,003), como se observa na Figura 15(C). Os dados gerados dessa análise estão apresentados na Tabela E, disponível nos Anexos. Os testes de Tukey mostraram que o crescimento celular foi significativamente menor (p-valor  $\leq 0,01$ ) na presença de 15  $\mu\text{M}$  de Hg em cada um dos níveis de concentração de Se, conforme indicam os asteriscos pretos. O teste também revelou que a coexposição de Hg com 30  $\mu\text{M}$  de Se tem efeito negativo significativamente maior sobre a viabilidade (p-valor  $\leq 0,05$ ) em comparação com os demais níveis de coexposição com Se e até mesmo em comparação com a exposição individual a Hg (0  $\mu\text{M}$  de Se + 15  $\mu\text{M}$  de Hg), conforme indicam os asteriscos azuis, evidenciando o efeito sinérgico desta interação.

Esses resultados não estão totalmente de acordo com a maior parte dos estudos anteriores sobre as interações entre Se e Hg, que relatam o efeito antagônico de Se em relação ao Hg nos mais diversos organismos. Por exemplo, estudos mostraram um efeito protetor significativo do Se contra o Hg em alho tratado com baixas dosagens de Se(IV) e altos níveis de Hg(II)<sup>149</sup>, em células de *P. fluorescens* expostas a 0,5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) e 12,7 ou 127  $\mu\text{M}$  de Se(IV)<sup>158</sup>, e em *C. elegans*, especialmente sob altas dosagens de Se, sem diferenças significativas entre as espécies de Se(IV) e Se(VI)<sup>200</sup>.

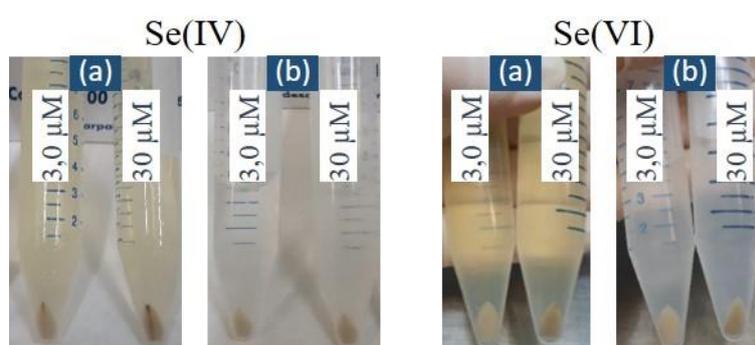
Por outro lado, trabalhos relataram que o Se não produziu qualquer efeito benéfico significativo sobre a toxicidade do Hg. Em células K-562 (eritroleucemia humana) expostas a 5 ou 50  $\mu\text{M}$  de Se(IV) e 35  $\mu\text{M}$  de HgCl, observou-se uma clara inibição do crescimento celular, sem diferença significativa dos tratamentos apenas com Hg<sup>201</sup>. O mesmo foi observado em cianobactérias expostas com 0,1 a 20  $\text{mg L}^{-1}$  de Se(IV) e 0,5 a 5  $\text{mg L}^{-1}$  de Hg(II)<sup>202</sup>. No estudo de Cheng-bin Liu (2018) com *T. malaccensis* verificou-se que, na coexposição a dosagens de 10  $\mu\text{M}$ , o Se não diminuiu significativamente a toxicidade do Hg, porém uma diminuição significativa da toxicidade foi observada sob a coexposição a dosagens altamente tóxicas de Hg e Se<sup>157</sup>.

Além de o Se não apresentar efeito protetivo contra a toxicidade do Hg, observou-se na coexposição do Hg com 30  $\mu\text{M}$  de Se que a inibição do crescimento de *E. coli* foi significativamente maior do que na exposição individual ao Hg, revelando o efeito sinérgico tóxico desta combinação. É importante ressaltar que, na exposição individual a 30  $\mu\text{M}$  de Se (tópico 5.3.3), não houve inibição do crescimento; no entanto, a produção de Se(0) revelou um processo de desintoxicação de Se por *E. coli*.

A literatura oferece poucos exemplos de efeito sinérgico negativo na interação entre Se e Hg, especialmente em bactérias. Por exemplo, em *D. desulfuricans*, comparado aos grupos controle, uma diminuição significativa no crescimento foi observada quando cultivada com 0,5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) e 6,3  $\mu\text{M}$  de Se(IV), a qual foi atribuída a um possível efeito tóxico do Se em altas concentrações<sup>161</sup>. Além disso, em estudos com zebrafish, a combinação de níveis elevados de Se e Hg teve um efeito sinérgico negativo em todos os aspectos da reprodução, em comparação a grupos alimentados com níveis elevados de apenas um dos elementos<sup>155</sup>.

Portanto, em síntese, os resultados deste estudo demonstram que o Se, independentemente da espécie, notavelmente não protege *E. coli* da toxicidade induzida por Hg, inclusive, em uma concentração tão alta quanto 30  $\mu\text{M}$ , o Se em conjunto com Hg pode causar um efeito sinérgico negativo sobre o crescimento celular de *E. coli*.

Posteriormente, da mesma forma como ocorreu na exposição individual ao Hg (Figura 14), durante a etapa de coleta das amostras de biomassa, um precipitado de cor escura foi observado junto à biomassa de células centrifugada, mas este aparentemente não persistiu ou foi dispersado após a lavagem da biomassa com solução tampão fosfato. A biomassa resultante desses procedimentos está representada nas imagens da Figura 16, para fins de comparação. Tal precipitado não foi observado no controle (apenas *E. coli*) nem nas soluções controle de Se e Hg (sem *E. coli*), mostrando que este precipitado é resultante da interação entre *E. coli* e os elementos.



**Figura 16.** Ensaios do experimento de coexposição de células de *E. coli* ao Se e Hg, nas combinações de Hg com 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV) e Se(VI) no pré-tratamento, após (a) centrifugação para separar as células do meio de cultivo e (b) lavagem da biomassa com solução tampão fosfato (PBS).

É importante ressaltar que a cor escura observada na biomassa dos ensaios de coexposição contrasta com a coloração alaranjada observada na biomassa dos ensaios de exposição individual ao Se (Figura 8), especialmente com 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV), resultado da redução de Se(IV) a Se(0) por *E. coli*, como parte de seu processo de desintoxicação de Se. Portanto, em conjunto, esses resultados sugerem uma modificação na via biológica de desintoxicação de Se por *E. coli* na presença de Hg.

Mudanças na aparência da biomassa de células bacterianas, após a coexposição com Se e Hg, são relatadas na literatura como resultado da formação de um composto HgSe. Em uma cultura de *P. fluorescens* exposta a Hg(II) e Se(IV), a formação biológica de Se(0) foi bastante diminuída, conforme observado pelo desbotamento da coloração avermelhada<sup>158</sup>. Um estudo posterior comprovou que compostos não reativos de Hg–Se, com razão molar próxima a 1, foram formados sob a mediação de *P. fluorescens* quando exposta a Hg(II) e Se(IV), sugerindo que o Se foi utilizado para capturar Hg na formação de compostos HgSe estáveis<sup>159</sup>.

Em culturas de *D. sulfuricans*, foi sugerido que a capacidade dessa bactéria em reduzir Se(IV) a seleneto [Se(II-)] favorece a reação entre o Se [como Se(II-)], e o Hg(II), resultando na formação de HgSe. Os autores também observaram que o Se(0) vermelho foi localizado no citoplasma, enquanto o HgSe cinza escuro foi localizado na superfície da membrana celular, o que mascarou a cor avermelhada do Se(0) no citoplasma<sup>161</sup>. Em um estudo subsequente, Truong et al. (2014), confirmaram que o composto HgSe formado por *D. desulfuricans*, por ser inerte e insolúvel, pode efetivamente diminuir a biodisponibilidade de Se e impedir a entrada de Hg na célula, reduzindo inclusive a biodisponibilidade de Hg para biometilação<sup>160</sup>.

Em relação à bactéria *E. coli*, foi encontrada uma publicação recente que sugeriu que, uma vez dentro da célula, o Hg(II) poderia capturar o Se(II-) resultando na formação de partículas precipitadas de HgSe<sup>156</sup>. De fato, *E. coli* é capaz de converter Se(IV) em Se(II-) durante processos biológicos e pode ainda posteriormente transformar o Se(II-) em Se(0)<sup>63</sup>. Assim, é possível que parte do Se, como Se(II-), possa ter sido capturada pelo Hg(II) e, portanto, a formação de HgSe no presente estudo ser resultante da interação entre *E. coli* e esses elementos.

Dessa forma, podemos inferir que o composto HgSe pode ter imobilizado parte do Se disponível e, nesse contexto, conforme sugerido em estudos anteriores, o sequestro de Se pelo Hg pode ocorrer e diminuir o “pool” de Se metabolicamente ativo para a síntese de selenoproteínas e acarretar em perda do efeito protetivo do Se contra a toxicidade do

Hg, pode ajudar a explicar o efeito sinérgico negativo no crescimento de *E. coli*, relatado no presente estudo<sup>203,204</sup>.

Posteriormente, para avaliar o efeito do Hg na bioacumulação de Se, as amostras de biomassa foram digeridas e analisadas por GF AAS para a quantificação de Se. Adicionalmente, para fins de cálculo de balanço de massa de Se, o conteúdo de Se recuperado nos sobrenadantes dos ensaios e nas soluções controle de Se e Hg foi determinado por GF AAS por análise direta, sem etapa prévia de decomposição. Os resultados do balanço de massa serão discutidos posteriormente no tópico 5.5.

Para avaliar a bioacumulação de Se por *E. coli* na coexposição, os dados da determinação de Se nas amostras, obtidos em concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foram convertidos em porcentagem (%) de Se bioacumulado. Os resultados obtidos para cada espécie de Se, nível de concentração de Se e ordem de coexposição, são mostrados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Valores percentuais de Se bioacumulado em células de *E. coli* após coexposição ao Se e Hg. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes,  $n = 7$ .

Biomassa	% Se bioacumulado			
	pré-tratamento		pós-tratamento	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
<b>0,3 <math>\mu\text{M}</math></b>	25,6 $\pm$ 0,1	22,0 $\pm$ 2,4	21,3 $\pm$ 0,8	24,9 $\pm$ 2,6
<b>3 <math>\mu\text{M}</math></b>	17,4 $\pm$ 0,9	13,7 $\pm$ 1,6	18,3 $\pm$ 2,0	15,2 $\pm$ 0,8
<b>30 <math>\mu\text{M}</math></b>	15,2 $\pm$ 3,0	7,0 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 0,9	6,2 $\pm$ 0,7

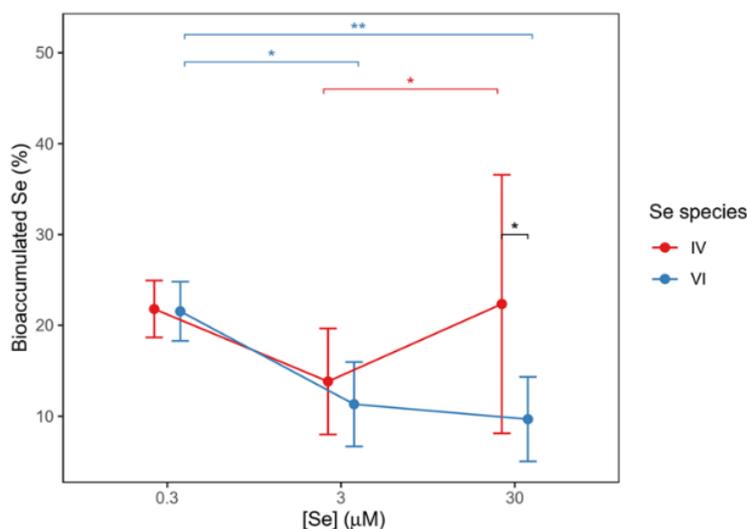
Segundo os valores percentuais de Se bioacumulado apresentados na Tabela 12, quantidades significativas de Se, superiores a 6,2%, foram encontradas na biomassa de células de *E. coli* após a coexposição.

Para avaliar o efeito da presença de Hg na bioacumulação de Se por *E. coli*, o percentual médio de Se bioacumulado obtidos dos experimentos de coexposição foram comparados àqueles obtidos nos experimentos de exposição individual ao Se. Para isso foi conduzida uma ANOVA, com nível de significância de  $\alpha=0,05$ , que verificou a existência de diferenças significativas no percentual médio de Se bioacumulado avaliando três diferentes fatores: espécie de Se, concentração de Se e tipos de exposição (exposição individual ao Se, pré-tratamento e pós-tratamento da coexposição). Para tal análise, realizou-se a média dos três tipos de exposição resultando em triplicatas para cada

combinação dos três fatores. O teste de Shapiro-Wilk mostrou que os resíduos do modelo seguem a distribuição normal (p-valor = 0,1059) e o teste de Levene foi não significativo (p-valor = 0,557), portanto as variâncias foram consideradas homogêneas entre os grupos. Os testes de comparações múltiplas foram realizados utilizando o teste de Tukey com p-valores ajustados ao número de comparações.

Os resultados da ANOVA de três vias revelaram a existência de duas interações significativas sobre o percentual médio de Se bioacumulado. Houve uma interação entre a concentração de Se e a espécie de Se (p-valor = 0,003) e uma interação entre a concentração de Se e o tipo de exposição (p-valor =  $4,33 \times 10^{-6}$ ). Além disso, cada uma dessas interações apresentou dois efeitos. Os dados gerados dessas análises estão apresentados nas Tabelas F e G, respectivamente, disponíveis nos Anexos.

Considerando a primeira interação, entre concentração e espécie de Se, a análise indicou a existência de dois efeitos sobre o percentual médio de Se bioacumulado por células de *E. coli*, o efeito das concentrações de Se em cada espécie de Se e o efeito das espécies de Se em cada concentração de Se. ANOVAs de uma via e testes de Tukey foram realizados para avaliar cada um destes efeitos. Os resultados estão representados na Figura 17.

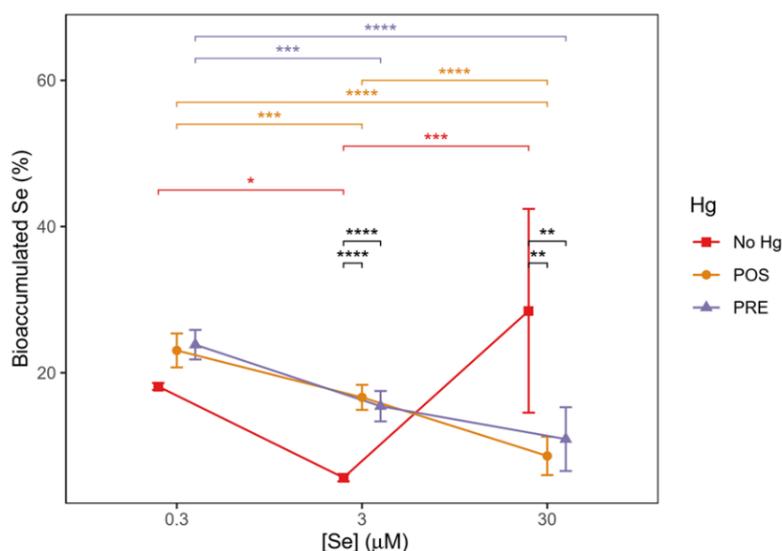


**Figura 17.** Valores percentuais médios de Se bioacumulado por células de *E. coli* para cada espécie de Se, Se(IV) e Se(VI), e nível de concentração de Se, 0,3, 3,0 e 30 µM. Asteriscos coloridos representam p-valores ajustados para os testes de Tukey entre concentrações de Se para cada espécie de Se. Asterisco preto representa p-valores ajustados para a comparação do percentual de Se bioacumulado na concentração 30 µM. \*: p-valor  $\leq 0,05$  e \*\*: p-valor  $\leq 0,01$ .

Os resultados da ANOVA de uma via, que avaliou o efeito de cada espécie de Se sobre cada nível de concentração de Se, indicam que não há diferenças significativas no percentual médio de Se bioacumulado entre as espécies de Se(IV) e Se(VI) nas concentrações 0,3  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,927) e 3,0  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,370). Entretanto, para a concentração de 30  $\mu\text{M}$ , o percentual médio de Se bioacumulado é significativamente maior (p-valor < 0,0001) para Se(IV) ( $22,35 \pm 14,23\%$ ) do que para Se(VI) ( $9,67 \pm 4,65\%$ ), indicado pelo asterisco preto na Figura 17. Este resultado indica que, da mesma forma como observado no experimento de exposição individual ao Se, diferenças entre as espécies de Se na bioacumulação de Se por *E. coli* em presença de Hg emergem a partir de determinada concentração empírica de Se, 30  $\mu\text{M}$ , sendo o percentual médio de Se bioacumulado significativamente maior (p-valor < 0,05) com a espécie Se(IV). Portanto, a presença de Hg não tem influência sobre esta interação.

Os resultados da ANOVA de uma via, que avaliou o efeito de cada nível de concentração de Se sobre cada espécie de Se, revelam que existem diferenças significativas no percentual médio de Se bioacumulado entre as concentrações de Se tanto para Se(IV) (p-valor = 0,005) quanto para Se(VI) (p-valor = 0,00016). O teste de Tukey mostrou que o percentual médio de Se bioacumulado foi estatisticamente diferente entre as concentrações 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,0414) de Se(IV) e 0,3 e 3,0  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,0106) e 0,3 e 30  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,00253) de Se(VI), conforme mostram os asteriscos coloridos na Figura 17. Portanto, diferentemente ao observado no experimento de exposição individual ao Se, onde não foram observadas diferenças significativas na bioacumulação de Se entre as concentrações de Se(VI), a bioacumulação de Se por *E. coli* na presença de Hg difere entre os níveis de concentração de Se para ambas as espécies de Se.

Considerando a segunda interação, entre a concentração de Se e tipo de exposição, a análise indicou a existência de dois efeitos sobre o percentual médio de Se bioacumulado por células de *E. coli*, o efeito das concentrações de Se em cada tipo de exposição e o efeito dos tipos de exposição em cada espécie de Se. ANOVAs de uma via e testes de Tukey foram realizados para avaliar cada um destes efeitos. Os resultados estão representados pela Figura 18.



**Figura 18.** Valores percentuais médios de Se bioacumulado em diferentes concentrações de Se e tipos de exposição. Asteriscos coloridos representam p-valores ajustados para os testes de comparações múltiplas entre concentrações de Se para cada tipo de exposição. Asteriscos pretos representam p-valores ajustados para a comparação do percentual de Se bioacumulado nas concentrações 3,0 e 30 µM. \*: p-valor  $\leq 0,05$ ; \*\*: p-valor  $\leq 0,01$ ; \*\*\*: p-valor  $\leq 0,001$  e \*\*\*\*: p-valor  $\leq 0,0001$ .

Os resultados da ANOVA de uma via, que avaliou o efeito de cada nível de concentração de Se sobre cada tipo de exposição, mostraram que há diferenças significativas no percentual médio de Se bioacumulado entre as concentrações de Se, tanto na ausência de Hg (p-valor  $< 0,0001$ ) quanto no pré-tratamento (p-valor = 0,00052) e no pós-tratamento (p-valor = 0,002). O teste de Tukey mostrou que o percentual médio de Se bioacumulado foi estatisticamente diferente entre todas as concentrações de Se em cada tipo de exposição, à exceção de duas comparações: entre 0,3 e 30 µM na exposição sem Hg (p-valor = 0,0991) e entre 3,0 e 30 µM no pré-tratamento (p-valor = 0,0375), conforme indicam os asteriscos coloridos na Figura 18. Este resultado indica que diferenças na bioacumulação de Se por *E. coli* entre os níveis de concentração de Se ocorrem em todos os tipos de exposição; individual ao Se, pré e pós-tratamento de coexposição. Porém, diferentemente do observado na exposição individual ao Se, na presença de Hg, a % de Se bioacumulado diminui com o aumento das concentração de Se.

Os resultados da ANOVA de uma via, que avaliou o efeito de cada tipo de exposição sobre cada nível de concentração de Se, indicaram que não há diferenças

significativas no percentual médio de Se bioacumulado entre os três tipos de exposição na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  de Se (p-valor = 0,2). Contudo, existem diferenças significativas entre as exposições sem Hg e com Hg nas concentrações 3,0  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,004) e 30  $\mu\text{M}$  de Se (p-valor =  $6,0 \times 10^{-5}$ ), conforme indicado pelos asteriscos em preto na Figura 18. Quando a presença de Hg leva a uma alteração significativa na quantidade de Se bioacumulado, podemos considerar este efeito como antagonico em relação ao acúmulo de Se.

Para a concentração 3,0  $\mu\text{M}$  de Se, observou-se que o percentual médio de Se bioacumulado foi significativamente maior tanto no pré-tratamento ( $15,43 \pm 2,08\%$ ; p-valor =  $1,0 \times 10^{-8}$ ) quanto pós-tratamento ( $16,64 \pm 1,71\%$ ; p-valor =  $5,0 \times 10^{-7}$ ) em comparação a exposição sem Hg ( $5,65 \pm 0,51\%$ ). A presença de Hg resultou em um aumento da quantidade de Se bioacumulado, sugerindo uma resposta protetora da bactéria à toxicidade do Hg, possivelmente por meio da assimilação de uma maior quantidade de Se em selenoproteínas. Assim, o Se pode ter desempenhado um papel importante na proteção de células de *E. coli*, embora não tenha aliviado a toxicidade induzida pelo Hg sobre a viabilidade celular nesta concentração. Portanto, o crescimento celular sozinho não é um parâmetro adequado para avaliar os efeitos da interação entre Se e Hg.

Com relação a concentração de 30  $\mu\text{M}$  de Se, o percentual médio de Se bioacumulado é significativamente menor no pré-tratamento ( $10,93 \pm 4,36\%$ ; p-valor = 0,007) e pós-tratamento ( $8,63 \pm 2,63\%$ ; p-valor = 0,003), em comparação a exposição sem Hg ( $28,48 \pm 13,94\%$ ). A diminuição da quantidade de Se bioacumulado na presença de Hg pode ser considerada resultante de um efeito conjunto da toxicidade do Hg e do Se em altas concentrações. Este efeito correlaciona-se com outros resultados observados para esta combinação, como a maior inibição do crescimento celular e a possível formação do composto HgSe e, portanto, corrobora o efeito sinérgico negativo desta interação em células de *E. coli*.

Portanto, os diferentes efeitos da presença de Hg na bioacumulação de Se por *E. coli* na coexposição dependem da concentração de Se, havendo uma relação dose-dependente na interação entre Se e Hg em células de *E. coli*, que pode ser protetiva ou tóxica.

Diante destes resultados de coexposição, em síntese, podemos inferir que: (a) a ordem de exposição dos elementos Se e Hg não tem efeito significativo na bioacumulação de Se; (b) a presença de Hg produziu resultados de bioacumulação de Se inversamente correlacionados com a concentração de Se nos ensaios, isto é, o percentual médio de Se

bioacumulado por células de *E. coli* diminui à medida que a concentração de Se aumenta; (c) em comparação com a exposição individual a Se, a presença de Hg causou efeitos dependentes da concentração de Se, visto que o percentual médio de Se bioacumulado por células de *E. coli* aumentou em 0,3  $\mu\text{M}$  e Se e diminuiu em 30  $\mu\text{M}$  de Se. Portanto, há uma relação dose-dependente na interação entre Se e Hg em células de *E. coli*.

Na literatura, estudos sobre a interação entre Se e Hg revelaram resultados variados em diferentes organismos, fornecendo insights sobre os efeitos antagônicos e sinérgicos desses elementos. Em estudos com alho exposto a baixas dosagens de Se(IV), a presença de Hg(II) aumentou a absorção de Se, enquanto o efeito oposto foi produzido quando exposto a altas dosagens de Se(IV), sugerindo um possível papel do Hg na atenuação da toxicidade do Se ao limitar o acúmulo de Se<sup>149,205</sup>. Em estudos com ovos de zebrafish, observou-se níveis mais altos de Se após a coalimentação com MeHg e SeMeth, o que foi atribuído a um efeito sinérgico Hg-Se<sup>155</sup>.

Estudos com *T. malaccensis* e *P. fluorescens* também corroboram essa complexidade nas interações entre Se e Hg. Em *T. malaccensis* a interação Se-Hg resultou em desintoxicação de Se em determinadas combinações e na desintoxicação de Hg em outras, demonstrando que a interação Se-Hg sofre influência das espécies e concentrações de Se e Hg envolvidas<sup>157</sup>. Por outro lado, *P. fluorescens* demonstrou um efeito de proteção mútuo, em que a presença de 0,5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) reduziu significativamente o acúmulo de Se (12,7 ou 127  $\mu\text{M}$  de Se(IV)), ao mesmo tempo em que a bioacumulação de Hg também foi inibida por Se. Este fenômeno de proteção mútua foi em parte atribuído à formação de SeHg<sup>158</sup>. Em outro estudo com *P. fluorescens*, a porcentagem de Se bioacumulada diminuiu com o aumento do Se(IV) adicionado (1,6 ou 67  $\mu\text{M}$ ) na presença de Hg(II) (0,25 ou 0,5  $\mu\text{M}$ ). Além disso, o aumento da concentração de Se modificou a desintoxicação do Hg, resultando em uma diminuição da volatilização de Hg(0) e favorecendo a imobilização no composto HgSe<sup>159</sup>.

Em *D. desulfuricans*, a presença de 0,5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) diminuiu o conteúdo de Se intracelular de 5,2% na exposição individual com 6,33  $\mu\text{M}$  de Se(IV) para 3,2%, com diminuição significativa no crescimento bacteriano, indicando o efeito antagonista entre Hg e Se, sugerindo o efeito tóxico do Se em alta concentração (6,33  $\mu\text{M}$ )<sup>161</sup>. Em estudo subsequente, os autores sugerem que o efeito antagonista da interação entre Se e Hg ocorre em nível da membrana celular, pela capacidade de proteger a célula da entrada de Hg quando Se está presente e *vice versa*, além da formação de compostos como HgSe na superfície da membrana celular, limitando a biodisponibilidade<sup>160</sup>.

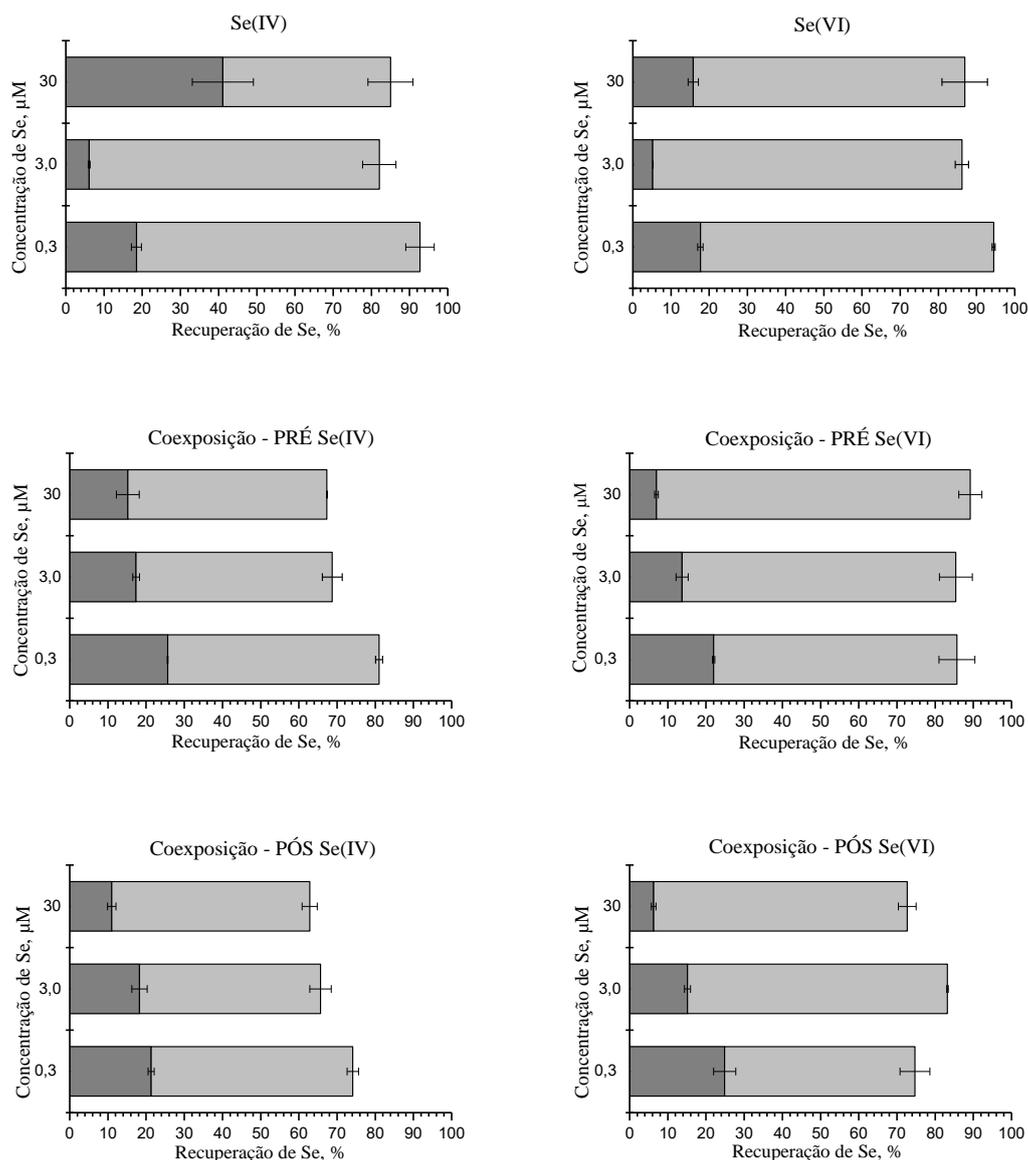
Portanto, a diversidade de resultados observados na literatura aliada aos achados deste estudo, destaca a complexidade dos mecanismos subjacentes aos efeitos combinados da interação entre Se e Hg, evidenciando a influência das diferentes espécies e concentrações desses elementos. Nesse contexto, é razoável esperar que os níveis de acúmulo de Se, ao serem aumentados ou diminuídos na presença de Hg, manifestem uma relação antagônica em comparação aos níveis observados na ausência de Hg, resultando em efeitos protetivos ou não. Além disso, é importante investigar a formação de complexos de HgSe, entre outros compostos, para melhor compreender a redução do acúmulo de Se na presença de Hg.

### **5.5. Balanço de massa de Se**

A recuperação total do Se adicionado aos ensaios de interação na exposição de células de *E. coli* ao Se será apresentada em termos de balanço de massa.

Para calcular o balanço de massa, considerou-se que parte do conteúdo de Se adicionado foi metabolizado por *E. coli* e distribuído entre os componentes da cultura: a biomassa bacteriana (fase sólida) e o sobrenadante do meio de cultivo (fase líquida). Assim, o cálculo do balanço de massa foi realizado pela soma dos valores percentuais médios de Se bioacumulado e de Se recuperado no sobrenadante.

Os valores percentuais do balanço de massa e do Se recuperado em cada componente da cultura, obtidos para cada espécie e concentração de Se em cada experimento de exposição de células de *E. coli* ao Se, tanto individualmente quanto nos pré-tratamento e pós-tratamento da coexposição com Hg, são apresentados na Figura 19.



**Figura 19.** Valores percentuais de Se no balanço de massa, (■) Se bioacumulado na biomassa e (■) Se recuperado no sobrenadante, em experimentos de exposição de células de *E. coli* ao Se individualmente ( $n = 9$ ) e nos pré-tratamento ( $n = 7$ ) e pós-tratamento ( $n = 7$ ) da coexposição com Hg. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados do balanço de massa de Se na exposição individual ao Se, conforme apresentados na Figura 19, indicam que mais de 70% do Se adicionado foi recuperado nos sobrenadantes, com exceção do ensaio de 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV), onde a distribuição do Se entre os componentes foi mais homogênea. Nesse ensaio, o percentual médio de Se bioacumulado foi maior do que nos demais, possivelmente devido à produção de Se elementar, como discutido anteriormente (5.3.3).

Os valores de recuperação percentual de Se nos ensaios da exposição individual resultaram em balanços de massa satisfatórios, variando de 82,1% a 94,5% do Se adicionado sendo recuperado. De acordo com a AOAC<sup>199</sup>, esses valores de recuperação percentual total de Se são considerados aceitáveis para a faixa de concentração do analito estudada (100 ppb a 10 ppm, 80 – 110%).

Os resultados do balanço de massa de Se na coexposição, tanto no pré-tratamento quanto no pós-tratamento, indicam que a maior parte do Se adicionado permaneceu no sobrenadante. Entretanto, em comparação com a exposição individual ao Se, a recuperação percentual de Se no sobrenadante diminuiu para a maioria dos ensaios, exceto para 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV) em ambos os tratamentos e para 30  $\mu\text{M}$  de Se(VI) no pré-tratamento. A recuperação percentual de Se na biomassa aumentou para os ensaios de 3,0  $\mu\text{M}$  de Se e diminuiu para os ensaios de 30  $\mu\text{M}$ , para ambas as espécies e tratamentos. Portanto, esses resultados indicam que a presença de Hg influencia a distribuição de Se entre os componentes da cultura.

Comparando os resultados da coexposição entre as concentrações de Se e tratamentos, a porcentagem média de recuperação de Se na biomassa diminuiu com o aumento da concentração de Se, para ambas as espécies de Se e tratamentos. Enquanto a porcentagem de recuperação de Se nos sobrenadantes dos ensaios de Se(IV) foi semelhante entre as concentrações de Se e tratamentos, com uma média de 52%, a porcentagem de recuperação de Se nos sobrenadantes dos ensaios de Se(VI) aumentou com o aumento da concentração de Se para ambos os tratamentos, sendo maior no pré-tratamento (variando de 64% para 82%) do que no pós-tratamento (de 50% para 66%), sendo ambas maiores do que a média da espécie de Se(IV).

De acordo com a AOAC<sup>199</sup>, os valores de balanço de massa de Se nos ensaios de coexposição foram satisfatórios para a maioria dos ensaios do pré-tratamento, onde mais de 81% do Se adicionado foi recuperado, exceto para os ensaios 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV), nos quais o balanço de massa foi em torno de 67%. Contudo, os valores de balanço de massa de Se da maioria dos ensaios do pós-tratamento ficaram abaixo do limite aceitável de recuperação total, exceto para 3,0  $\mu\text{M}$  de Se(VI), onde 83% do conteúdo de Se adicionado foi recuperado.

Nossos resultados refletem a distribuição de Se entre os componentes do sistema e são satisfatórios em relação aos valores de recuperação total de Se, quando comparados a estudos precedentes com culturas bacterianas. Por exemplo, um estudo sobre a redução de Se(VI) (100  $\mu\text{M}$ ) por *Desulfomicrobium sp* encontrou níveis gerais de recuperação de

Se bastante baixos, 75%, com apenas 1, 15 e 59% encontrados no headspace, biomassa e sobrenadante da cultura, respectivamente. Isso foi atribuído a perdas de espécies cloradas voláteis geradas na reação com HCl durante a digestão das amostras, etapa que reduziu o Se(VI) para Se(IV) para a determinação de Se por voltametria, ASV<sup>165</sup>. Outro estudo, usando Espectrometria de Fluorescência Atômica por Geração de Hidretos (HG-AFS), mostrou uma recuperação média de cerca de 87% de Se adicionado após a exposição de *D. desulfuricans* ao Se(IV). A mudança na distribuição de Se também foi observada com o aumento da concentração de Se. Na exposição a 6,3 µM de Se(IV), 66% do Se adicionado foi encontrado no sobrenadante, 17% na biomassa, e 8,6% como Se elementar. Em contraste, na exposição a 12,6 µM de Se(IV), esses valores foram de 39% no sobrenadante, 53% na biomassa, e 49% como Se elementar. Além disso, esse estudo também sugere que *D. desulfuricans* é capaz de desintoxicar Se convertendo Se(IV) em compostos voláteis<sup>161</sup>.

No entanto, nossos resultados de balanço de massa após a coexposição não estão totalmente alinhados com a recuperação média de Se obtida de culturas de *D. desulfuricans* na coexposição com 0,5 µM de Hg(II), que foi em média de 84%. Esse estudo também discutiu a capacidade de *D. desulfuricans* em formar compostos HgSe insolúveis<sup>160</sup>.

Neste estudo, os valores de balanço de massa de Se revelaram perdas significativas de Se adicionado: entre 5% e 18% na exposição individual, 10% a 32% no pré-tratamento e de 17% a 37% no pós-tratamento.

No entanto, essas perdas de Se, que poderiam explicar as variações na recuperação total de Se, não podem ser atribuídas ao método analítico. Os resultados do teste de adição e recuperação do analito, discutidos no tópico 5.2, demonstraram que a recuperação percentual média de Se nas soluções controle foi satisfatória, com valores variando de 99% a 105% para Se(IV) e Se(VI) em os todos níveis de concentração e tipos de exposição.

Estudos anteriores sugerem que bactérias podem metabolizar Se, produzindo espécies voláteis que contribuem para perdas de Se durante o processo. Embora a emissão de compostos voláteis não tenha sido controlada em nossos experimentos de exposição de células, dados publicados indicam que o Se volátil capturado de culturas bacterianas geralmente representa menos de 2,0% do Se adicionado<sup>65,161,165</sup>. Portanto, é improvável que a volatilização do Se justifique as perdas observadas neste estudo.

Nesse contexto, destaca-se a importância de padronização e controle de todos os procedimentos executados, do experimento de exposição de células as análises das amostras. Essas práticas são essenciais para identificar etapas críticas e mitigar potenciais fontes de perda na recuperação de Se.

## 6. Conclusões

O presente estudo forneceu evidências relevantes sobre os efeitos das diferentes espécies e concentrações de Se, bem como do Hg e das interações entre Se e Hg, tanto no crescimento celular quanto na capacidade de bioacumulação de Se por *E. coli* ATCC 11775.

O método analítico proposto para determinação de Se por GF AAS, que avaliou a bioacumulação de Se por *E. coli*, demonstrou desempenho consistente com os requisitos necessários para uma análise precisa e exata da biomassa bacteriana, bem como para a análise direta do sobrenadante do meio de cultivo.

*E. coli* demonstrou capacidade de resistir a altas concentrações de Se(IV), na faixa de 30 a 500  $\mu\text{M}$ , reduzindo Se(IV) a Se(0), revelando sinais evidentes de desintoxicação de Se. Consequentemente, grandes quantidade de Se foram removidas do meio, variando de 46 a 74%, numa relação dose-dependente, porém com efeito negativo na viabilidade celular a partir de 60  $\mu\text{M}$ .

A presença de Se, independentemente da espécie (Se(IV) ou Se(VI)), nas concentrações de 0,3; 3,0 e 30  $\mu\text{M}$ , não afetou a viabilidade de *E. coli*.

*E. coli* demonstrou capacidade de resistir à presença de até 20  $\mu\text{M}$  de Hg(II), embora efeitos negativos na viabilidade celular tenham sido observados a partir de 15  $\mu\text{M}$ .

Nos experimentos de coexposição, os efeitos interativos entre Se (0,3; 3,0 e 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV) e Se(VI)) e Hg (15  $\mu\text{M}$ ) na viabilidade de *E. coli* demonstram ser dose-dependentes. A interação entre Hg e 30  $\mu\text{M}$  de Se revelou um efeito sinérgico negativo significativo na viabilidade celular.

A formação de Se(0), observada na exposição individual a 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV), não foi detectada na presença de Hg nos experimentos de coexposição. Em contraste, um composto escuro foi observado junto à biomassa de células, revelando efeitos interativos entre Se e Hg.

Em concentrações variando de 0,3 a 30  $\mu\text{M}$  de Se(IV) e Se(VI), *E. coli* demonstrou capacidade de acumular Se em quantidades que variaram de 5,2% a 41,1%, sem comprometer sua viabilidade celular. A bioacumulação de Se foi influenciada tanto pela espécie quanto pela concentração de Se, sendo que o nível de concentração de Se teve um

efeito significativo na bioacumulação para a espécie Se(IV), mas não para a espécie Se(VI).

Nos experimentos de coexposição, a presença de Hg influencia a distribuição e a bioacumulação de Se, em comparação com a exposição individual ao Se. Esse efeito é dependente da concentração de Se, mas não da espécie ou da ordem de coexposição.

### **Perspectivas futuras:**

De forma a complementar este trabalho, com relação à metodologia necessária para aprimorar o entendimento sobre a bioacumulação de Se por *E. coli* e os efeitos interativos entre Se e Hg, destacam-se as seguintes abordagens:

- i. Análise das biotransformações de Se e Hg mediadas por *E. coli*, considerando a especiação química para avaliar como a bactéria altera a forma química desses elementos, destacando a importância de identificar compostos específicos de Se e Hg e suas respectivas toxicidades e biodisponibilidades.
- ii. Identificação, quantificação e localização intracelular de Se(0), SeNPs, HgS e HgSe, fazendo uso de técnicas avançadas como:
  - ✓ Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a visualização e caracterização detalhadas das nanopartículas e depósitos intracelulares de Se e Hg.
  - ✓ Análise de célula única (*Single cell Analysis*) para obter perfis detalhados de expressão gênica e proteômica em células individuais, bem como a quantificação precisa e localização intracelular de Se e Hg, permitindo uma compreensão mais profunda da heterogeneidade celular e dos mecanismos de bioacumulação e biotransformação.
- iii. Investigação da metabolização de Hg por *E. coli* e dos mecanismos de resistência, identificando os processos bioquímicos, genes e vias metabólicas responsáveis pela resistência à toxicidade do Hg.
- iv. Determinação de Hg na biomassa bacteriana e no meio de cultivo.
- v. Realização de estudos dirigidos à viabilidade de aplicação de *E. coli* na biorremediação de áreas contaminadas com Se e Hg, considerando aspectos ecológicos e de segurança.

## 7. Referências bibliográficas

- (1) Haynes, W. M. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th ed.; CRC Press: Boca Raton, 2014.
- (2) Stadtman, T. C. Selenium-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, 49, 93-110 1980.
- (3) Reich, H. J.; Hondal, R. J. Why Nature Chose Selenium. *ACS Chemical Biology* 2016, 11(4), 821–841.
- (4) Stadtman, T. C. Selenocysteine. *Ann. Rev. Biochem.*, 1996, 65, 83-100.
- (5) Vinceti, M.; Crespi, C. M.; Bonvicini, F.; Malagoli, C.; Ferrante, M.; Marmiroli, S.; Stranges, S. The Need for a Reassessment of the Safe Upper Limit of Selenium in Drinking Water. *Sci. Total Environ.*, 2013, 443, 633–642.
- (6) Mehdi, Y.; Hornick, J. L.; Istasse, L.; Dufrasne, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* 2013, 18, 3292–3311.
- (7) Alderman, L. C.; Bercin, J. J. Hydrogen Selenide Poisoning: An Illustrative Case with Review of the Literature. *Arch. Environ. Health* 1986, 41(6), 354–358.
- (8) Cupp-Sutton, K. A.; Ashby, M. T. Biological Chemistry of Hydrogen Selenide. *Antioxidants* 2016, 5, 42.
- (9) STDA – Selenium Tellurium Development Association. <https://stda.org/>. <https://stda.org/pages/SE-%26-TE.html> (acessado em 02/02/2024).
- (10) Zhang, Z.; Li, Y.; Cai, G.; Zhang, Y.; Lu, X.; Lin, Y. Selenium Heterocyclic Electron Acceptor with Small Urbach Energy for As-Cast High-Performance Organic Solar Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, 142(44), 18741–18745.
- (11) Tran, P. A.; Taylor, E.; Sarin, L.; Hurt, R. H.; Webster, T. J. Novel Anti-Cancer, Anti-Bacterial Coatings for Biomaterial Applications: Selenium Nanoclusters. *MRS Proc.*, 2009, 1209-YY08-04.
- (12) Huang, H.; Abbaszadeh, S. Recent Developments of Amorphous Selenium-Based X-Ray Detectors: A Review. *IEEE Sens. J.*, 2020, 20(4), 1694–1704.
- (13) Pinsent, J. The Need for Selenite and Molybdate in the Formation of Formic. *Biochem. J.*, 1954, 57(1), 10–16.
- (14) Schwarz, K.; Foltz, C. M. Selenium as an Integral Part of Factor 3 Against Dietary Necrotic Liver Degeneration. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79(12), 3292–3293.

- (15) Flohe, L.; Günzler, W. A.; Schock, H. H. Glutathione Peroxidase: A Selenoenzyme. *FEBS Letters* 1973, 32(1), 132–134.
- (16) Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G.; Hoekstra, W. G. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* 1973, 179, 588–590.
- (17) Böck, A.; Forchhammer, K.; Heider, J.; Leinfelder, W.; Sawers, G.; Veprek, B.; Zinoni, F. Selenocysteine: The 21st Amino Acid. *Molecular Microbiology* 1991, 515–520.
- (18) Roman, M.; Jitaru, P.; Barbante, C. Selenium Biochemistry and its Role for Human Health. *Metallomics* 2014, 25–54.
- (19) Hatfield, D. L.; Tsuji, P. A.; Carlson, B. A.; Gladyshev, V. N. Selenium and Selenocysteine: Roles in Cancer, Health, and Development. *Trends Biochem. Sci.*, 2014, 39(3), 112–120.
- (20) Rayman, M. P. Selenium and Human Health. *Lancet* 2012, 379, 1256–1268.
- (21) Ge, K.; Yang, G. The Epidemiology of Selenium Deficiency in the Etiological Study of Endemic Diseases in China. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993, 57(2), 259–263.
- (22) Franke, K. W. A New Toxicant Occurring Naturally in Certain Samples of Plant Foodstuffs. *J. Nutr.*, 1934, 8(5), 609–613.
- (23) Yang, G.; Wang, S.; Zhou, R.; Sun, S. Endemic Selenium Intoxication of Humans in China. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, 37(5), 872–881.
- (24) ATSDR. Toxicological Profile for Selenium. 2003. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp92.pdf> (acessado em 04/02/2024).
- (25) Lenz, M.; Lens, P. N. L. The Essential Toxin: The Changing Perception of Selenium in Environmental Sciences. *Sci. Total Environ.*, 2009, 407(12), 3620–3633.
- (26) Vinceti, M.; Crespi, C. M.; Malagoli, C.; Del Giovane, C.; Krogh, V. Friend or Foe? The Current Epidemiologic Evidence on Selenium and Human Cancer Risk. *J. Environ. Sci. Health - Part C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2013, 31(4), 305–341.
- (27) Stranges, S.; Marshall, J. R.; Natarajan, R.; Donahue, R. P.; Trevisan, M.; Combs, G. F.; Cappuccio, F. P.; Ceriello, A.; Reid, M. E. Effects of Long-Term Selenium Supplementation on the Incidence of Type 2 Diabetes A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine* 2007, 147, 217–223.

- (28) Vinceti, M.; Solovyev, N.; Mandrioli, J.; Crespi, C. M.; Bonvicini, F.; Arcolin, E.; Georgouloupoulou, E.; Michalke, B. Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Exhibits Abnormal Levels of Selenium Species Including Elevated Selenite. *Neurotoxicology* 2013, 38, 25–32.
- (29) Combs, G. F. Selenium in Global Food Systems. *Br. J. Nutr.*, 2001, 85(5), 517–547.
- (30) Rayman, M. P. Food-Chain Selenium and Human Health: Emphasis on Intake. *British Journal of Nutrition* 2008, 254–268.
- (31) Thomson, C. D. Assessment of Requirements for Selenium and Adequacy of Selenium Status: A Review. *European Journal of Clinical Nutrition* 2004, 391–402.
- (32) U.S. Food and Drug Administration. Daily Value on the Nutrition and Supplement Facts Labels. <https://www.fda.gov/food/nutrition-facts-label/daily-value-nutrition-and-supplement-facts-labels> (acessado em 04/02/2024).
- (33) ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) para Proteína, Vitaminas e Minerais, Resolução-RDC Nº 269, de 22 de Setembro de 2005.
- (34) World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition. 2004. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf?sequence=1> (acessado em 04/02/2024).
- (35) World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality Fourth Edition Incorporating The First Addendum. 2017. [https://www.who.int/docs/default-source/food-safety/arsenic/9789241549950-eng.pdf?sfvrsn=bad6319a\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/food-safety/arsenic/9789241549950-eng.pdf?sfvrsn=bad6319a_2) (acessado em 04/02/2024).
- (36) Kumkrong, P., LeBlanc, K. L., Mercier, P. H. J., Mester, Z. Selenium analysis in waters. Part 1: Regulations and standard methods. *Sci. Total Environ.*, 2018, 1611–1634.
- (37) Lemly, A. D. Aquatic Selenium Pollution Is a Global Environmental Safety Issue. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2004, 59(1), 44–56.
- (38) Wang, Z.; Gao, Y. Biogeochemical Cycling of Selenium in Chinese Environments. *Applied Geochemistry* 2001, 16, 1345–1351.
- (39) Wen, H.; Carignan, J. Reviews on Atmospheric Selenium: Emissions, Speciation and Fate. *Atmospheric Environment* 2007, 7151–7165.

- (40) Tan, L. C.; Nancharaiah, Y. V.; van Hullebusch, E. D.; Lens, P. N. L. Selenium: Environmental Significance, Pollution, and Biological Treatment Technologies. *Biotechnology Advances* 2016, 886–907.
- (41) Winkel, L. H. E.; Johnson, C. A.; Lenz, M.; Grundl, T.; Leupin, O. X.; Amini, M.; Charlet, L. Environmental Selenium Research: From Microscopic Processes to Global Understanding. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46(2), 571–579.
- (42) Winkel, L. H. E.; Vriens, B.; Jones, G. D.; Schneider, L. S.; Pilon-Smits, E.; Bañuelos, G. S. Selenium Cycling across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. *Nutrients* 2015, 4199–4239.
- (43) Fernández-Martínez, A.; Charlet, L. Selenium Environmental Cycling and Bioavailability: A Structural Chemist Point of View. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2009, 81–110.
- (44) Dhillon, K. S.; Dhillon, S. K. Development and Mapping of Seleniferous Soils in Northwestern India. *Chemosphere* 2014, 99, 56–63.
- (45) Lima, L. W.; Pilon-Smits, E. A. H.; Schiavon, M. Mechanisms of Selenium Hyperaccumulation in Plants: A Survey of Molecular, Biochemical and Ecological Cues. *Biochimica et Biophysica Acta* 2018, 2343–2353.
- (46) Kumar, A. R.; Riyazuddin, P. Speciation of Selenium in Groundwater: Seasonal Variations and Redox Transformations. *J. Hazard. Mater.*, 2011, 192(1), 263–269.
- (47) Hamilton, S. J. Review of Selenium Toxicity in the Aquatic Food Chain. *Sci. Total Environ.*, 2004, 1–31.
- (48) Chapman, P. M., Adams, W. J., Brooks, M., Delos, C. G., Luoma, S. N., Maher, W. A., Ohlendorf, H. M., Presser, T. S., Shaw, P. *Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment*. 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010.
- (49) Lemly, A. D. Selenium Poisoning of Fish by Coal Ash Wastewater in Herrington Lake, Kentucky. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2018, 150, 49–53.
- (50) U.S. EPA United States Environmental Protection Agency. 2021 Revision to: Aquatic Life Ambient Water Quality Criterion for Selenium-Freshwater 2016; 2021. <https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-08/selenium-freshwater2016-2021-revision.pdf> (acessado em 04/02/2024).
- (51) Luoma S. N., Rainbow P. S. *Metal Contamination in Aquatic Environments - Science and Lateral Management*. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008.

- (52) Nancharaiah, Y. V.; Lens, P. N. L. Ecology and Biotechnology of Selenium-Respiring Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015, 79(1), 61–80.
- (53) Doran, J. W. Microorganisms and the Biological Cycling of Selenium. In: *Advances in Microbial Ecology*; Marshall, K. C. (eds); Vol 6; Springer: Boston, 1982, p 1–32.
- (54) Wells, M.; Stolz, J. F. Microbial Selenium Metabolism: A Brief History, Biogeochemistry and Ecophysiology. *FEMS Microbiology Ecology* 2020, 96, fiae209.
- (55) Wells, M.; Basu, P.; Stolz, J. F. The Physiology and Evolution of Microbial Selenium Metabolism. *Metallomics* 2021, 13, mfab024.
- (56) Staicu, L. C., Barton, L. L. Selenium Respiration in Anaerobic Bacteria: Does Energy Generation Pay Off? *J. Inorg. Biochem.*, 2021, 222, 111509.
- (57) Eswayah, A. S.; Smith, T. J.; Gardiner, P. H. E. Microbial Transformations of Selenium Species of Relevance to Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82(16), 4848–4859.
- (58) Kessi, J.; Turner, R. J.; Zannoni, D. Tellurite and Selenite: How Can These Two Oxyanions Be Chemically Different yet so Similar in the Way They Are Transformed to Their Metal Forms by Bacteria? *Biological Research.*, 2022, 55, 17.
- (59) Stolz, J. F.; Basu, P.; Santini, J. M.; Oremland, R. S. Arsenic and Selenium in Microbial Metabolism. *Annual Review of Microbiology* 2006, 107–130.
- (60) Wang, D.; Rensing, C.; Zheng, S. Microbial Reduction and Resistance to Selenium: Mechanisms, Applications and Prospects. *Journal of Hazardous Materials* 2022, 421, 126684.
- (61) Wang, Q.; Wang, C.; Kuang, S.; Wang, D.; Shi, Y. Biological Selenite Reduction, Characterization and Bioactivities of Selenium Nanoparticles Biosynthesised by *Pediococcus acidilactici* DSM20284. *Molecules* 2023, 28, 3793.
- (62) Heider, J.; Bock, A. Selenium Metabolism in Micro-organisms. In: *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 35, 1993.
- (63) Turner, R. J.; Weiner, J. H.; Taylor, D. E. Selenium Metabolism in *Escherichia coli*. *BioMetals* 1998, 11, 223–227.
- (64) Mangiapane, E.; Pessione, A.; Pessione, E. Selenium and Selenoproteins: An Overview on Different Biological Systems. *Current Protein & Peptide Science* 2014, 15(6), 598-607.

- (65) Moreno-Martin, G.; Sanz-Landaluze, J.; León-González, M. E.; Madrid, Y. In Vivo Quantification of Volatile Organoselenium Compounds Released by Bacteria Exposed to Selenium with HS-SPME-GC-MS. Effect of Selenite and Selenium Nanoparticles. *Talanta* 2021, 224, 121907.
- (66) Moreno-Martín, G.; Espada-Bernabé, E.; Gómez-Gómez, B.; León-González, M. E.; Madrid, Y. Evaluation of the Transformation of Selenite and Selenium Nanoparticles to Seleno-Amino Acids Produced by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Using Liquid Chromatography -Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Single-Particle- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Different Sample Treatments. *Spectrochim. Acta - Part B: At. Spectrosc.*, 2023, 200, 106611.
- (67) Ranjard, L.; Nazaret, S.; Cournoyer, B. Freshwater Bacteria Can Methylate Selenium through the Thiopurine Methyltransferase Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(7), 3784–3790.
- (68) Chasteen, T. G.; Bentley, R. Biomethylation of Selenium and Tellurium: Microorganisms and Plants. *Chem. Rev.*, 2003, 103, 1, 1–26.
- (69) Bébien, M.; Lagniel, G.; Garin, J.; Touati, D.; Verméglio, A.; Labarre, J. Involvement of Superoxide Dismutases in the Response of *Escherichia coli* to Selenium Oxides. *J. Bacteriol.* 2002, 184(6), 1556–1564.
- (70) Wittwer, A. J. Specific Incorporation of Selenium into Lysine- and Glutamate-Accepting TRNAs from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1983, 258(14), 8637–8641.
- (71) Lindblow-Kull, C.; Kull, F. J.; Shrift, A. Single Transporter for Sulfate, Selenate, and Selenite in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 1985, 163(3), 1267-1269.
- (72) Bebien, M.; Kirsch, J.; Méjean, V.; Verméglio, A. Involvement of a Putative Molybdenum Enzyme in the Reduction of Selenate by *Escherichia coli*. *Microbiology* 2002, 148, 3865–3872.
- (73) Ganther, H. E. Reduction of the Selenotrisulfide Derivative of Glutathione to a Persulfide Analog by Glutathione Reductase. *Biochemistry* 1971, 10(22), 4089–4098.
- (74) Kice, J. L.; Lee, T. W. S.; Pan, S.-T. Mechanism of the Reaction of Thiols with Selenite. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102(13), 4448–4455.

- (75) Kessi, J.; Hanselmann, K. W. Similarities between the Abiotic Reduction of Selenite with Glutathione and the Dissimilatory Reaction Mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 (49), 50662–50669.
- (76) Fahey, R. C.; Brown, W. C.; Adams, W. B.; Worsham, M. B. Occurrence of Glutathione in Bacteria. *J. Bacteriol.*, 1978, 133(3), 1126–1129.
- (77) Tamura, T.; Sato, K.; Komori, K.; Imai, T.; Kuwahara, M.; Okugochi, T.; Mihara, H.; Esaki, N.; Inagaki, K. Selenite Reduction by the Thioredoxin System: Kinetics and Identification of Protein-Bound Selenide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75(6), 1184–1187.
- (78) Shimizu, A.; Tobe, R.; Aono, R.; Inoue, M.; Hagita, S.; Kiriya, K.; Toyotake, Y.; Ogawa, T.; Kurihara, T.; Goto, K.; Prakash, N. T.; Mihara, H. Initial Step of Selenite Reduction via Thioredoxin for Bacterial Selenoprotein Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10965.
- (79) Takahata, M.; Tamura, T.; Abe, K.; Mihara, H.; Kurokawa, S.; Yamamoto, Y.; Nakano, R.; Esaki, N.; Inagaki, K. Selenite Assimilation into Formate Dehydrogenase H Depends on Thioredoxin Reductase in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 2008, 143(4), 467–473.
- (80) Kramer, G. F.; Ames, B. N. Mechanisms of Mutagenicity and Toxicity of Sodium Selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, 1988, 201(1), 169–180.
- (81) Milne, J. B. Selenium Sulfur Dihalides. Raman and  $^{77}\text{Se}$  NMR Spectroscopic Characterization. *Can. J. Chem.* 1992, 70(3), 693–699.
- (82) Sawers, G.; Heider, J.; Zehelein, E.; Bock, A. Expression and Operon Structure of the *Sel* Genes of *Escherichia coli* and Identification of a Third Selenium-Containing Formate Dehydrogenase Isoenzyme. *Journal of Bacteriology* 1991, 173, 4983–4993.
- (84) Leinfelder, W.; Forchhammer, K.; Zinoni, F.; Sawers, G.; Mandrand-Berthelot, M.-A.; Bock, A. *Escherichia coli* Genes Whose Products Are Involved in Selenium Metabolism. *Journal of Bacteriology* 1988, 170(2), 540–546.
- (85) Ehrenreich, A.; Forchhammer, K.; Tormay, P.; Veprek, B.; Bock, A. Selenoprotein Synthesis in *E. coli* Purification and Characterisation of the Enzyme Catalysing Selenium Activation. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 206, 767–773.

- (86) Lacourciere, G. M.; Mihara, H.; Kurihara, T.; Esaki, N.; Stadtman, T. C. *Escherichia coli* NifS-like Proteins Provide Selenium in the Pathway for the Biosynthesis of Selenophosphate. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(31), 23769–23773.
- (87) Fimmel, A. L.; Loughlin, R. E. Isolation and Characterization of CysK Mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, 1977, 103(1), 37–43.
- (88) Müller, S.; Heider, J.; Böck, A. The Path of Unspecific Incorporation of Selenium in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.*, 1997, 168, 421–427.
- (89) Cowie, D. B.; Cohen, G. N. Biosynthesis by *Escherichia coli* of Active Altered Proteins Containing Selenium Instead of Sulfur. *Biochimica et Biophysica Acta* 1957, 26, 252–261.
- (90) Trygve, T.; Williams, H. H. Metabolism of Selenium by *Escherichia coli*: Biosynthesis of Selenomethionine. *Journal of Biological Chemistry* 1961, 236(2) 597–601.
- (91) Scala, J.; Williams, H. H. The Enhancement of Selenite Toxicity by Methionine in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 99(3), 363–368.
- (92) Hartmanis, M. G.; Stadtman, T. C. Isolation of a Selenium-Containing Thiolase from *Clostridium kluveri*: Identification of the Selenium Moiety as Selenomethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982, 79(16), 4912–4916.
- (93) Pinson, B.; Sagot, I.; Daignan-Fornier, B. Identification of Genes Affecting Selenite Toxicity and Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 2000, 36 (3), 679–687.
- (94) Mihara, H.; Kato, S.; Lacourciere, G. M.; Stadtman, T. C.; Kennedy, R. A. J. D.; Kurihara, T.; Tokumoto, U.; Takahashi, Y.; Esaki, N. The *IscS* Gene Is Essential for the Biosynthesis of 2-Selenouridine in tRNA and the Selenocysteine-Containing Formate Dehydrogenase H. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99(10), 6679–6683.
- (95) Spallholz, J. E.; Martin, J. L.; Gerlach, M. L. Assimilation, Distribution, and Metabolism of (<sup>75</sup>Se)-Selenite, Selenate, and Selenoamino Acids by *Escherichia coli*. *Phosphorous Sulfur Relat. Elem.*, 1976, 1(2–3), 263–269.
- (96) Lacourciere, G. M.; Levine, R. L.; Stadtman, T. C. Direct Detection of Potential Selenium Delivery Proteins by Using an *Escherichia coli* Strain Unable to Incorporate Selenium from Selenite into Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99(14), 9150–9153.

- (97) Yuan, J.; Hohn, M. J.; Sherrer, R. L.; Palioura, S.; Su, D.; Söll Dieter, D. A TRNA-Dependent Cysteine Biosynthesis Enzyme Recognizes the Selenocysteine-Specific TRNA in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 2010, 584(13), 2857–2861.
- (98) Sarret, G.; Avoscan, L.; Carrière, M.; Collins, R.; Geoffroy, N.; Carrot, F.; Covès, J.; Gouget, B. Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(5), 2331–2337.
- (99) Gerrard, T. L.; Telford, J. N.; Williams, H. H. Detection of Selenium Deposits in *Escherichia coli* by Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology* 1974, 119(3), 1057-1060.
- (100) Tetteh, A. Y.; Sun, K. H.; Hung, C. Y.; Kittur, F. S.; Ibeanu, G. C.; Williams, D.; Xie, J. Transcriptional Response of Selenopolypeptide Genes and Selenocysteine Biosynthesis Machinery Genes in *Escherichia coli* during Selenite Reduction. *Int. J. Microbiol.*, 2014.
- (101) Wang, X.; Liu, G.; Zhou, J.; Wang, J.; Jin, R.; Lv, H. Quinone-Mediated Reduction of Selenite and Tellurite by *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102(3), 3268–3271.
- (102) Zhu, T. T.; Tian, L. J.; Yu, H. Q. Phosphate-Suppressed Selenite Biotransformation by *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 2020, 54(17), 10713–10721.
- (103) Van Fleet-Stalder, V.; Chasteen, T. G.; Pickering, I. J.; George, G. N.; Prince, R. C. Fate of Selenate and Selenite Metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(11), 4849–4853.
- (104) Ji, Y.; Wang, Y.-T. Selenium Reduction by Batch Cultures of *Escherichia coli* Strain EWB32213. *J. Environ. Eng.*, 2017, 143(6), 04017009.
- (105) Ma, J.; Kobayashi, D. Y.; Yee, N. Role of Menaquinone Biosynthesis Genes in Selenate Reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 and *Escherichia coli* K12. *Environ. Microbiol.* 2009, 11(1), 149–158.
- (106) Kousha, M.; Yeganeh, S.; Keramat Amirkolaie, A. Effect of Sodium Selenite on the Bacteria Growth, Selenium Accumulation, and Selenium Biotransformation in *Pediococcus acidilactici*. *Food Sci. Biotechnol.*, 2017, 26(4), 1013–1018.
- (107) Kora, A. J.; Rastogi, L. Bacteriogenic Synthesis of Selenium Nanoparticles by *Escherichia coli* ATCC 35218 and Its Structural Characterisation. *IET Nanobiotechnology* 2017, 11(2), 179–184.

- (108) Hapuarachchi, S.; Swearingen, J.; Chasteen, T. G. Determination of Elemental and Precipitated Selenium Production by a Facultative Anaerobe Grown under Sequential Anaerobic/Aerobic Conditions. *Process Biochem.*, 2004, 39(11), 1607–1613.
- (109) Palomo-Siguero, M.; Gutiérrez, A. M.; Pérez-Conde, C.; Madrid, Y. Effect of Selenite and Selenium Nanoparticles on Lactic Bacteria: A Multi-Analytical Study. *Microchem. J.* 2016, 126, 488–495.
- (110) Pieniz, S.; Andreatza, R.; Mann, M. B.; Camargo, F.; Brandelli, A. Bioaccumulation and Distribution of Selenium in *Enterococcus durans*. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2017, 40, 37–45.
- (111) Krittaphol, W.; Wescombe, P. A.; Thomson, C. D.; McDowell, A.; Tagg, J. R.; Fawcett, J. P. Metabolism of L-Selenomethionine and Selenite by Probiotic Bacteria: In Vitro and in Vivo Studies. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 144(1–3), 1358–1369.
- (112) Gouget, B.; Avoscan, L.; Sarret, G.; Collins, R.; Carrière, M. Resistance, Accumulation and Transformation of Selenium by the Cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803 after Exposure to Inorganic SeVI or SeIV. *Radiochim. Acta* 2005, 93, 683–689.
- (113) Medina Cruz, D.; Mi, G.; Webster, T. J. Synthesis and Characterization of Biogenic Selenium Nanoparticles with Antimicrobial Properties Made by *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2018, 106(5), 1400–1412.
- (114) Yan, Z.; Qian, J.; Gu, Y.; Su, Y.; Ai, X.; Wu, S. Green Biosynthesis of Biocompatible CdSe Quantum Dots in Living *Escherichia coli* Cells. *Mater. Res. Express* 2014, 1, 015401.
- (115) Xia, X.; Zhou, Z.; Wu, S.; Wang, D.; Zheng, S.; Wang, G. Adsorption Removal of Multiple Dyes Using Biogenic Selenium Nanoparticles from an *Escherichia coli* Strain Overexpressed Selenite Reductase CsrF. *Nanomaterials* 2018, 8, 234.
- (116) Nascimento, A. M.; Chartone-Souza, E. Operon Mer: Bacterial Resistance to Mercury and Potential for Bioremediation of Contaminated Environments. *Genet. Mol. Res.*, 2003, 2(1), 92-101.
- (117) Syversen, T.; Kaur, P. The Toxicology of Mercury and Its Compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2012, 215–226.

- (118) Nogara, P. A.; Oliveira, C. S.; Schmitz, G. L.; Piquini, P. C.; Farina, M.; Aschner, M.; Rocha, J. B. T. Methylmercury's Chemistry: From the Environment to the Mammalian Brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 2019, 1863, 129284.
- (119) Ralston, N. V. C.; Raymond, L. J. Mercury's Neurotoxicity Is Characterized by Its Disruption of Selenium Biochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta* 2018, 2405–2416.
- (120) Mahbub, K. R.; Krishnan, K.; Naidu, R.; Megharaj, M. Mercury Remediation Potential of a Mercury Resistant Strain *Sphingopyxis* sp. SE2 Isolated from Contaminated Soil. *J. Environ. Sci. (China)* 2017, 51, 128–137.
- (121) Obrist, D.; Kirk, J. L.; Zhang, L.; Sunderland, E. M.; Jiskra, M.; Selin, N. E. A Review of Global Environmental Mercury Processes in Response to Human and Natural Perturbations: Changes of Emissions, Climate, and Land Use. *Ambio* 2018, 47(2), 116–140.
- (122) Budnik, L. T.; Casteleyn, L. Mercury Pollution in Modern Times and Its Socio-Medical Consequences. *Sci. Total Environ.*, 2019, 654, 720–734.
- (123) Gonzalez-Raymat, H.; Liu, G.; Liriano, C.; Li, Y.; Yin, Y.; Shi, J.; Jiang, G.; Cai, Y. Elemental Mercury: Its Unique Properties Affect Its Behavior and Fate in the Environment. *Environmental Pollution* 2017, 69–86.
- (124) Zhu, S.; Zhang, Z.; Žagar, D. Mercury Transport and Fate Models in Aquatic Systems: A Review and Synthesis. *Sci. Total Environ.*, 2018, 538–549.
- (125) Summers, A. O. Organization, Expression, and Evolution of Genes for Mercury Resistance. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1986, 40, 607–634.
- (126) Mathema, V. B.; Thakuri, B. C.; Sillanpää, M. Bacterial Mer Operon-Mediated Detoxification of Mercurial Compounds: A Short Review. *Archives of Microbiology* 2011, 837–844.
- (127) Murtaza, I.; Dutt, A.; Ali, A. Relationship between the Persistence of Mer Operon Sequences in *Escherichia coli* and Their Resistance to Mercury. *Curr. Microbiol.*, 2002, 44(3), 178–183.
- (128) Summers, A. O.; Weiss, R. B.; Jacoby, G. A. Transposition of Mercury Resistance from a Transferable R Plasmid of *Escherichia coli*. *Plasmid* 1980, 3, 35–47.
- (129) Osborn, A. M.; Bruce, K. D.; Strike, P.; Ritchie, D. A. Distribution, Diversity and Evolution of the Bacterial Mercury Resistance (Mer) Operon. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 19(4), 239–262.

- (130) Misra, T. K. Bacterial Resistances to Inorganic Mercury Salts and Organomercurials. *Plamid* 1992, 27, 4–16.
- (131) Wang, Y.; Mahler, I.; Levinson, H. S.; Halvorson, H. O. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Chromosomal Mercury Resistance Genes from a *Bacillus* sp. *Journal of Bacteriology* 1987, 169(10), 4848-4851.
- (132) Barkay, T.; Miller, S. M.; Summers, A. O. Bacterial Mercury Resistance from Atoms to Ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 2003, 355–384.
- (133) Mishra, B.; Shoенfelt, E.; Yu, Q.; Yee, N.; Fein, J. B.; Myneni, S. C. B. Stoichiometry of Mercury-Thiol Complexes on Bacterial Cell Envelopes. *Chem. Geol.* 2017, 464, 137–146.
- (134) Holmes, P.; James, K. A. F.; Levy, L. S. Is Low-Level Environmental Mercury Exposure of Concern to Human Health? *Sci. Total Environ.*, 2009, 171–182.
- (135) Kim, K. H.; Kabir, E.; Jahan, S. A. A Review on the Distribution of Hg in the Environment and Its Human Health Impacts. *J. Hazard. Mater.*, 2016, 306, 376–385.
- (136) Ha, E.; Basu, N.; Bose-O'Reilly, S.; Dórea, J. G.; McSorley, E.; Sakamoto, M.; Chan, H. M. Current Progress on Understanding the Impact of Mercury on Human Health. *Environ. Res.*, 2017, 152, 419–433.
- (137) de Almeida Rodrigues, P.; Ferrari, R. G.; dos Santos, L. N.; Conte Junior, C. A. Mercury in Aquatic Fauna Contamination: A Systematic Review on Its Dynamics and Potential Health Risks. *J. Environ. Sci. (China)* 2019, 205–218.
- (138) European Food Safety Authority (EFSA) - Scientific Opinion on the Risk for Public Health Related to the Presence of Mercury and Methylmercury in Food. *EFSA Journal* 2012, 10(12), 2985.
- (139) Dórea, J. G. Abating Mercury Exposure in Young Children Should Include Thimerosal-Free Vaccines. *Neurochemical Research.*, 2017, 2673–2685.
- (140) Gailer, J. Arsenic-Selenium and Mercury-Selenium Bonds in Biology. *Coordination Chemistry Reviews* 2007, 234–254.
- (141) Rooney, J. P. K. The Role of Thiols, Dithiols, Nutritional Factors and Interacting Ligands in the Toxicology of Mercury. *Toxicology* 2007, 145–156.
- (142) Riccardi, D.; Guo, H. B.; Parks, J. M.; Gu, B.; Summers, A. O.; Miller, S. M.; Liang, L.; Smith, J. C. Why Mercury Prefers Soft Ligands. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, 4(14), 2317–2322.

- (143) Carvalho, C. M. L.; Chew, E. H.; Hashemy, S. I.; Lu, J.; Holmgren, A. Inhibition of the Human Thioredoxin System: A Molecular Mechanism of Mercury Toxicity. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283(18), 11913–11923.
- (144) Branco, V.; Canário, J.; Lu, J.; Holmgren, A.; Carvalho, C. Mercury and Selenium Interaction in Vivo: Effects on Thioredoxin Reductase and Glutathione Peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, 52(4), 781–793.
- (145) Branco, V.; Carvalho, C. The Thioredoxin System as a Target for Mercury Compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2019, 1863(12), 129255.
- (146) Chen, C.; Yu, H.; Zhao, J.; Li, B.; Qu, L.; Liu, S.; Zhang, P.; Chai, Z. The Roles of Serum Selenium and Selenoproteins on Mercury Toxicity in Environmental and Occupational Exposure. *Environmental Health Perspectives* 2006, 297–301.
- (147) García-Sevillano, M. A.; Rodríguez-Moro, G.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gómez-Ariza, J. L. Biological Interactions between Mercury and Selenium in Distribution and Detoxification Processes in Mice under Controlled Exposure. Effects on Selenoprotein. *Chem. Biol. Interact.*, 2015, 229, 82–90.
- (148) Bjørklund, G. Selenium as an Antidote in the Treatment of Mercury Intoxication. *BioMetals* 2015, 28(4), 605–614.
- (149) Zhao, J.; Gao, Y.; Li, Y. F.; Hu, Y.; Peng, X.; Dong, Y.; Li, B.; Chen, C.; Chai, Z. Selenium Inhibits the Phytotoxicity of Mercury in Garlic (*Allium Sativum*). *Environ. Res.*, 2013, 125, 75–81.
- (150) Parizek J, O. I. The Protective Effect of Small Amounts of Selenite in Sublimate in Toxication. *Experientia* 1967, 23, 142–143.
- (151) Bjørklund, G.; Aaseth, J.; Ajsuvakova, O. P.; Nikonorov, A. A.; Skalny, A. V.; Skal'naya, M. G.; Tinkov, A. A. Molecular Interaction between Mercury and Selenium in Neurotoxicity. *Coordination Chemistry Reviews* 2017, 30–37.
- (152) Horvat, M.; Nolde, N.; Fajon, V.; Jereb, V.; Logar, M.; Lojen, S.; Jacimovic, R.; Falnoga, I.; Liya, Q.; Faganelli, J.; Drobne D. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Sci. Total Environ.*, 2003, 304, 231–256.
- (153) Faial, K.; Deus, R.; Deus, S.; Neves, R.; Jesus, I.; Santos, E.; Alves, C. N.; Brasil, D. Mercury Levels Assessment in Hair of Riverside Inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: Fish Consumption as a Possible Route of Exposure. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, 30, 66–76.

- (154) Shang, X.; Wang, B.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Lu, Y.; Liu, S.; Li, Y. Selenium-Enriched *Bacillus subtilis* Reduces the Effects of Mercury-Induced on Inflammation and Intestinal Microbes in Carp (*Cyprinus Carpio* Var. *Specularis*). *Fish Physiol. Biochem.*, 2022, 48(1), 215–226.
- (155) Penglase, S.; Hamre, K.; Ellingsen, S. Selenium Prevents Downregulation of Antioxidant Selenoprotein Genes by Methylmercury. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, 75, 95–104.
- (156) Wang, X.; He, Z.; Luo, H.; Zhang, M.; Zhang, D.; Pan, X.; Gadd, G. M. Multiple-Pathway Remediation of Mercury Contamination by a Versatile Selenite-Reducing Bacterium. *Sci. Total Environ.*, 2018, 615, 615–623.
- (157) Liu, C. bin; Zhang, L.; Wu, Q.; Qu, G. bo; Yin, Y. guang; Hu, L. gang; Shi, J. bo; Jiang, G. bin. Mutual Detoxification of Mercury and Selenium in Unicellular Tetrahymena. *J. Environ. Sci. (China)* 2018, 68, 143–150.
- (158) Belzile, N.; Wu, G. J.; Chen, Y. W.; Appanna, V. D. Detoxification of Selenite and Mercury by Reduction and Mutual Protection in the Assimilation of Both Elements by *Pseudomonas fluorescens*. *Sci. Total Environ.*, 2006, 367(2–3), 704–714.
- (159) Yang, D. Y.; Chen, Y. W.; Belzile, N. Evidences of Non-Reactive Mercury-Selenium Compounds Generated from Cultures of *Pseudomonas fluorescens*. *Sci. Total Environ.*, 2011, 409(9), 1697–1703.
- (160) Truong, H. Y. T.; Chen, Y. W.; Saleh, M.; Nehzati, S.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Belzile, N. Proteomics of *Desulfovibrio desulfuricans* and X-Ray Absorption Spectroscopy to Investigate Mercury Methylation in the Presence of Selenium. *Metallomics* 2014, 6(3), 465–475.
- (161) Truong, H. Y. T.; Chen, Y. W.; Belzile, N. Effect of Sulfide, Selenite and Mercuric Mercury on the Growth and Methylation Capacity of the Sulfate Reducing Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Sci. Total Environ.*, 2013, 449, 373–384.
- (162) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; C, S. R. F. *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed.; Cengage Learning: São Paulo, 2009.
- (163) Oliveira, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, 14(2), 174–182.
- (164) Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E. Mecanização no Preparo de Amostras por Microondas: O Estado da Arte. *Quím. Nova* 1997, 20(6), 638–643.

- (165) Hockin, S.; Gadd, G. M. Removal of Selenate from Sulfate-Containing Media by Sulfate-Reducing Bacterial Biofilms. *Environ. Microbiol.*, 2006, 8(5), 816–826.
- (166) Mörschbacher, A. P.; Dullius, A.; Dullius, C. H.; Bandt, C. R.; Kuhn, D.; Brietzke, D. T.; Malmann Kuffel, F. J.; Etgeton, H. P.; Altmayer, T.; Gonçalves, T. E.; Oreste, E. Q.; Ribeiro, A. S.; de Souza, C. F. V.; Hoehne, L. Validation of an Analytical Method for the Quantitative Determination of Selenium in Bacterial Biomass by Ultraviolet–Visible Spectrophotometry. *Food Chem.*, 2018, 255, 182–186.
- (167) Piacenza, E.; Presentato, A.; Bardelli, M.; Lampis, S.; Vallini, G.; Turner, R. J. Influence of Bacterial Physiology on Processing of Selenite, Biogenesis of Nanomaterials and Their Thermodynamic Stability. *Molecules* 2019, 24 (14), 2532.
- (168) Bebien, M.; Chauvin, J. P.; Adriano, J. M.; Grosse, S.; Verméglio, A. Effect of Selenite on Growth and Protein Synthesis in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(10), 4440–4447.
- (169) Pusztahelyi, T.; Kovács, S.; Pócsi, I.; Prokisch, J. Selenite-Stress Selected Mutant Strains of Probiotic Bacteria for Se Source Production. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, 30, 96–101.
- (170) Krausova, G.; Kana, A.; Hyrslova, I.; Mrvikova, I.; Kavkova, M. Development of Selenized Lactic Acid Bacteria and Their Selenium Bioaccumulation Capacity. *Fermentation* 2019, 6, 91.
- (171) Hyrslova, I.; Kana, A.; Kantorova, V.; Krausova, G.; Mrvikova, I.; Doskocil, I. Selenium Accumulation and Biotransformation in *Streptococcus*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* Strains. *J. Funct. Foods* 2022, 92, 105056.
- (172) Vacchina, V.; Foix, D.; Menta, M.; Martinez, H.; Séby, F. Optimization of Elemental Selenium (Se(0)) Determination in Yeasts by Anion-Exchange HPLC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, 413(7), 1809–1816.
- (173) Nogueira, A. (Ed.). *ICP-MS Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado*. Quipá: Iguatu, 2023.
- (174) Luque-Garcia, J. L.; Cabezas-Sanchez, P.; Anunciação, D. S.; Camara, C. Analytical and Bioanalytical Approaches to Unravel the Selenium-Mercury Antagonism: A Review. *Anal. Chim. Acta* 2013, 801, 1–13.

- (175) Pettine, M.; McDonald, T. J.; Sohn, M.; Anquandah, G. A. K.; Zboril, R.; Sharma, V. K. A critical review of selenium analysis in natural water samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 2015, 5, 1–7.
- (176) de Jesus, J. R.; Arruda, M. A. Z. A Feasible Strategy Based on High Ultrasound Frequency and Mass Spectrometry for Discriminating Individuals Diagnosed with Bipolar Disorder and Schizophrenia through Ionic Profile. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, 34(S3).
- (177) Welz, B.; S Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3th ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- (178) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Compendium of Chemical Terminology - Gold Book*, 1987. <https://goldbook.iupac.org/> (accessed on 30/03/2020).
- (179) Chess, B.; Talaro, K. P. *Talaro's Foundations in Microbiology*. 11th ed.; McGraw-Hill; 2021.
- (180) Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L.; Painter, P. R. *General Microbiology*. 5th ed.; MacMillan: London, 1987.
- (182) Ding, L.; Li, X.; Liu, P.; Li, S.; Lv, J. Study of the Action of Se and Cu on the Growth Metabolism of *Escherichia coli* by Microcalorimetry. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010, 137 (3), 364–372.
- (183) Gupta, N.; Ali, A. Mercury Volatilization by R Factor Systems in *Escherichia coli* Isolated from Aquatic Environments of India. *Curr. Microbiol.*, 2004, 48 (2), 88–96.
- (184) Gaeta, N. C.; de Carvalho, D. U.; Fontana, H.; Sano, E.; Moura, Q.; Fuga, B.; Munoz, P. M.; Gregory, L.; Lincopan, N. Genomic Features of a Multidrug-Resistant and Mercury-Tolerant Environmental *Escherichia coli* Recovered after a Mining Dam Disaster in South America. *Sci. Total Environ.*, 2022, 823, 153590.
- (185) Yang, H.; Wei, S. H.; Hobman, J. L.; Dodd, C. E. R. Antibiotic and Metal Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Pig Slaughterhouses in the United Kingdom. *Antibiotics* 2020, 9 (11), 1–19.
- (186) Nakahara, H.; Ishikawa, T.; Sarai, Y.; Kondo, I.; Kozukue, H.; Mitsuhashi, S. Mercury Resistance and R Plasmids in *Escherichia coli* Isolated from Clinical Lesions in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1977, 11(6), 999–1003.

- (187) López, M. A. S.; Iparraguirre, D. E. A. Association of Mercury Resistance with Resistance to Antibiotics in *Escherichia coli* Isolated from the Coast of Lima, Peru. *Rev. Peru. Biol.*, 2018, 25(4), 445–452.
- (188) National Center for Biotechnology Information (NCBI). BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 2024-03-21).
- (189) Thomas, S. A.; Gaillard, J. F. Cysteine Addition Promotes Sulfide Production and 4-Fold Hg(II)-S Coordination in Actively Metabolizing *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51 (8), 4642–4651.
- (190) Colaço, H. G.; Santo, P. E.; Matias, P. M.; Bandejas, T. M.; Vicente, J. B. Roles of *Escherichia coli* ZinT in Cobalt, Mercury and Cadmium Resistance and Structural Insights into the Metal Binding Mechanism. *Metallomics* 2016, 8(3), 327–336.
- (191) Cruz, K.; Guézennec, J.; Barkay, T. Binding of Hg by Bacterial Extracellular Polysaccharide: A Possible Role in Hg Tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101 (13), 5493–5503.
- (192) Najera, I.; Lin, C. C.; Kohbodi, G. A.; Jay, J. A. Effect of Chemical Speciation on Toxicity of Mercury to *Escherichia coli* Biofilms and Planktonic Cells. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39(9), 3116–3120.
- (193) Kōmura, I.; Izaki, K.; Takahashi, H. Vaporization of Inorganic Mercury by Cell-Free Extracts of Drug Resistant *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry* 1970, 480–482.
- (194) Gao, Y.; Peng, X.; Zhang, J.; Zhao, J.; Li, Y.; Li, Y.; Li, B.; Hu, Y.; Chai, Z. Cellular Response of *E. coli* upon Hg<sup>2+</sup> Exposure – A Case Study of Advanced Nuclear Analytical Approach to Metalloproteomics. *Metallomics* 2013, 5(7), 913–919.
- (195) Nies, D. H. Efflux-Mediated Heavy Metal Resistance in Prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, 27(2–3), 313–339.
- (196) Manceau, A.; Nagy, K. L.; Glatzel, P.; Bourdineaud, J. P. Acute Toxicity of Divalent Mercury to Bacteria Explained by the Formation of Dicysteinate and Tetracysteinate Complexes Bound to Proteins in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Technol.* 2021, 55(6), 3612–3623.

- (197) Xu, F. F.; Imlay, J. A. Silver(I), Mercury(II), Cadmium(II), and Zinc(II) Target Exposed Enzymic Iron-Sulfur Clusters When They Toxicify *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(10), 3614–3621.
- (198) LaVoie, S. P.; Summers, A. O. Transcriptional Responses of *Escherichia coli* during Recovery from Inorganic or Organic Mercury Exposure. *BMC Genomics* 2018, 19(1).
- (199) Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*; Latimer, G. W. (Ed.); Oxford University Press: New York, 2023.
- (200) Wyatt, L. H.; Diringier, S. E.; Rogers, L. A.; Hsu-Kim, H.; Pan, W. K.; Meyer, J. N. Antagonistic Growth Effects of Mercury and Selenium in *Caenorhabditis elegans* Are Chemical-Species-Dependent and Do Not Depend on Internal Hg/Se Ratios. *Environ. Sci. Technol.*, 2016, 50(6), 3256–3264.
- (201) Frisk, P.; Wester, K.; Yaqob, A.; Lindh, U. Selenium Protection Against Mercury-Induced Apoptosis and Growth Inhibition in Cultured K-562 Cells. *Biological Trace Element Research* 2003, 92, 105.
- (202) Lee, L. H.; Lustigman, B. K.; Murray, S. R. Combined Effect of Mercuric Chloride and Selenium Dioxide on the Growth of the Cyanobacteria, *Anacystis nidulans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2002, 69(6), 900–907.
- (203) Gailer, J.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Madden, S.; Prince, R. C.; Yu, E. Y.; Denton, M. B.; Younis, H. S.; Aposhian, H. V. Structural Basis of the Antagonism between Inorganic Mercury and Selenium in Mammals. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13(11), 1135–1142.
- (204) Ralston, N. V. C.; Blackwell, J. L.; Raymond, L. J. Importance of Molar Ratios in Selenium-Dependent Protection against Methylmercury Toxicity. *Biological Trace Element Research* 2007, 119, 255–268.
- (205) Zhao, J.; Hu, Y.; Gao, Y.; Li, Y.; Li, B.; Dong, Y.; Chai, Z. Mercury Modulates Selenium Activity via Altering Its Accumulation and Speciation in Garlic (*Allium sativum*). *Metallomics* 2013, 5(7), 896–903.

## ANEXOS

**Tabela A.** Médias e desvio padrão para o percentual médio de Se bioacumulado (%) para cada combinação de espécie e concentração de Se. ANOVA,  $F(1.28) = 9,299$ ; p-valor = 0,005.

Se	Técnica analítica	Se (%) (sd)	n	Se (%) (sd)	n	PWC
Se(IV)	0,3 $\mu$ M	GF AAS	3	18,90 (0,981)	6	a
		ICP-MS	2			
	3,0 $\mu$ M	GF AAS	3	5,90 (0,395)	6	b
		ICP-MS	2			
	30 $\mu$ M	GF AAS	3	40,50 (1,460)	6	c; i
		ICP-MS	2			
Se(VI)	0,3 $\mu$ M	GF AAS	3	17,80 (0,748)	6	
		ICP-MS	2			
	3,0 $\mu$ M	GF AAS	3	5,24 (0,148)	6	
		ICP-MS	2			
	30 $\mu$ M	GF AAS	3	14,60 (1,750)	6	ii
		ICP-MS	2			

Comparações pareadas (PWC): Caracteres arábicos (a, b) representam médias significativamente diferentes entre concentrações de Se(IV); caracteres romanos (i, ii, iii) representam médias significativamente diferentes entre as espécies de Se na concentração de 30 $\mu$ M.

A ANOVA de três fatores entre técnica analítica, espécies e concentrações de Se resultou em  $F(1.28) = 0,00074$  e p-valor = 0,978.

**Tabela B.** Médias e desvios padrões de viabilidade celular de *E. coli* ( $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ) em ensaios de interação com diferentes concentrações de Se(IV). ANOVA,  $F(1.13) = 9,41$ ; p-valor = 0.009.

Se(IV) ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidade	sd	n	Teste de Tukey
0	8,49	0,230		a
30	8,48	0,223		a
60	8,21	0,107	9	b
120	8,12	0,284		b
500	8,30	0,342		a,b

Teste de Tukey: Caracteres distintos representam médias significativamente diferentes entre as concentrações de Se(IV).

**Tabela C.** Médias e desvios padrões de viabilidade celular de *E. coli* ( $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ) em ensaios de interação com diferentes concentrações e espécies de Se. ANOVA,  $F(1.20) = 0,006$ ; p-valor = 0,941.

Se	Viabilidade	sd	n
Se(IV)	0 $\mu\text{M}$	9,09	6
Se(VI)		9,09	
Se(IV)	0,3 $\mu\text{M}$	9,01	6
Se(VI)		9,03	
Se(IV)	3,0 $\mu\text{M}$	9,05	6
Se(VI)		9,02	
Se(IV)	30 $\mu\text{M}$	9,07	6
Se(VI)		9,08	

Se(IV) e Se(VI) 0  $\mu\text{M}$  representam o controle.

**Tabela D.** Médias e desvios padrão de viabilidade celular ( $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ) de *E. coli* na interação entre espécie de Se, ordem de coexposição e concentração de Hg. ANOVA,  $F(3.126) = 2,799$ ; p-valor = 0,043.

Se	Coexposição	Hg ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidade	sd	n	Teste de Tukey
Se(IV)	Pós	0	9,09	0,090	14	a
		15	8,87	0,108	26	b
	Pré	0	9,05	0,106	14	a
		15	8,92	0,117	26	b
Se(VI)	Pós	0	9,09	0,090	14	a
		15	8,79	0,146	26	b; i
	Pré	0	9,03	0,077	14	a
		15	8,95	0,070	26	b; ii

Teste de Tukey: Caracteres arábicos (a, b) representam viabilidades médias diferentes entre as concentrações de Hg (0 e  $15\mu\text{M}$ ) em cada tipo de coexposição e espécie de Se. Caracteres romanos (i, ii) representam médias de viabilidade celular diferentes entre as ordens de coexposição pré e pós com  $15\mu\text{M}$  de Hg para a espécie de Se(VI).

**Tabela E.** Médias e desvios padrão de viabilidade celular ( $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ) de *E. coli* na interação entre as concentração de Se e de Hg. ANOVA,  $F(3.126) = 4,893$ ; p-valor = 0,0030

Se	Hg ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidade	sd	n	Teste de Tukey
0 $\mu\text{M}$	0	9,10	0,085	18	a
	15	8,94	0,113	20	b; i
0,3 $\mu\text{M}$	0	9,02	0,082	12	a
	15	8,92	0,106	28	b, i
3,0 $\mu\text{M}$	0	9,04	0,120	12	a
	15	8,89	0,126	28	b, i
30 $\mu\text{M}$	0	9,08	0,067	12	a
	15	8,80	0,119	28	b, ii

Teste de Tukey: Caracteres arábicos (a, b) representam viabilidades celulares médias diferentes entre as concentrações de Hg (0 e  $15\mu\text{M}$ ) em cada nível de concentração de Se. Caracteres romanos (i, ii) representam médias de viabilidade celular diferentes entre as concentrações de Se na concentração de Hg de  $15\mu\text{M}$ .

**Tabela F.** Médias e desvios padrões do percentual de Se bioacumulado na interação entre espécies e concentrações de Se. ANOVA,  $F(1.42) = 10,082$ ; p-valor = 0,0030.

Se	Se bioacumulado (%)	sd	n	Teste de Tukey
Se(IV)	0,3 $\mu$ M	21,80	9	a,b
Se(VI)		21,55		$\alpha$
Se(IV)	3,0 $\mu$ M	13,83	9	a
Se(VI)		11,32		$\beta$
Se(IV)	30 $\mu$ M	22,35	9	b;i
Se(VI)		9,67		$\beta$ ;ii

Teste de Tukey: Caracteres arábicos (a, b) representam (%) médios de Se bioacumulado diferentes entre as concentrações de Se(IV); caracteres gregos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) indicam diferenças entre as concentrações de Se(VI); caracteres romanos (i, ii) indicam diferenças entre as espécies em cada nível de concentração de Se.

**Tabela G.** Médias e desvios padrões do percentual de Se bioacumulado na interação entre concentração de Se e tipo de exposição. ANOVA,  $F(2.42) = 16,81$ ; p-valor =  $4,3 \times 10^{-6}$ .

Se	Exposição	Se bioacumulado (%)	sd	n	Teste de Tukey
0,3 $\mu$ M	Se	18,13	0,477	6	a
	Pós	23,06	2,321		$\alpha$
	Pré	23,84	2,020		A
3,0 $\mu$ M	Se	5,65	0,507	6	b; i
	Pós	16,64	1,711		$\beta$ ; ii
	Pré	15,43	2,081		B; ii
30 $\mu$ M	Se	28,48	13,937	6	a; i
	Pós	8,63	2,629		$\gamma$ ; ii
	Pré	10,93	4,365		B; ii

Teste de Tukey: Caracteres arábicos (a, b) representam a % médios de Se bioacumulado diferentes entre as concentrações de Se(IV); caracteres gregos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) indicam diferenças entre as concentrações de Se(VI) e caracteres romanos (i, ii) indicam diferenças entre as espécies em cada nível de concentração de Se.