

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

TUANNY FERNANDA GONÇALVES FARIAS

**SELEÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SP. RESISTENTE AO COBRE E
MERCÚRIO COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2016

TUANNY FERNANDA GONÇALVES FARIAS

SELEÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SP. RESISTENTE A COBRE E A MERCÚRIO COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

Orientador (a): prof^a Dr^a. Luciana Furlaneto Maia

LONDRINA

2016



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Monografia

SELEÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SP. RESISTENTE A COBRE E A MERCÚRIO COM
POTENCIAL APLICAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO

por

TUANNY FERNANDA GONÇALVES FARIAS

Monografia apresentada no dia 21 de Novembro de 2016 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____
(aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

Profa. Dr. Juliana Feijó de Souza Daniel
(UTFPR)

Profa. Camila Zoe Correa
(UTFPR)

Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Ligia Flávia Antunes Batista
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

Obs: A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e coragem para completar mais esta etapa em minha vida. Aos meus familiares pelo extraordinário apoio em todos esses anos, amor maior que tudo.

Agradeço aos meus Amigos que muito me ajudaram em diversos momentos ao longo de todos esses anos. Agradeço principalmente a Marcela Barizon por estar sempre ao meu lado e aos parceiros de laboratório por toda ajuda nos experimentos André Beninca, Larissa Botura e outros.

À minha orientadora Professora Dr^a Luciana Furlaneto Maia por ter me aceitado em seus projetos, pelas orientações e correções.

E meu muito obrigado com todo carinho especial a Márcia Terra, uma profissional imensamente brilhante, responsável e generosa que me proporcionou toda ajuda necessária para realização deste trabalho. Estarei sempre em dívida por isso.

Agradeço a todos!

RESUMO

GONÇALVES, Tuanny F. Seleção de *Enterococcus* sp. Resistente a Cobre a e Mercúrio com Potencial Aplicação na Biorremediação. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

A presença de metais pesados pode ocorrer naturalmente ou como consequência de atividades antropogênicas. O mercúrio é um dos elementos mais tóxicos, já o cobre é um micronutriente essencial para todos os seres vivos, porém em grandes concentrações pode causar sérios problemas ambientais. Sendo assim, concentrações elevadas de metais no meio ambiente levam espécies de bactérias a adquirem resistência pela presença de genes de resistência. Considerando este cenário, o objetivo deste trabalho foi verificar a resistência a metais pesados em bactérias do gênero *Enterococcus* sp. Foram incluídos neste estudo 72 isolados provenientes de água, solo e sedimento. O *screening* de resistência foi aplicado pela técnica da placa gradiente, contendo concentrações crescentes de íon cobre. Posteriormente, os isolados foram testados em placa de microdiluição contendo 0,018, 0,009 e 0,0045 mg/L do metal. A presença de genes que conferem resistência a cobre (*tcrB*) e mercúrio (*merA*) foi verificada pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os resultados revelaram que 100% dos isolados foram resistentes a todas as concentrações de cobre analisada. O gene *tcrB* estava presente em 44% dos isolados. O gene *merA* não foi detectado. Considerando a carência de pesquisas dessa natureza no Brasil, este estudo gera informações que podem contribuir no uso destas bactérias para a descontaminação dos metais pesados em uma determinada área.

Palavras-chave: *Enterococcus* sp, Metais Pesados, Biorremediação.

ABSTRACT

GONÇALVES, Tuanny F. Selection of *Enterococcus* sp. Resistant to Copper and Mercury with Potential Application in Bioremediation. 2016. Course Completion Work (Bachelor of Environmental Engineering). Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2016.

The presence of heavy metals can occur naturally or as a consequence of anthropogenic activities. Mercury is one of the most toxic elements, since copper is an essential micronutrient for all living things, but in large concentrations can cause serious environmental problems. Thus, high concentrations of metals in the environment lead to bacterial species becoming resistant by the presence of resistance genes. Considering this scenario, the objective of this work was to verify the resistance to heavy metals in *Enterococcus* sp. This study included 72 isolates from water, soil and sediment. Resistance screening was applied by the gradient plate technique, containing increasing concentrations of copper ion. Subsequently, the isolates were tested on a microdilution plate containing 0.018, 0.009 and 0.0045 mg/L of the metal. The presence of genes that confer resistance to copper (*tcrB*) and mercury (*merA*) was verified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The results revealed that 100% of the isolates were resistant to all concentrations of copper analyzed. The *tcrB* gene was present in 44% of the isolates. The *merA* gene was not detected. Considering the lack of research of this nature in Brazil, this study generates information that may contribute to the use of these bacteria for the decontamination of heavy metals in a given area.

Key-words: *Enterococcus* sp, Heavy metals, Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do mercúrio	15
Figura 2 - Conversões químicas do mercúrio	16
Figura 3 - Mecanismo de resistência ao mercúrio	25
Figura 4 - Homeostase do cobre em bactéria <i>E.hirae</i>	26
Figura 5 - (A)Placa com meio nutritivo sem metal, levemente inclinada (1ª figura); placa com o meionutritivo e mais uma concentração de metal (2ª figura); (B) esquema do inóculo realizado no eixo do gradiente da placa	32
Figura 6 - Representação da técnica microdiluição em ágar.....	33
Figura 7 - Crescimento homogêneo dos isolados de <i>Enterococcus</i> sp em placa contendo cobre.....	36
Figura 8 - Isolados de <i>Enterococcus</i> sp. apresentando resistência na placa com a maior concentração de metal, intermediária concentração e menor concentração de metal cobre da técnica macrodiluição em agar	38
Figura 9 - Gráficos que demonstram a porcentagem da presença do gene <i>tcrB</i> detectado pela técnica PCR	38
Figura 10 - Gel de agarose demonstrativo da amplificação de PCR.....	38
Figura 11 - Gráfico de espécies encontradas possuindo o gene <i>tcrB</i>	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1 <i>ENTEROCOCCUS</i> sp	10
3.2 METAIS PESADOS	11
3.2.1 Mercúrio	14
3.2.2 Cobre	18
3.3 BIORREMEDIAÇÃO	20
3.3.1 Biorremediação do Cobre	23
3.3.2 Biorremediação do Mercúrio	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 AMOSTRAGEM	30
4.2 CULTIVO CELULAR	30
4.3 CONCENTRAÇÕES DE METAIS	31
4.3.1 SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS NO MÉTODO PLACA GRADIENTE ...	31
4.3.2 MÉTODO DE MACRODILUIÇÃO EM AGAR	32
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA	33
4.5 GENES <i>tcrB</i> E <i>merA</i> EM <i>ENTEROCOCCUS</i> sp.	34
4.6 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA AO NÍVEL DE GÊNERO E ESPÉCIES.....	35
5. RESULTADOS	36
5.1 PERFIS DE SUSCETIBILIDADE	36
5.2 DETECÇÃO DOS GENES <i>merA</i> E <i>tcrB</i> QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A MERCÚRIO E COBRE	37
6. CONCLUSÃO	41
REFERENCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A contaminação do solo e água por metais pesados aumentou devido à descarga de resíduos por atividades industriais e agrícolas. A poluição e degradação dos recursos naturais podem gerar desequilíbrios irreversíveis nos diferentes ecossistemas, elevando a toxicidade, carcinogênese e potencial de bioacumulação (SINGH, 2009).

Métodos de tratamentos convencionais de solos e água contaminados por metais pesados podem ser onerosos, ter baixa produtividade, além de possibilitar impactos adicionais ao ambiente devido à geração de subprodutos. Um dos tratamentos promissores é a biorremediação caracterizado por ser um processo em que se utilizam microrganismos autóctones sem qualquer interferência de tecnologias ativas (HAKEEM, 2015).

Esse método mostra-se interessante devido principalmente aos baixos custos, por possuírem mínima intervenção, e utilização de microrganismos isolados do próprio ambiente. Um dos microrganismos com potencial ação de biorremediação é o gênero *Enterococcus* sp, que desenvolveu uma medida de proteção a estes metais, tornando-se resistentes. Essa resistência, além das demais características, tornou as espécies deste gênero bastante adaptado no ambiente (MICHAEL, 1998; HASMAN et al., 2006).

Sendo mercúrio, um dos mais tóxicos dentre os metais e um dos mais usados na indústria, na agricultura e principalmente no garimpo, já o cobre necessitado pela grande maioria dos microrganismos em pequenas quantidades, comprometidos pela superexposição a este metal. Alguns estudos demonstraram a presença de genes de resistência a cobre e mercúrio em *Enterococcus* sp, e sua possível correlação com a biorremediação, porém no Brasil estes relatos ainda são escassos (EHLICH & NEWMAN, 2009; HASMAN & AARESTRUP, 2002).

Neste contexto, o trabalho objetiva avaliar a resistência de *Enterococcus* sp. frente ao metal cobre, bem como verificar a presença de genes de resistência a cobre e mercúrio nestes isolados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar o perfil fenotípico e genotípico quanto à resistência a cobre e a mercúrio respectivamente, de *Enterococcus* sp. isolados de água, solo e sedimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- Verificar a resistência de isolados de *Enterococcus* sp, utilizando as metodologias placa gradiente e microdiluição em agar, frente a diferentes concentrações de íons cobre.
- Avaliar o perfil genotípico por meio do método Reação em Cadeia Polimerase para genes de resistência a cobre e mercúrio.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *ENTEROCOCCUS* sp.

Enterococcus sp. são cocos Gram-positivos, cujas células são alongados ou ovoides, dispostos em pares ou em cadeias curtas, anaeróbios facultativos; com temperatura ótima de crescimento de 35° C, podendo crescer entre 10° C a 45° C, catalase negativa, oxidase negativa, crescem em uma solução de cloreto de sódio a 6,5%, hidrolisa a esculina na presença de sais biliares, α -hemolítica ou não hemolítica (SILVA, 2007; ENGELKIRK, 2008; BHATIA & ICHHPUJANI, 2008; SHERMAN, 2008).

O gênero apresenta diversas espécies, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies mais comumente encontradas, envolvendo vários estudos genéticos. Outras incluem: *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. pseudoavium*, *E. durans*, *E. alcedinis*, *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camalliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. diestrammenae*, *E. dispar*, *E. eurekensis*, *E. flavescens*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermanniensis*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. lemanii*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. munditi*, *E. olivae*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. plantarum*, *E. porcinus*, *E. quebecensis*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. rivorum*, *E. rotai*, *E. saccharolyticus*, *E. taiwanensis*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. ureasiticus*, *E. ureilyticus*, *E. villorum*, *E. xiangfangensis*, *E. viikkiensis* (BHATIA & ICHHPUJANI, 2008; MURRAY et al, 2011).

O habitat característico destas bactérias é o trato gastrointestinal de seres humanos e de outros animais de sangue quente, bem como, possa estar em isolados da orofaringe, trato genital feminino e também da pele (CHEN & ZERVOS, 2009; BHATIA & ICHHPUJANI, 2008).

No campo ecológico são encontrados nos mais diversos ambientes em água, solo e sedimento, pois como vivem na microbiota intestinal tanto de seres humanos quanto de mamíferos, através de seus dejetos se espalham ao longo do meio ambiente. Há espécies associadas com plantas, porém as espécies isoladas

de humanos e animais são as que foram estudadas mais afundo (CHEN & ZERVOS, 2009).

Enterococcus sp. diferenciam quanto ao desempenho no transporte de íons, sua regulação de cátions intracelular quando estão em elevadas concentrações no ambiente, tornando se tóxico para estas bactérias. *Enterococcus* sp. são capazes de gerar prótons apenas pela da hidrólise de ATP, numa reação mediada pela enzima de localização de prótons trans, ATPase, sendo assim, importantes bactérias de regulação de íons, através de suas membranas, o que vem reforçar sua resistência à metais pesados (MURRAY, 1990; LEBLANC, 2006; BHATIA & ICHHPUJANI, 2008).

3.2. METAIS PESADOS

Durante as duas últimas décadas, grande atenção tem sido dada à gestão da poluição ambiental e seu controle devido aos materiais perigosos. Os metais pesados referem-se a um grande grupo de oligoelementos com densidade relativamente elevada, não são biodegradáveis como a matéria orgânica, portanto, eles persistem no ambiente a longo prazo. Além disso, muitos são tanto industrialmente como biologicamente essenciais, mas tornam-se tóxicos com o aumento da concentração (THAKUR, 2006; HAKEEM et al., 2015; SHUKLA et al., 2011).

Os metais pesados estão presentes naturalmente na crosta terrestre e são encontrados nos solos, rochas, sedimentos, águas e em seres vivos de forma geral como componentes naturais. Porém, devido a uma vasta gama de atividades antropogênicas, muitos metais pesados representam um perigo para o meio ambiente, impactando negativamente a saúde humana e a qualidade dos ecossistemas (KHAN et al., 2011; ABIOYE, 2011). Exemplos de metais pesados incluem cobre, mercúrio, chumbo, cádmio, arsênico, zinco e muitos outros, sendo estes ecologicamente mais significativos. As fontes naturais destes metais são advindas principalmente ao intemperismo das rochas e atividades vulcânicas, fazendo com que os metais liberados fiquem suspensos na atmosférica e sejam

arrastados pelas massas de ar, chegando a água pela deposição e pela chuva (KHAN et al., 2011; AGARWAL, 2009; THAKUR, 2006).

Desde o início da revolução industrial, a redistribuição dos metais pesados está gradualmente apontando para o acúmulo em habitat terrestres e aquáticos. A preocupação pública principalmente nos países desenvolvidos sobre a descarte de metais pesados é intensa, pois são particularmente graves na sua ação, podendo ser de caráter sanitário, ecológico, social ou econômico. As fontes antropogênicas incluem indústrias, atividades de mineração, metalúrgica, fundição, refinação, deposição atmosférica, agricultura e descarte de resíduos (BROWN, 1999; HAKEEM et al., 2015; SHUKLA et al., 2011; THAKUR, 2006).

Efluentes industriais constituem uma significativa fonte de poluição metálica para hidrosfera. O movimento das águas da drenagem de zonas de mineração e fundição dispersa os metais pesados, pois expõe os minerais metálicos a processos reativos naturais de oxidação. Escoamento agrícola em conjunto com a erosão do solo constitui uma fonte potencial de metais pesados em organismos aquáticos. O uso do lodo de esgoto e águas residuais para a irrigação agravam este cenário, levando a maior solubilidade do metal e adsorção (AGARWAL, 2009; MARTIN et al., 2012; HAKEEM et al., 2015; HOODA et al., 2008).

A contaminação no solo é particularmente evidente, pois a um grande número de indústrias que descarregam seus resíduos sem nenhum tipo de tratamento preliminar, diretamente no solo que podem servir para a agricultura causando riscos devido à adição destes metais pesados na cadeia alimentar dos humanos e animais (APPEROTH et al., 2010; BALIK et al., 2002).

A mobilidade e disponibilidade dos metais pesados no solo é regulada por várias propriedades físico-químicas do solo, como a dissolução, precipitação, adsorção-dessorção, troca iônica, pH e teor de matéria orgânica. Em elevadas concentrações, afetam primeiramente características biológicas, provocando mudanças na quantidade de alguns microrganismos, alterando a diversidade de espécies. Em alguns casos, causa perda total da fertilidade do solo, refletindo na estrutura da microflora do solo. Não podendo ser eliminados completamente, acumulam-se em sedimentos marinhos e de solos, sendo os sedimentos e partículas em suspensão repositórios importantes para níveis pequenos de concentração de

metais, como o cobre, por exemplo (HAKEEM et al., 2015; KHAN et al., 2011; SINGH et al., 2009).

Alguns metais pesados estão entre os mais nocivos poluentes por causa da sua toxicidade aos seres humanos. Entram no corpo humano através de alimentos, água, ar ou adsorção pela pele e também por medicamentos. Estes elementos são geralmente metais de transição, como mercúrio e chumbo. Independente dos seus usos em produtos de consumo ou em processos industriais é inevitável certo nível de exposição humana. Os sintomas tóxicos destes metais incluem alteração na função neurológica, alterando na produção de neurotransmissores, deficiências cardiovasculares, influência nos sistemas endócrinos, imunológicos, gastrointestinal, reprodutivo e urinário. Crianças podem se expor a níveis elevados de metais pela atividade ocorrente de levar a mão à boca que entra em contato com o solo ou objetos que levem metais pesados em sua constituição (BHARTI, 2012; MANAHAN, 2010).

Neste contexto, existe um número limitado de metais pesados utilizados como biocidas, termo este que reflete na aplicação de cloretos de mercúrio/organomercuriais, prata e cobre que são por definição biocidas. Métodos foram desenvolvidos para o estudo do mecanismo de ação dos biocidas nas células, propondo que agentes antibacterianos são menos ativos em células Gram-negativas e em células Gram-positivas são mais suscetíveis, porém no início, estudos indicavam que as membranas citoplasmáticas de Gram-negativas e de Gram-positivas são igualmente suscetíveis a atividade dos biocidas. Sabemos, que dada a diferença na estruturação e fisiologia as células bacterianas não são igualmente sensíveis (DAS, 2014; MAILLARD & MOORE & PAYNE, 2004).

A não susceptibilidade para com certos biocidas, conhecida como resistência bacteriana, vem se desenvolvendo em muitas cobactérias e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como nas espécies de *Enterococcus* sp, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. e a família de *Enterobacteriaceae*. Esta resistência pode se dar por meio de plasmídeos codificados, cromossomicamente por meio de mutação ou ampliação dos genes endógenos associada a elementos de DNA como os transposons (MAILLARD & MOORE & PAYNE, 2004).

Neste cenário, a pressão que os metais pesados exercem nos microrganismos refletem nos mecanismos adquiridos por eles para remediar o seu potencial tóxico. A combinação de conhecimento ecológico, microbiológico e de engenharia genética diz respeito ao potencial de crescimento dos microrganismos em resposta a estes contaminantes ambientais (SHUKLA et al., 2013).

O exemplo mais significativo são os estudos a respeito da resistência ao mercúrio (Hg^{+2}) e ao cobre (Cu^{+2}) reportados por *Enterococcus* sp, *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas como *Achromobacter xylosoxidans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência determinada por genes mer e ao do cobre por genes tcrB que atuam para alcançar níveis toleráveis nas células microbianas (PRASAD et al., 2006; SIGEL & SIGEAL, 1997; ABIOYE, 2011; SHUKLA et al., 2013; HASMAN et al., 2006).

3.2.1 Mercúrio

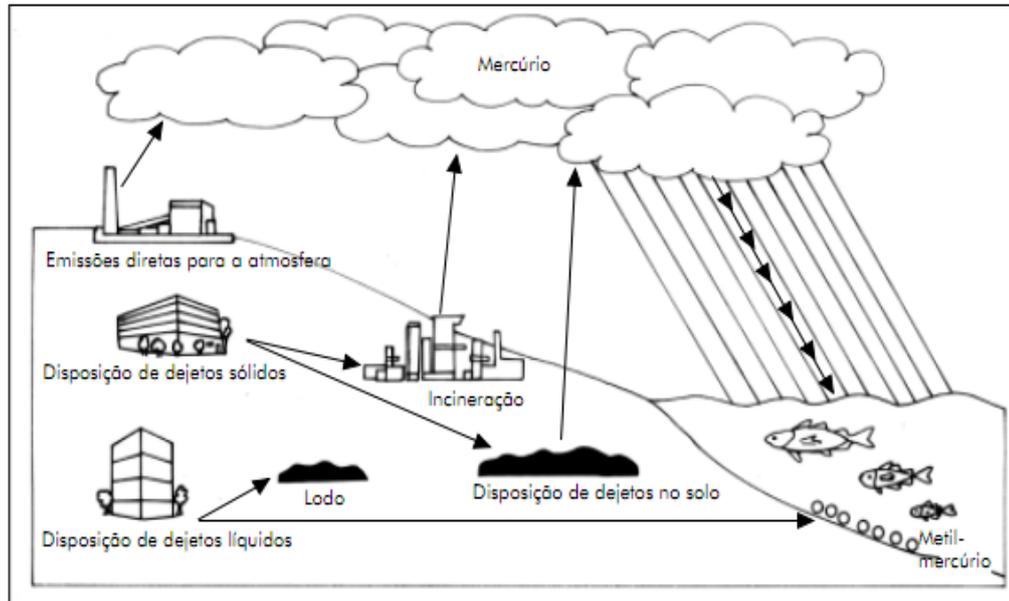
O mercúrio é um metal de transição pertencendo ao grupo 12 (II-B) da Tabela Periódica, representado pelo símbolo (Hg). Os seus efeitos tóxicos dependem de sua forma química, sendo a forma orgânica a mais tóxica e a forma elementar menos comum. A forma elementar ou metálico (Hg^0), inorgânicos, principalmente na forma de sais mercúricos e mercurosos e orgânico, ligado a radicais de carbono, como metilmercúrio e etilmercúrio. Vários processos naturais e microrganismos são capazes de converter o mercúrio inorgânico em compostos de mercúrio orgânico e compostos orgânicos em inorgânicos (HAKEEM et al., 2015; AZEVEDO & CHASIN, 2003).

O mercúrio é um dos mais perigosos poluentes que conhecemos devido a sua capacidade de ser transportados por longas distâncias na atmosfera poluindo ecossistemas e a sua toxicidade, sendo uma potente neurotoxina para humanos, não apresentando nenhuma função conhecida em bioquímica e fisiologia humana (KHAN et al., 2011; HAKEEM et al 2015).

No meio ambiente o ciclo global de Hg é principalmente resultado da queima de combustíveis fósseis, resíduos sólidos, fundição e mineração. Áreas de garimpo

têm sido tratadas como um grave problema ambiental. A deposição inadequada de lodo de esgoto, resíduos indústrias, resíduos domésticos entre outros, são consideradas fontes potenciais para a contaminação do meio ambiente (MARTIN et al., 2012; WEIL & BRADY, 2013; APPEROTH et al., 2010).

Figura 1: Distribuição do mercúrio no meio ambiente.



Fonte: AZEVEDO (2003).

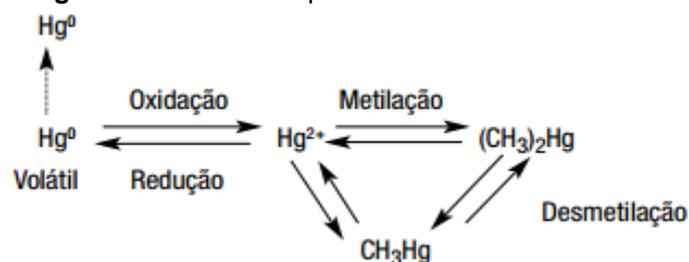
O mercúrio é traço de minerais e combustíveis fósseis, é advindo naturalmente de rochas continentais contendo 80 partes por bilhão deste elemento. Fóssil de carvão contém mercúrio, em níveis de 100 partes por bilhão aproximadamente, causando preocupação com o aumento do uso desses combustíveis fósseis como recurso energético (MANAHAN, 2008). O mercúrio atmosférico, na forma de vapor de mercúrio (Hg^0) é derivado da desgaseificação natural da crosta terrestre e de erupções vulcânicas, além da evaporação de oceanos e solos. O vapor de mercúrio (Hg^0) é mais perigoso do que sua forma líquida. O metal liga-se a outros elementos (tais como o cloro, o enxofre, ou o oxigênio) para formar sais inorgânicos mercuriosos Hg^+ ou mercúricos Hg^{+2} (SHAECHTER, 2009).

Apenas um terço de mercúrio é advindo de fontes naturais. As fontes antropogênicas que compreendem as emissões da mineração e fundição de metais, da combustão do carvão, dos incineradores municipais e das industriais contribuem para emissão anual de Hg entre 4354 e 7530 toneladas que liberaram altas quantidades de Hg metálico que estabelece ligas com outros metais como o ouro,

prata gerando os amalgamas (MOREAL et al., 1998; HARTE et al., 1991; HAKEEM et al., 2015; NANNIPIERI et al., 2002).

No processo industrial, há a conversão química, o mercúrio elementar é convertido em um estado ionizado que expõe o Hg^0 a um oxidante forte. No ar, água e nos sedimentos, o grande vilão é o mercúrio orgânico, mais comumente na forma de metilmercúrio $\text{CH}_3\text{Hg}^{+2}$, cerca de 100 vezes mais tóxico do que o Hg^0 ou Hg^{+2} . Estudos apontam outras formas de metilação de mercúrio, como no intestino, no muco e limo dos peixes, no intestino de ratos e humanos, nos lodos de esgoto, entre outros (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

Figura 2: Conversões químicas do mercúrio.



Fonte: MOREIRA (2006).

Os usos de Hg incluem na fabricação de baterias, catalisadores, termômetros, barômetros, termostado elétricos, bombas de difusão, lâmpadas elétricas e fluorescente, placas de propaganda, fotografias, interruptores, disjuntores de mercúrio e outros aparelhos eletrônicos, representando 56% que utilizam este metal pesado (QUINÁGLIA, 2012; AZEVEDO & CHASIN, 2003; MARTIN et al., 2012; HARTE et al., 1991).

Compostos de mercúrio orgânicos utilizados para ser amplamente aplicada como pesticidas em particular fungicidas. Outros usos de Hg incluem pesticidas, biocidas, tintas anti-incrustantes, na produção de cloro-álcali e de soda cáustica. E também está presente em efluentes em muitos laboratórios analíticos (MANAHAN, 2008; AZEVEDO & CHASIN, 2003).

No solo concentração de mercúrio esta entre 0.05-a.26 mg/kg. Solos desenvolvidos de rochas e atividades hidrotermal podem conter concentrações mais altas. Estima-se que 300-8800 toneladas de Hg por ano é inserido nos ecossistemas aquáticos. Fatores morfológicos e químicos tem influência na determinação da taxa

de adsorção e sedimentação do mercúrio. A quantidade de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo e enxofre de sedimento está relacionada com a forma com que encontraremos o mercúrio distribuído. Em pHs mais altos, a maior fração de mercúrio é adsorvida através do material mineral que são areia fina, silte e argila. A matéria fina presente em suspensão tem alto potencial para adsorver o mercúrio na forma solúvel (MARTIN et al., 2012; CHARLESWORTH et al., 2010; QUINÁGLIA, 2012).

O mercúrio solúvel se acumula mais intensamente em peixes e certas aves. O metilmercúrio que é solúvel em água e em gordura representa uma ameaça para os organismos aquáticos. As concentrações em tecidos de peixes podem ser mais elevadas do que os níveis de água ao redor, especialmente quando metilmercúrio está presente. No topo da cadeia alimentar, o mercúrio tecidual pode atingir níveis 1.800 a 80 mil vezes maiores do que níveis da água circundante. Essa biometilação e bioconcentração leva a exposição humana ao metilmercúrio por meio do consumo destes peixes. O metilmercúrio se insere na cadeia alimentar aquática iniciando com plâncton, depois com os peixes herbívoros, chegando aos peixes carnívoros e animais marinhos (NANNIPIERI et al., 2002; GREGUS et al., 2012).

Quanto ao perigo para saúde humana, os sais de mercúrio apresentam efeito acumulativo. Formas orgânicas são mais prejudiciais do que as inorgânicas, a razão disto é que as formas inorgânicas ligam firmemente aos vários componentes do solo, assim menos disponível para o ambiente. A natureza é hidrofóbica das formas orgânicas, contribuindo na toxicidade nos seres vivos, permitindo se acumular em organelos que são ligados a membrana, levando a inibição das vias importantes (HAKEEM et al., 2015).

O transporte deste metal no corpo humano é por meio de um mecanismo de competição dos compostos de metal com substratos endógenos para conseguir a entrada em diferentes células e tecidos, conhecido como mimetismo molecular levando a inativação. Formas inorgânicas de mercúrio leva a aborto espontâneo, malformações congênitas. O metilmercúrio é a forma em que a maioria das pessoas estão expostas, mais tóxica, há efeitos no sistema nervoso, particularmente no feto em crianças pequenas. O mercúrio inorgânico pode ser adsorvido por inalação de vapor ou aerossóis de sais de mercúrio, como também por via oral (tubo digestivo), pele ou mucosa. O vapor de mercúrio quando inalado causa perdas de memória,

tremores, instabilidade emocional, insônia e perda de apetite (HARTE et al., 1991; KHAN et al., 2011).

Nos microrganismos, a velocidade de absorção do metal pelas células é um dos fatores que se relaciona com a toxicidade. Há um número aparentemente restrito de sítios de ligação, o mercúrio liga-se a membranas celulares dos microrganismos. Assim, a densidade celular e as concentrações de mercúrio no substrato estão relacionadas aos efeitos. Esses efeitos tem a tendência a ser irreversíveis, portanto, mesmo em baixas concentrações, o Hg é um grave risco aos microrganismos (HOODA et al., 2008; SHUKLA et al., 2011).

Entretanto a toxicidade do mercúrio é remediada por meio da conversão por processos biológicos por microrganismos, transportado pela cadeia alimentar, ou abióticos, como pela reação com a metilcobalamina, com outros metilados $(\text{CH}_3)_4$, com grupos doadores de metila (ácido fúlvico e húmico) (QUINÁGLIA, 2012).

Os processos bióticos que consiste na redução de Hg^{+2} por bactérias que apresentam genes de resistência a elevadas concentrações do mercúrio iônico. Genes estes localizados em mer operons, que codificam enzimas capazes de reduzir sua forma iônica para sua forma elementar (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; RODRIGUEZ, 2005; EHRLICH & NEWMAN, 2009).

3.2.2 Cobre

O cobre é o elemento químico pertencente ao grupo 11 (I-B) da tabela periódica sendo representado por (Cu). Metal marrom avermelhado e nobre, apresenta quatro estados de oxidação: metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^+), íon cúprico (Cu^{+2}) e o menos encontrado o íon trivalente (Cu^{+3}) (QUINÁGLIA, 2012; AZEVEDO, 2003).

Desde muito tempo, o homem utiliza o cobre sob forma pura ou combinada com outros metais. Na natureza, está presente como sulfeto, arsenito, cloreto, carbonato e na sua forma elementar. Está em sedimentos e partículas em suspensão, ocorre naturalmente em rochas, no solo, água e ar. Sua concentração

na crosta terrestre é por volta de 60 mg/kg naturalmente, sendo por volta de 0,5 a 1000 mg/L em águas superficiais (QUINÁGLIA, 2012; APPEROTH et al., 2010; MANAHAN, 2010).

Em sistemas aquáticos, a biodisponibilidade do cobre é influenciada por vários processos que incluem a complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, como também a adsorção a óxidos metálicos, argila e material particulado em suspensão e na troca da água com o sedimento. Quando em sua forma catiônica, podem adentrar na cadeia alimentar humana e de outros animais ao serem absorvidos primariamente por plantas e microrganismos. A sua concentração solúvel na água depende do pH, do potencial redox da água, cátions competidores e de alguns ânions. Em ambientes com oxigênio em baixa, pode formar sulfeto de cobre (CuS_2) e acabar por se depositar nos sedimentos. Isso reflete na biodisponibilidade de cobre sendo influenciada pela presença dos íons sulfetos, comuns em águas salinas (HOODA et al., 2008; QUINÁGLIA, 2012;).

Atividades antrópicas incluem mineração, indústrias de geração de energia, linhas de transmissão, enrolamento de motores, equipamentos hidráulicos, nas formulações de pesticidas para agricultura, algicidas, fertilizantes, tintas, corantes entre outros (PRASAD et al., 2006; SINGH et al., 2009; AZEVEDO & CHASIN, 2003).

O cobre é necessário para várias reações enzimáticas, conhecido por ser um micronutriente essencial para a nutrição das plantas, necessário pra atividade das metaloenzimas, chave na fotossíntese e em transporte de elétrons. Para os humanos perfaz um oligoelemento da dieta, atua como auxiliar na síntese da hemoglobina (absorção de ferro) e no metabolismo do colágeno, entre outras inúmerAs funções. O recomendado na dieta humana é de 1,5-2,0 mg por dia. Nos alimentos se encontra na soja, castanhas, mexilhões, fígado, ostras, entre outros. Porém, em altas doses torna-se tóxico, pois não se decompõe biologicamente. (PRASAD et al., 2006; HAKEEM et al., 2015; QUINÁGLIA, 2012; MARTIN et al., 2012; ROANE & MILLER, 2005).

Em certas condições, o cobre acumula-se principalmente no fígado, particularmente em pessoas que sofrem de doença de Wilson's. Em excesso causa irritação no sistema nervoso central, distúrbios gastrointestinais, toxicidade hepática

e renal. Provoca também danos no DNA, lipídios e proteínas em humanos, animais e em plantas (MARTIN et al., 2012; HAKEEM et al., 2015).

Microrganismos desenvolveram mecanismos para manter um nível tolerável de cobre em suas células. A homeostase de cobre nesses microrganismos é por meio de proteínas que atravessam a membrana, que são codificadas por genes que estão no cromossomo. Estes genes estão no operon *cop* que possui quatro genes *copYZAB* que são os responsáveis pela tolerância do cobre intracelular. Este gene podem ser encontrados nos plamídeos e são capazes de transferência para outras espécies. Hasman et al (2006) foram os primeiros que propuseram a identificação do gene *tcrB*, resistente ao cobre isolado de Gram-positivas na espécie de *Enterococcus faecium* (LOZANO & FALCÓN, 1998; ROSEN et al., 1998).

3.3 BIORREMEDIAÇÃO

O meio ambiente sempre foi receptor de vários resíduos e substâncias químicas oriundos de processos de industrialização. Desta ação passaram a existir áreas contaminadas e inúmeros impactos negativos a saúde humana e ao meio ambiente. Os metais pesados devido ao seu potencial tóxico e de bioacumulação em águas residuais, solo e sedimento causa preocupação significativa, provocando danos às funções do ecossistema (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ABIOYE, 2011).

A biorremediação consiste num conjunto de tecnologias nas quais utilizam microrganismos, ou seus produtos e processos, aplicadas com o objetivo de recuperar ou remediar áreas contaminadas. Os microrganismos, especialmente bactérias desempenham um papel importante e vital na biorremediação destes meios contaminados por metais pesados, podendo interagir com eles por diversos mecanismos, constituindo a base para estratégias potenciais de biorremediação microbiana. Esta tendência favorável do uso de biotecnologias vê a bioremediação como tecnologia “verde”, como processos naturais no trabalho de purificar o meio perturbado, se opondo as técnicas de remediação não naturais, que empregam a intervenção do homem (ABIOYE, 2011; ATLAS, 2010; DIAS, 2000; HAKEEM et al., 2015).

Os desenvolvimentos recentes de engenharia genética começaram por desvendar os sistemas naturais de desintoxicação endógeno em micróbios, bem como, a expressão de genes que fazem a limpeza destes poluentes tóxicos (HAKEEM et al., 2015; KHAN et al., 2011).

Perante o problema de desequilíbrio de íons metálicos, os microrganismos utilizam dois tipos de sistemas de captações destes íons. Um deles é rápido, não específico acionado pelo gradiente quimio-osmótico pelas membranas citoplasmáticas de bactérias, acionado por vários substratos. O outro tipo de sistema apresenta alta especificidade de substrato, sendo mais lento, usando por vezes a hidrólise de ATP como fonte de energia, expresso apenas em uma situação metabólica especial. Os mecanismos para a resistência aos íons metálicos são relatados por barreiras de permeabilidade, sequestro intra e extracelular, bombas de efluxo ativo, redução enzimática e na sensibilidade de alvos celulares destes íons metálicos (HAKEEM et al., 2015; KHAN et al., 2011).

A aplicação de bactérias que apresentam mecanismos de resistência ao metal é particularmente vantajosa, lidando com cargas de metal desfavoráveis na natureza. Os sistemas de resistência têm evoluído podendo assumir diversas formas, tais como cromossômico, que pode também incluir a homeostase de íons metálico, transposons e genes de resistência organizados em operons encontrados normalmente em plasmídeos codificados que incluem precipitação extracelular e exclusão, ligação a superfície da célula e sequestro intracelular. A ligação de cátions metálicos na superfície externa das células das bactérias para a biorremediação de resíduos industriais e em outros ambientes poluídos por metais pesados, tornou-se um dos meios mais atraentes para biorremediação (BROWN et al., 2000; KHAN et al., 2011; HOODA et al., 2008).

A despoluição utilizando as bactérias na água, solo e resíduos é considerada um método seguro e menos dispendioso para a remoção de contaminantes perigosos. A exposição bacteriana de peptídeos e proteínas de ligação aos metais possuem o papel de catalisador primário na degradação ou mineralização dos contaminantes bem como, a conversão para não tóxicos durante a biorremediação destas áreas. A escolha do processo de biorremediação leva em conta fatores econômicos e ambientais, sendo os fatores ambientais que influenciaram no sucesso na atividade biológica de biorremediação compreendem a umidade,

temperatura, pH, oxigênio, tipo de solo, além da natureza química do contaminante para degradar aerobicamente e o potencial redox para degradar anaerobicamente, sendo utilizado o metal como aceitador terminal de elétrons para a respiração anaeróbica (SINGH et al., 2009; HAKEEM et al., 2015).

A solubilização de metais utilizando microrganismos é amplamente usada em processos industriais como bioxiliação de minérios ou biomineração, com o objetivo de extrair metais como o cobre, ouro, urânio entre outros, em condições extremamente ácidas (pH 1-3,0). Microrganismos têm sido relatados para excluir metais pesados de águas residuais e materiais residuais de indústrias pelo método de biossorção. Este método ainda não é completamente compreendido. Os mecanismos de biossorção podem ser passivos ou ativos, em outras palavras, independente do metabolismo e dependente do metabolismo das células, envolvendo mecanismos como acumulação/precipitação extracelular, adsorção/precipitação de superfície celular e acumulação intracelular. Este último envolve o transporte do metal através da membrana celular, associado a um sistema de defesa ativa do microrganismo (SHUKLA et al., 2011; NANNIPIERI et al., 2002; ABIOYE, 2011; SINGH et al., 2009).

Nas paredes celulares de biomassa microbiana, compostas principalmente por polissacarídeos, proteínas e lipídeos contém muitos grupos de ligação à metais, sendo relativamente rápida e podendo também ser reversível. O método passivo baseia-se na adsorção física, troca iônica e adsorção química, os íons dos metais preso na estrutura celular são adsorvidos para os sítios de ligação presentes na própria estrutura celular. Estes métodos têm baixo custo, eficiência significativa e minimização do logo biológico, com possibilidade de recuperação de metal SHUKLA et al., 2011).

A remoção de metais a partir de efluentes de esgotos tem como base fundamental a imobilização e complexação de metais por compostos extracelulares. Durante o processo de tratamento, os metais são removidos a partir da água residual por sedimentação. Outros mecanismos de remoção abrangem a captura física por flocos microbianos, acumulação celular e volatilização por tais organismos (ROANE & MILLER, 2005).

As bactérias são potenciais para a remoção dos metais pesados de locais contaminados, porém células vivas mostram maior sensibilidade às condições ambientais e de demanda por fontes nutricionais e energéticas. Muitos gêneros de micróbios como *Bacillus*, *Enterobacterias*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e algumas leveduras e bolores fazem o papel de biorremediar os metais. No entanto, é preciso saber quais genes, enzimas e metabolitos analisar em cultura para verificar se apresentam indicadores bioquímicos específicos a fim de usá-los na recuperação de dado meio. Concentrações altamente tóxicas tais como mercúrio e cobre, requer concentrações ativas de íons metálicos, permitindo beneficiar de tecnologias de DNA recombinante. Esta evolução foi descrita em organismos Gram-positivos em *Enterococcus* sp. (ABIOYE, 2011; BROWN et al., 2000; HASMAN et al., 2006).

3.3.1 Biorremediação do Mercúrio

O mercúrio causa problemas tóxicos afetando nosso planeta e não sendo um nutriente biológico de fato, as transformações microbianas de vários compostos de mercúrio auxiliam na redução da sua toxicidade de algumas de suas formas mais tóxicas com o objetivo de autoproteção, sendo o produto gerado desta redução o Hg^0 volátil e menos tóxico, evapora rapidamente através da superfície celular, garantindo a detoxificação do meio para o crescimento microbiano (EHRlich & NEWMAN, 2009; SIGEL & SIGEAL, 1997; KHAN et al., 2011; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

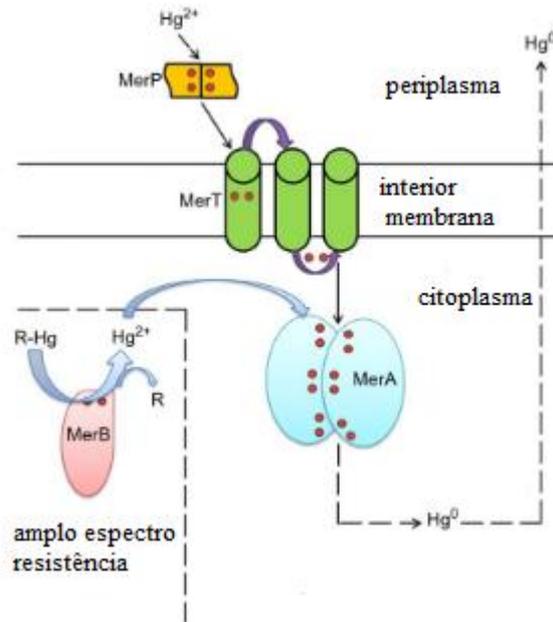
Em concentrações suficientemente elevadas, Hg^{+2} e CH_3Hg^+ , um grande número de bactérias Gram-positivas realizam a biotransformação das formas tóxicas de mercúrio em formas atóxicas. A redução se relaciona com operons de resistência nomeados como *mer* que pode estar localizados num plasmídeo, transposon, ou cromossomo bacteriano. Estes operons trata-se de um conjunto de genes de resistência ao mercúrio, genes que são funcionalmente diferenciadas em *merA* e *merB* para a redução, *merT* e *merP* como transportador, *merR* e *merD* de regulamentação, e a pouco tempo descobriu *merA* também para transporte de membrana. A expressão operon *mer* é controlada por produtos de *merR* e *merD*

(RODRIGUEZ, 2005; SIGEL & SIGEAL, 1997; EHRLICH & NEWMAN, 2009; PRASAD et al., 2006).

O gene *merR* é apontado com um regulador de metal bacteriano conferindo resistência a muitas bactérias na presença de mercúrio, o produto homodimérica de *merR* domina a expressão do operon na ausência de um indutor e já na presença de um indutor, ativa a transcrição. Trata-se, portanto, de um gene regulador de metal bacteriano conferindo resistência ao mercúrio para muita bactérias, quando na ausência de Hg^{+2} a *merR* funciona como um repressor e se liga à região do operador do operon *mer*, não permitindo a transcrição dos genes estruturais *merTPABD* (SIGEL & SIGEAL, 1997; EHRLICH & NEWMAN, 2009; DAS, 2014).

O gene *merP*, codifica uma proteína que elimina Hg^{+2} , transporta o mercúrio do periplasma para a membrana interna da célula e o gene *merT* codifica uma proteína de membrana envolvida no transporte do Hg^{+2} do periplasma para o citoplasma onde a reação ocorre. O gene *merB* é capaz de catalisar a decomposição de várias formas de mercúrio orgânico de Hg^{+2} , codifica uma enzima, liase organomercúrico, que catalisa a protonólise da ligação carbono-mercúrio. Em outras palavras, é responsável por simplesmente clivagem de C-HG para libertar Hg^{+2} para o citoplasma, que é tomado mais cuidado pela proteína codificada pelo *merA* para formar Hg^0 . Um dos produtos de reação é o mercúrio iônico (EHRLICH & NEWMAN, 2009; SIGEL & SIGEAL, 1997; DAS, 2014).

O gene *merA* que é o foco deste trabalho, codifica a enzima redutase de mercúrio *merA*, que é responsável por Hg^{+2} reduzir para Hg^0 . O gene *merA* é a proteína central para a esta redução que é codificada pela *mer*. A redução envolve um flavina citosólica dissulfureto oxidoreductase NADPH. A enzima é dependente da energia em forma de NADPH e é encontrada no citoplasma, portanto o mercúrio redutase requer para a conversão enzimática FAD solúvel e um dissulfureto redutível no seu sítio ativo para catalisar a redução de dois elétrons do Hg^{+2} por NADPH. E difere o *merA* de outros membros da família através da adição de um N-terminal de *merP* como sequência que contém um HMA local de ligação e um C-terminal contendo dois resíduos de cisteína (SIGEL & SIGEAL, 1997; PRASAD et al., 2006; SHAECHTER, 2009).

Figura 3: Mecanismo de resistência ao mercúrio

Fonte: DAS (2014), adaptado.

Por mais que o complemento exato de genes/proteínas varia nesse *mer*, a sua expressão é sempre regulada por um Hg⁺² sensor regulador de transcrição situada no citoplasma, e todos eles usam uma proteína de membrana integral, exemplo o *merT*, *merP*, para facilitar a absorção de Hg⁺² no citoplasma onde *merA* adquire e reduz o mercúrio elemental Hg⁰ (Figura 3). (RODRIGUEZ, 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A redução que envolve um NADPH é ativo quando na presença de excesso de tióis fornecidos exogenamente (RSH). Os tióis reagem com o Hg⁺² para formar um complexo de tiol (RS-HG-SR). Em laboratório os tióis podem ser mercaptoetanol, ditioneitol, glutatona ou cisteína. Os tióis garantem o estado reduzido de mercúrio redutase e a formação de Hg⁰. Em certas reações, o dimercaprol derivado de Hg⁺² pode ser substituído por um monomercaprol ou um derivado de etilenodiamina (EDTA). O NADPH pode ser trocado por NADH por meio de preparações de enzima a partir de alguns organismos, mas a preparação é então menos ativa, sendo a cinética para a purificação da enzima é bifásica. Embora a reação ocorra sob condições redutoras, ela é realizada por muitos microrganismos obrigatoriamente aeróbios e facultativos (EHRlich & NEWMAN, 2009; RONNEAU & BITCHAEVA, 1997).

O raio-x da estrutura cristalina da proteína *merA* de *Bacillus* apresenta uma visão excelente sobre como ocorre a redução de Hg^{+2} . A estrutura mostra que só duas cisteínas CYS201 e CYS628 estão participando na formação do local da ligação Hg e que duas hidroxilas a partir de TYR264 e TYR628 contribuem também para a ligação (SIGEL & SIGEAL,1997).

Em bactérias Gram-positivas, estudos relataram que o mecanismo de tolerância é baseado na ligação extracelular de Hg por compostos de polímeros de polissacarídeos, que na presença de Hg^{+2} não foram decompostos por enzimas líticas extracelular. A bactéria *Staphylococcus aureus* é um exemplo disto. Inicialmente, numa concentração de 2 ug / mL de $HgCl_2$, todas as estirpes foram sensíveis nesta concentração inibitória mínima. Depois disso, as cepas se adaptaram há concentrações de até 20 ug / mL de $HgCl_2$. A perda total de enzimas degradantes, ou seja, as reações enzimas se associou com a tolerância de Hg, tais enzimas como lípases, fosfolípases e a diminuição da produção de α -hemolisina, β -hemolisina e proteína A (SIGEL & SIGEAL,1997; HOODA et al.,2008).

3.3.2 Biorremediação do Cobre

Nas bactérias, o cobre possui um papel duplo, pois é essencial em concentrações baixas e em concentrações elevadas se torna tóxico. A toxicidade ao cobre é baseada na produção de radicais hidroperóxidos e na interação com a membrana celular. Para resolver o problema da toxicidade, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência ao cobre, tanto no cromossomo como no plasmídeo contendo genes de resistências a concentrações elevadas deste metal pesado, mantendo níveis de cobre intracelular que não interfiram na sua homeostase, portanto, não causando danos celulares (PRASAD et al. 2006; LOZANO & FALCÓN, 1998).

A resistência bacteriana adquirida frente ao cobre de Gram-positivas, sendo nos *E. hirae* o sistema de melhor compreensão, possuindo uma via metabólica simples, similar a dos mamíferos, utilizando chaperonas de cobre para transferir e inserir cobre em enzimas. O sistema dos *E. hirae* trata-se de um mecanismo

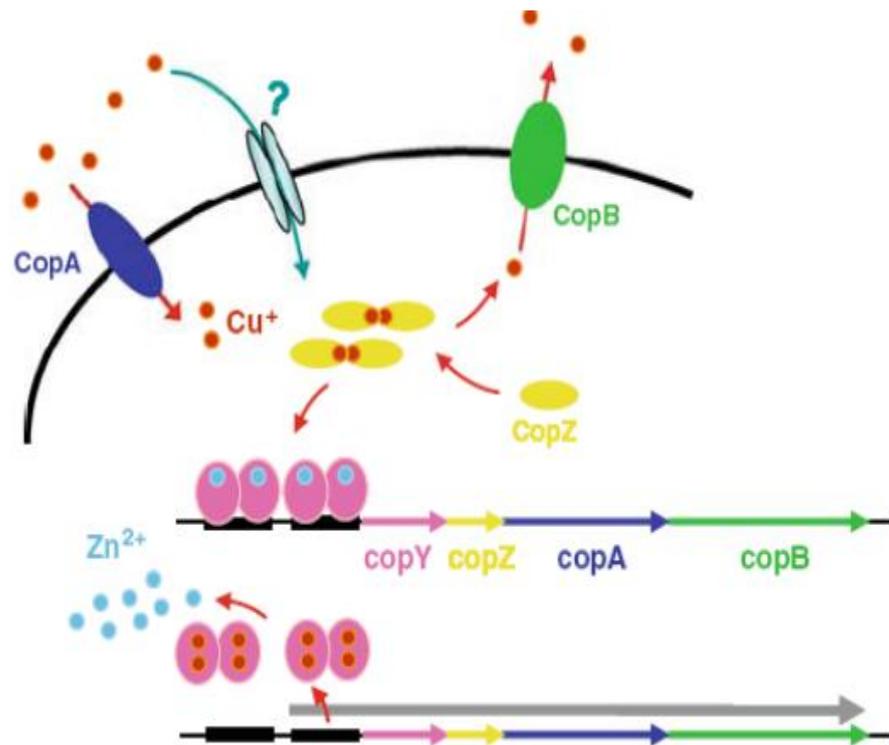
homeostático para o cobre codificado no cromossomo desta bactéria. Os produtos do gene homeostase são traduzidos a partir do *cop* operon que codifica *copZ*, *copY*, *copA* e *copB* (PRASAD et al., 2006; KHAN et al., 2011; ROSEN, et al 1998).

Este operon, é dependente da atividade de dois ATPases do tipo P (*copA* e *copB*) que se encontram na membrana celular, responsável pela regulação gênica por meio de bombas de importação e exportação, expresso em função da concentração de Cu^{+2} na célula. O *copA* faz a captação/absorção de cobre quando este é necessário, enquanto *copB* é responsável pelo efluxo de cobre e desintoxicação, expulsando o excesso de cobre do citoplasma. O *copZ* entrega o Cu^+ para o *copY* repressor fazendo-o perder a sua atividade no DNA, promovendo a transcrição do operon (LOZANO & FALCÓN,1998; ROSEN et al.,1998; KHAN et al., 2011).

No periplasma o gene *copZ* é responsável pelo tráfego de Cu^{+2} . Assim, *copZ* liga-se ao cobre em excesso, transferindo-o a *copB* para exclusão do metal, e também ao repressor *copY*, que induzirá o operon *cop*. Mutações no *copY* fará com que haja expressão constitutiva do *cop* operon, sugerindo que a cópia é um repressor (LOZANO & FALCÓN,1998; ROSEN et al.,1998).

Em concentrações normais de cobre, o gene *copY* encontra-se ligado ao íon Zn^{+2} . Mas, com a elevação das concentrações de cobre, um íon de Zn^{+2} é suprido por dois íons de Cu^+ e sendo liberado pelo promotor que induz o operon. (SOLIOZ et al, 2010).

Figura 4: Homeostase do cobre em bactéria *E. hirae*.



Fonte: SOLIOZ et al, (2010)

Observando a Figura 4, a interrupção do gene *copY* produz uma superexpressão do *copA* e *copB*, originando um fenótipo dependente de cobre, por esta razão, o *copY* atua como um repressor que induz o operon *cop*. Na interrupção de *copZ* suprime a expressão dos ATPases formando células sensíveis a cobre, já que *copZ* é um ativador do operon *cop*. Ambas mutações podem ser completadas em trans com plasmídeos que possuam *copY* ou *copZ*. Sendo assim, *copY* e *copZ* codificam para proteínas metaloreguladoras que são requeridas para a indução por cobre do operon *cop*. A expressão dos quatro genes será regulada pela concentração extracelular do cobre (LOZANO & FALCÓN,1998; ROSEN et al., 1998).

A resistência ao cobre em *E. faecium* e *E. faecalis* é adquirida por meio do gene *tcrB* (*transferable copper resistance gene B*) que está alocado em plasmídeos de cepas isoladas de animais como suínos, frangos, vitelos e nos seres humanos. Estudos demonstram que este gene está entre os quatro genes do operon conhecido como operon *tcrYAZB*, que se assemelha ao operon descrito anteriormente em *E. hirae* e a resistência em *E. faecium* empregando experimentos *in vitro* ocorre mesmo que em altas concentrações de cobre. Enquanto que bactérias sem o gene *tcrB*, não toleram concentrações mínimas do metal,

demonstrando que concentrações elevadas de cobre pode levar a seleção de bactérias resistentes a este. Outro ponto foi à transferência do plasmídeo conjugativo para outras espécies, adquirindo estas, a resistência ao metal pesado (ROSEN et al., 1998; LOZANO & FALCÓN, 1998; HASMAN & AARESTRUP, 2002).

Hasman et al (2006) demonstraram em seus estudos *in vitro* que na presença de alta concentração de sulfato de cobre (até 28mM) bactérias que possuem o operon *tcrYAZB* são capazes de proliferarem. Já as bactérias onde o gene estava ausente, estas toleraram concentrações menores de cobre (valores até 8mM). Entretanto, fatores como pH, especificação de Cu^+ versus Cu^{+2} , adsorção e a complexa formação com o material orgânico causará influencia sobre a concentração de cobre livre (reativo). As espécies *E. gallinarum* e *E. mundtii* também apresentaram o gene de resistência *tcrB*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais, as metodologias e a seção de resultados do perfil fenotípico que serão apresentadas a seguir foram apenas para o metal pesado cobre. O metal mercúrio devido a sua elevadíssima toxicidade, optou-se apenas pela realização somente da técnica PCR, junto com o cobre para a obtenção do perfil genotípico dos isolados. Para se alcançar os objetivos propostos neste estudo, inicia-se com a apresentação dos procedimentos de isolamento, cultivo, concentrações do metal pesado, suscetibilidade no método placa gradiente, método de microdiluição em agar; crescimento em placas de microtitulação, constituindo o perfil fenotípico na presença do metal cobre e em seguida detecção dos genes *tcxB* e *merA*, constituindo o perfil genotípico dos *Enterococcus* sp.

4.1 AMOSTRAGEM

No presente estudo foram utilizados como material biológico 72 isolados de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de água, solo e sedimento, depositados na bacterioteca da prof^a Dra Luciana Furlaneto-Maia (UTFPR – Câmpus Londrina). Os isolados estão acondicionados a -20°C em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 20% de glicerol.

4.2 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular foi realizado transferindo uma alíquota (30 µL) do estoque para tubos de ensaio contendo 3 mL de Mueller Hinton (MH-HIMEDIA) caldo. Os tubos foram incubados a 37°C, a 120 rotações por minuto (RPM) por 18 horas. Após a incubação foi realizado o ajuste da concentração celular, em solução salina 0,85%, correspondente à concentração 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL).

4.3 CONCENTRAÇÕES DE METAIS

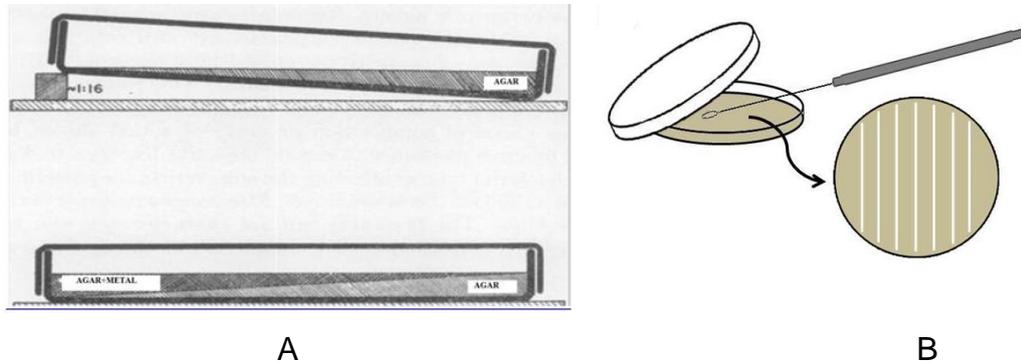
Todos os isolados identificados como *Enterococcus* sp. foram submetidos à variadas concentrações de cobre, para verificar a suscetibilidade e neste experimento essas concentrações tiveram como padrão ou medida as concentrações permitidas pela Resolução 357/2005 do CONAMA que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. A concentração máxima aceitável de cobre é de 0,009 mg/L. Este valor máximo foi empregado no método placa gradiente. Já no método de crescimento em placas de macrodiluição em agar foi utilizado o dobro do valor máximo permitido (0,018 mg/L), a própria concentração máxima (0,009 mg/L) e também a metade da máxima (0,0045 mg/L).

4.3.1 SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS NO MÉTODO PLACA GRADIENTE

Para o estabelecimento do perfil de suscetibilidade dos isolados na presença do metal pesado foi realizado o método de placa gradiente conforme estabelecido por SZYBALSKI (1952) com adaptações. Com a placa levemente inclinada é despejado uma camada de aproximadamente 10 mL de MH agar sem metal, posteriormente, com o meio nutritivo já endurecido, despejou-se outros 10 mL com a placa posta sem inclinação com uma concentração de 0,009 mg/L de Cobre (Cu) (Figura 5-A).

As colônias foram semeadas com o auxílio de uma alça em linha reta paralela ao eixo do gradiente de concentração do metal, a partir da região do lado mais concentrado de metal para o lado menos concentrado (Figura 5-B).

Figura 5: (A) Placa com o meio nutritivo sem metal, levemente inclinada (1ª figura); placa com o meio nutritivo e mais uma concentração de metal (2ª figura); (B) esquema do inóculo realizado no eixo do gradiente da placa.



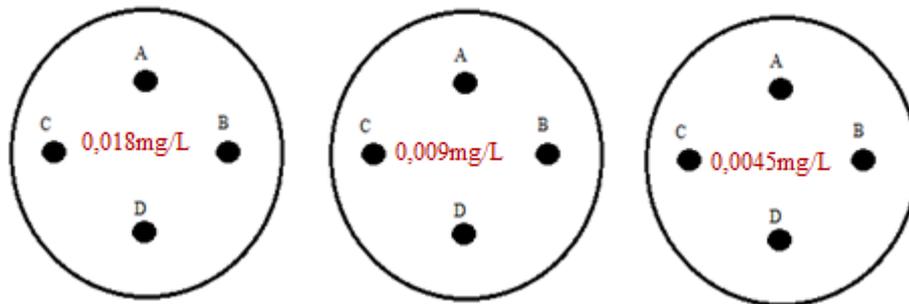
Fonte: SZYBALSKI (1952), adaptado; OGAKI et al (2015).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os resultados observados foram às variações do crescimento celular em toda a extensão da placa bem como a homogeneidade do inóculo. Os isolados que não apresentaram crescimento homogêneo, com menor desenvolvimento ou ausência de crescimento na região da placa com maior concentração de metal indica suscetibilidade a este metal pesado. Aqueles isolados que apresentaram crescimento homogêneo independente da concentração foram classificados como tolerantes ou não suscetíveis.

4.3.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM AGAR

Para a avaliação da suscetibilidade dos isolados que deram resistentes no método placa gradiente, foi empregado o método de microdiluição em agar frente a 3 concentrações distintas abordadas na introdução desta seção, conforme estabelecido pelo CLSI (2011) com adaptações. Alíquotas de 10 µL dos isolados com concentração celular ajustada para $1,5 \times 10^8$ células/mL foram depositadas de forma pontual com o auxílio de uma micropipeta na superfície de MH agar suplementado com as diferentes concentrações de cobre, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6: Representação da técnica microdiluição em ágar. Sendo os pontos A,B,C e D isolados de *Enterococcus* sp nas três diferentes concentrações de metal cobre.



Fonte: Autoria própria.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, o crescimento celular dos isolados foi avaliado nas diferentes concentrações do metal cobre. Não havendo crescimento celular, foi classificado como suscetível e havendo crescimento celular foi classificado como tolerante.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizado para todos os isolados de *Enterococcus* sp que se mostraram resistentes nos métodos fenotípicos. O DNA foi isolado pelo método da fervura (MARQUES e Suzart, 2004). Para tanto, as bactérias foram cultivadas em meio LB, incubadas a 37°C sob agitação constante (180 rpm) por 18 horas. Após este período, as bactérias foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm, no qual o sedimento foi ressuspendido em 300 µL água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi submetida ao aquecimento a 100°C por 30 minutos. Em seguida foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições descritas acima, e por fim 150 µL do sobrenadante contendo DNA foi retirado e armazenado em freezer a -20°C.

4.5 GENES *tcrB* e *merA* EM *ENTEROCOCCUS* SP.

Para a detecção da presença dos genes *tcrB* e *merA* que codifica a expressão de cobre e mercúrio em *Enterococcus* sp. foi realizada a técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). A PCR foi realizada num volume final de 20 µL por tubo contendo 10 ng de DNA, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA), 10X Tampão da Taq, 2,5 mM MgCl₂, 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador específico. As condições para a amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos (HASMAN et al.,2006; OJO et al.,2004). Como controle negativo foi utilizado todos os reagentes sem a amostra de DNA. A eletroforese dos produtos da PCR foram feitas em gel de agarose (EasyPath) a 1,0%, corados em brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de DNA Ladder de 1Kb plus (Invitrogen).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores empregados para a detecção por meio de PCR do gene de resistência *tcrB* e *merA*

	Sequência nucleotídica (5'-3') ^a	Primers	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>TcrB</i>	5' – CATCACGGTAGCTTT AAG GAG ATT TTC-3'	824	663 <i>E.faecium</i>	Hasman et al., 2006
	5' – ATA GAG GAC GCC GCC ACC ATT G – 3'	825	1081 <i>E.faecalis</i>	
<i>MerA</i>	5' – ATG ACT CAA AAT TCA TAT AAA ATA – 3' 5' – TTA GCC TGC ACA ACA AGA TAA – 3'	MRAF MRAR	1644	Ojo et al., 2004

4.6 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA AO NÍVEL DE GÊNERO E ESPÉCIES

Todos os isolados de *Enterococcus* sp. resistentes a cobre foram identificados no gênero e espécies, realizando o procedimento da PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores para *Enterococcus* sp.

	Sequência nucleotídica (5'-3') ^a	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	56	112	a
<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	56	822	a
<i>vanC-2</i>	CTCCTACGATTATCTTG CGAGCAAGCCCTTTAAG	56	439	a
<i>ddlE. faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	56	941	a
<i>ddlE. faecium</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGCTACAATC	56	550	a
<i>AV1,AV2</i>	GCTGCGATTGAAAAATATCCG AAGCCAATGATCGGTGTTTT	55	368	b
<i>murG</i>	GGC ATA TTT ATC CAG CAC TAG CTC TGG ATC AAG TCC ATA AGT GG	52	186	c
<i>mundtii</i>	AGG TTT CTT GCC TTC CAT CAA T CAG ACA TGG ATG CTA TTC CAT CT	52	301	c

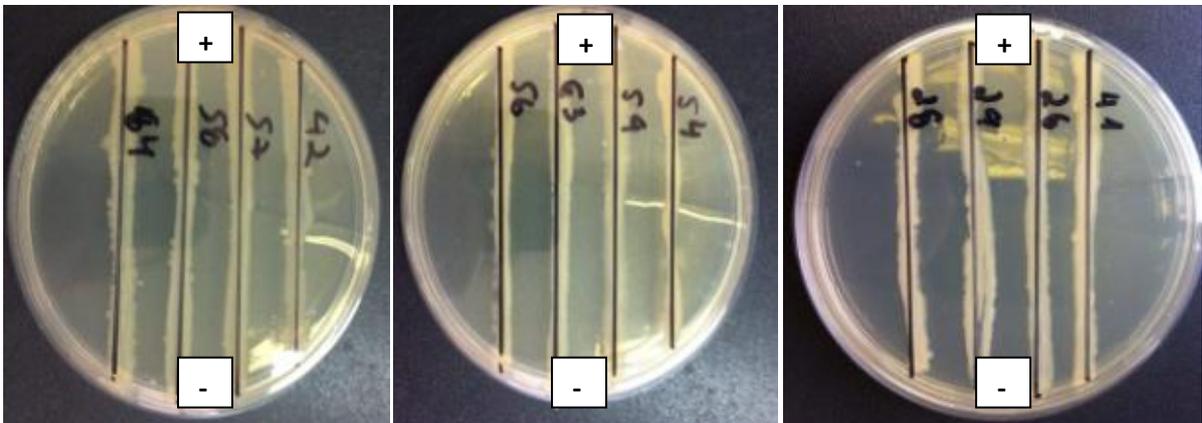
Tabela 2: Ta(°C)= temperatura de anelamento; *tuf*: *Enterococcus* sp.; vanC-1:*E. gallinarum*; vanC-2: *E. casseliflavus*; AV1, AV2: *E. avium*; *murG*: *E. hirae*; *mundtii*: *E. mundtii*.(a) DUTKA-MALEN et al., (1995); (b) SILVA et al., (2012); (c) HARIM et al., (2003).

5. RESULTADOS

5.1 PERFIS DE SUSCETIBILIDADE

Neste estudo foram testados 72 isolados de *Enterococcus* sp., provenientes de ambiente. Destes, foi obtido que 100% dos isolados apresentaram resistência ao metal cobre na técnica da placa ágar gradiente. A Figura 7 apresenta diferentes isolados se desenvolvendo em toda extensão da linha inoculada, indicando que crescimento tanto na maior quanto na menor concentração de cobre.

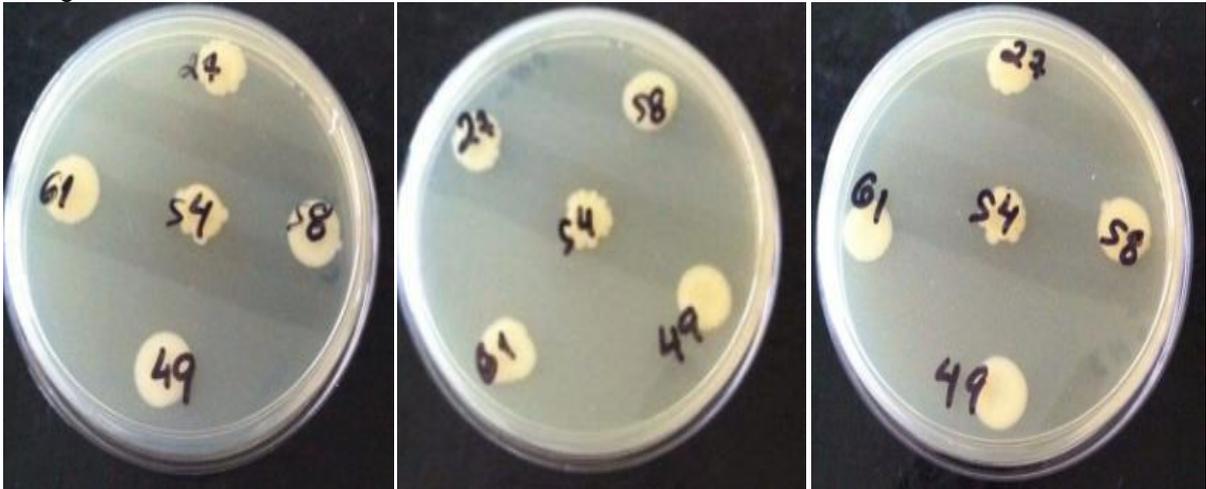
Figura 7: Crescimento homogêneo dos isolados de *Enterococcus* sp. em placa contendo cobre; método placa gradiente; (+) local mais concentrado do metal; (-) local menos concentrado do metal.



. Fonte: Autoria própria.

Quando os isolados foram submetidos a determinação da suscetibilidade na técnica microdiluição em agar, 100% (n=72) apresentam crescimento homogêneo. Nas três diferentes concentrações usadas neste estudo, os isolados de *Enterococcus* sp. não apresentaram variações, sendo, portanto resistentes ou tolerantes à todas elas (Figura 8) inclusive ao dobro da concentração permitida pela legislação.

Figura 8: Isolados de *Enterococcus* sp. apresentando resistência na placa com a maior concentração de metal, intermediária concentração e menor concentração de metal cobre da técnica microdiluição em agar.

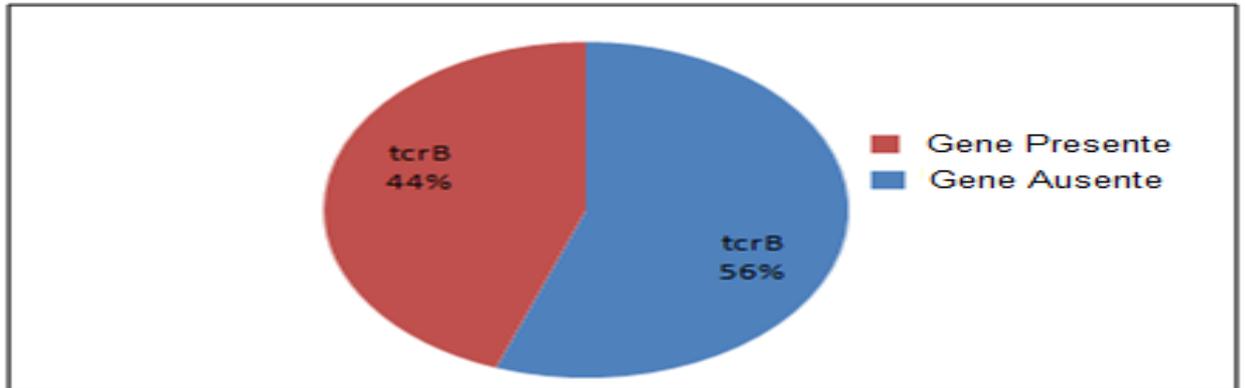


Fonte: Autoria própria.

5.2 DETECÇÃO DOS GENES *merA* E *tcrB* QUE CONFEREM RESISTÊNCIA MERCURIO E COBRE

Após o estabelecimento do perfil fenotípico foi realizada a genotipagem a fim de avaliar a presença dos genes *tcrB* e *merA*. Nas várias espécies de *Enterococcus* sp. testadas foi identificado o gene *tcrB* em 44% (n= 72) dos isolados que representa 32 de 72 isolados (Figura 9). Observamos que nem todos os isolados que apresentaram resistência ao cobre possuíam o gene de degradação deste metal. Isso é explicado pelo fato de muitas bactérias utilizam a maquinaria de resistência a antimicrobianos para serem também resistentes a metais pesados.

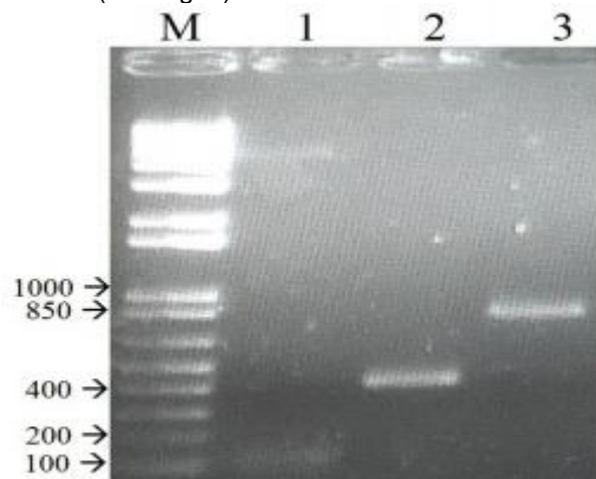
Figura 9: Gráfico que demonstra a porcentagem da presença do gene *tcrB* detectado pela técnica PCR.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 10 mostra a confirmação do gênero e a identificação das espécies para os 72 isolados utilizando a técnica PCR.

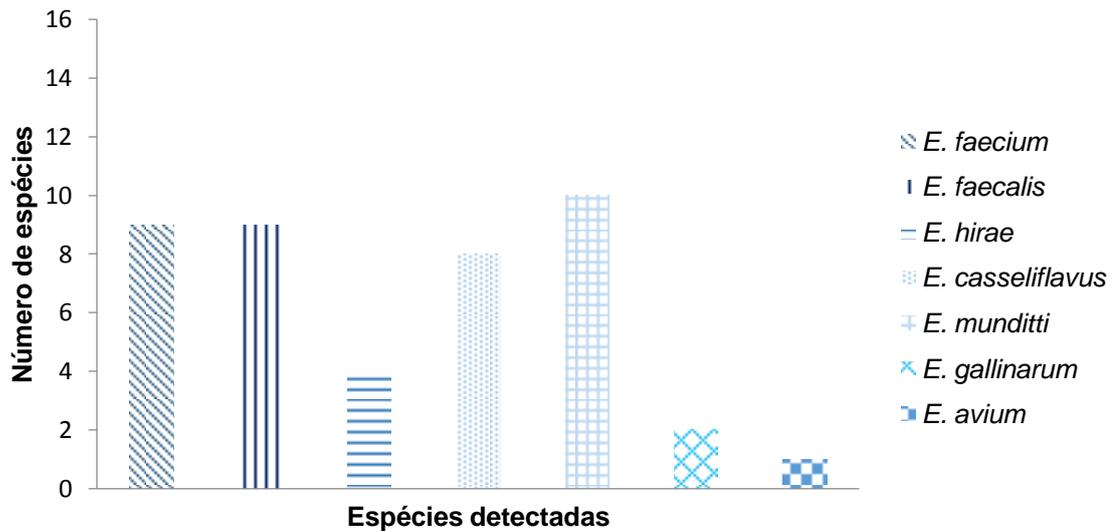
Figura 10: Gel de agarose demonstrativo da amplificação de PCR. Canaleta 1 *Enterococcus* sp. (112pb), 2 *E. casseliflavus* (439 pb) e 3 *E. gallinarum* (822 pb). M Ladder 1 Kb PLUS (Invitrogen).



Fonte: Autoria própria.

O gene *tcrB* estava distribuído em 9 isolados (12,5%) de *E. faecium*, 9 isolados (12,5%) de *E. faecalis*, 4 isolados (5,6%) de *E. hirae*, 8 isolados (11,1%) de *E. casseliflavus*, 10 isolados (13,9%) de *E. munditii*, 2 isolados (2,8%) de *E. gallinarum* e em 1 isolado (1,4%) de *E. avium* (Figura 11).

Figura 11: Gráfico de espécies encontradas possuindo o gene *tcrB*.



Fonte: Autoria Própria.

O gene *merA* não foi detectado em nenhum isolado analisado. SECO (2010) e SILVEIRA (2013) também detectaram a presença do gene *tcrB* em isolados de *Enterococcus* sp, e poucos ou até mesmo nenhum isolado obteve a presença do gene *merA*, corroborando com estudos apresentados.

Observa-se que todos os isolados resistentes de *Enterococcus* sp. descobertos nas metodologias fenotípicas possuem o gene de resistência com potencial biorremediador. Porém, quando se trata da detecção do gene *merA*, não foi observado sua presença e este fato não significa necessariamente que caso feito o perfil fenotípico com o mercúrio, os *Enterococcus* sp. não cresceriam de forma homogênea nas metodologias propostas aqui. Sendo assim, é possível que os *Enterococcus* sp cresçam no meio com metal pesado sem dificuldades mesmo sem o gene estar presente. Isso se deve a diversas causas, uma delas pode se justificar pela presença de outros genes, outros determinantes genéticos que conferem a resistência necessária para a reprodução destas bactérias.

Alguns autores como Hasman; Aarestrup (2005); Hasman (2006) em análises de *Enterococcus* sp. de suínos apresentaram o gene *tcrB* em 46% a 79% dos isolados, e este dado tem justificativa provável que no meio existia alta concentração de cobre. Estudos como da SILVA (2011) de isolados de lodo de esgoto apresentaram 41,8% resistentes ao cobre. A transferência de genes e fenômenos de recombinação genética contribui para a evolução adaptativa a

diferentes desafios ambientais e a manutenção da resistência aos metais (SILVEIRA, 2013).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo visou a investigação da resistência de isolados de *Enterococcus* sp. a íon cobre, usando isolados representativos de diferentes comunidades ecológicas, alcançando os objetivos com os seguintes resultados: 100% dos isolados mostraram-se resistentes a todas as concentrações de metal aplicadas nos métodos fenotípicos. O gene *tcrB* foi detectado em 44% e o gene *merA* não foi detectado. A espécie que teve o gene *tcrB* mais encontrada foi *E. munditii* representando 13,9%.

Com a continuidade dos estudos, estes isolados podem apresentar uma potencial capacidade de biorremediação. É recomendado avaliar a redução da toxicidade do metal pesado em determinado meio, pois o desenvolvimento contínuo das informações geradas aqui neste estudo, contribuirá para com o meio acadêmico, norteando estudos mais específicos do impacto dos metais pesados na evolução, patogenicidade e biorremediação dos *Enterococcus* sp. obtendo assim conhecimento de total relevância e interesse em encontrar maneiras que possibilitem a descontaminação, sendo no uso de bactérias como ferramenta sustentável na recuperação dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS

ABIOYE, O. PETER. **Biological remediation of hydrocarbon and heavy metals contaminated soil** . Institute of Biological Sciences, University of Malaya, Kuala Lumpur Malaysia, September, p.234-240, 2011.

AGARWAL, S.K. **Heavy Metal Pollution**. S.B. Nangia. A.P.H. Publishing Corporation, New delhi. p, 277-282, 2009.

APPEROTH, K. J, et al. **Soil biology: Soil Heavy Metals**. Springer. New York. p. 19-263, 2010.

ATLAS, RONALD M. **Polar microbiology: the ecology, Biodiversity and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments**. CRC Press. p. 373-386, 2010.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. São Paulo. Atheneu.p. 24-29, 2003.

BALIK, J, et al. **Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils Earth and environmental sciences**. Springer v. 68, p. 90-340, 2002.

BHARTI, P. k. **Heavy Metals Environment. Centre for Agro-Rural Technologies (CART)**. 1 ed. Publisher: Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG, Saarbrucken, Germany. p. 114, 2012.

BHATIA, R.; ICHHPUJANI. R.L. **Essentials of medical microbiology**. 4 ed. India. p. 356-360, 2008.

BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2016.

BROWN, M.J. **Biotechnology, the since and the business: Metal Recovery and Processing**. Shol of biological sciences, University of London, UK. 1999.

BROWN. JAMES. R. et al. **Applied microbial systematic**. Springer. p. 99-102, 2000.

CENTENO, J. A ET AL. **Metals ions in biology and medicine**. 5 ed. John Libbey Eurotext. Montrouge, France. v. 6, p. 511-693, 1998.

CHARLESWORTH, S, et al. **Sedimentology of Aqueous Systems**. Wiley Blackwell. Oxford, USA. p. 174-180, 2010.

CHEN, A. Y; ZERVOS. M.J. **Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects**. Humana Press. v.2, p. 715-730, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-First Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S21, 2011.

DAS, SURAJIT. **Microbial biodegradation and bioremediation**. National Institute of Technology. Elsevier. 1ed. Rourkela Odisha, India, p. 141-159, 2014.

DIAS, A.E.X.O. **Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**. In: SISINNO,C.L.S.; OLIVEIRA, R.M.(Org) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, p. 33-40, 2000.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. **Detection of glycopeptides resistance genotype and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PRC**. Journal of Clinical of Microbiology, v. 33, p.24-27, 1995.

EHRlich, H. L; NEWMAN. D. k. **Geomicrobiology**. 5 ed. CRS press,p. 250-273, 2009.

ENGELKIRK, P. G; ENGELKIRK. J. D. **Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology**. Texas. p. 232-235, 2008.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet**. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 47, p. 590-592, 1997.

GREGUS, Z. et al. **Fundamentos em toxicologia: Casarett e Doull** . 2 ed. Artmed. p. 55-59, 2012.

HAKHEEM, K et al. **Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges**. Elsevier, p. 2-90, 2015.

HAKHEEM, K. R ET AL. **Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges**. Elsevier. p. 87-88, 2015.

HARTE, J, et al. **Toxics A to Z: A Guide to Everyday Pollution Hazards**. University of California press, Los Angeles, Oxford. p. 102-105, 1991.

HASMAN, H and AARESTRUP F.M. ***tcrB*, a Gene Conferring Transferable Copper Resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, Transferability, and Linkage to Macrolide and Glycopeptide Resistance**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n. 5, p.1410–1416, 2002.

HASMAN, H., KEMPF, I., CHIDAINE, B., CARIOLET, R., ERSBOLL, A.K., HOUE, H., HASEN, H.C., AARESTRUP, F.M. **Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate.** Applied and environmental microbiology, p. 5784-5789, 2006.

HOODA, P.S. et al. **Chemical bioavailability in terrestrial environments.** Developments in soil science. 1ed. Elsevier, v. 32. p. 169-657, 2008.

KHAN, M. S, et al. **Biomanagement of metal contaminated soils.** Environmental pollution 20. Springer, p.1-95, 2011.

LEBLANC, D. J. The **Prokaryotes, bacteria: firmicutes, cyanobacteria: Enterococcus.** Springer. 3 ed. v. 4. p. 175-200, 2006.

LOUIS, M. S et al. **Heavy Metal Resistant Actinomycetes.** October 2005. Disponivel em: <<https://www.researchgate.net/publication/236269646>>. Acesso em: 23/03/2016.

LOZANO, E.F.E.S; FALCÓN, A. M. **Intoxicacion por Enterotoxina de Staphylococcus Aureus.** Revista latino Americana de microbiologia: organo de la asociacion de microbiologia. v. 40. p. 1-119, Jun. 1998.

MAILLARD, J. Y. P.; MOORE, S.L; PAYNE, D.N. **Principles and Practice of Disinfection Preservation & Sterilization.** Blackwell. 4 ed. P. 59-230, 2004.

MANAHAN, S. E. **Fundamentals of Environmental Chemistry.** CRC Press. 3 ed. p. 528-430, 2008.

MANAHAN. S. E. **Environmental Chemistry.** 5 ed. Crc Press. 9 ed. p. 200-765, 2010.

MARQUES EB, SUZART S. **Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina.** Journal of Medical Microbiology, v.53, p.1069-1073, 2004.

MARTIN. O.V et al. **Pollutants, Human Health and the Environment: A Risk Based Approach.** 5 ed. John Wiley&sons. 2012.

MICHAEL. A. C. Et al. **Fundamentals and Applications of Bioremediation: Principles.** v, 1, p. 59, 1998.

MOREIRA, FATIMA. M. S; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquimica do solo.** Ufla. 2 ed, p. 163-40, 2006.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 304-307, 2011.

MURRAY. B. E. **The life and times of the Enterococcus**. Program in Infections Diseases and Clinical Microbiology. Texas. Jan; 3(1): 46–65, Rev. 1990.

NANNIPIERI., P, et al. **Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications**. Marcel Dekker. University of kent Canterbury, England, New York. 2002.

OGAKI, M, B. **Tópicos Especiais em Microbiologia: *Enterococcus sp.* em Alimentos**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina, p. 77. Londrina, 2010.

PRASAD, M.N.V; SAJWAN. K.S; NAIDU, R. **Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation**. Taylor & Francis. p. 256-278, 2006.

QUINÁGLIA. G. A. **Caracterização dos Níveis de Basais de Concentração de Metais**. 1 ed. p. 31-50. Mar, 2012.

RAHIM, S, P. et al. **Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patient without prior exposure to linezolid**. Clin Infect Dis 36, p.146-148, 2003.

ROANE, T.M; MILLER. R. M. **Bioremediation: principles applications. Microbial remediation of metals**. 1ed. Cambridge. University of Idaho, Moscow, USA. p. 312-400, 2005.

RODRIGUEZ, CASTILHO. F. **Biotecnologia Ambiental**. Tébar. Madrid, Espanã, p. 401-510, 2005.

RONNEAU, C.; BITCHAEVA, O. **Biotechnology for waste management and site restoration**: Technological, Education, Business, Political aspects. Nato. 1 ed. v. 34, p. 190-197, 1997.

ROSEN, B. P et al. **Metals and Genetics**. The hospital for sick children and the University of Toronto, Canada. Springer, p. 201-206, 1998.

SECO, F, A, C, P, G. **Associação da Resistência a metais e a antibióticos em *Enterococcus spp.* de origem animal**. Projeto de pós-graduação. Dissertação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernanda Pessoa, 2010.

SIGEL, A; SIGEAL, H. **Metal ions in Biological Systems: Mercury and is Effects on Environment and Biology**. Marcel dekker. New York, v. 34, p. 215-300, 1997.

SILVA, V. L. da.; CAÇADOR, N. C.; SILVA, C. dos. S. F. da.; FONTES, C. O.; GARCIA, G. D.; NICOLI.; J. R.; DINIZ, C. G. **Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant Enterococci in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil**. Microbes and Environments, v. 27, nº 2, p. 179-185, 2012.

SILVA, K.H. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem**. Dissertação de mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3 ed. São Paulo, Varela, p. 49-51, 2007.

SILVEIRA E, FREITAS ANA R, ANTUNES P, BARROS M, CAMPOS J, COQUE T M, PEIXE L, NOVAIS C. **Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (human, animal, environment and food) and clonal lineages.** J Antimicrob Chemother. In Press, 2013.

SILVEIRA, M, E, M. **Tolerância e Biocidas e Dispersão Da Resistência a Antibióticos: Uma Abordagem Fenotípica e Molecular Em *Enterococcus* Spp De Diferentes Origens.** Tese do 3º. Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutorado em Ciências Farmacêuticas na especialidade de Microbiologia. Faculdade de FÁrmacia. Universidade do Porto. Jan, 2014.

SINGH, A. Et al. **Advances in applied bioremediation.** Springer. p. 246-285, 2009.

SHAECHTER, M. **Encyclopedia of microbiology : heavy metals, bacterial resistance.** Elsevier. San Diego, USA. 3 ed, v.1. p. 220-409, 2009.

SHERMAN, J. M. The Streptococci; The Enterococci and Related Streptococci. Cornell University, Ithaca, New York Received for publication October 7, 1937.

SHUKLA, D. et al. **Biotechnology and biology of trichoderma.** Elsevier. Amsterdam, p. 400-412, 2011.

SHUKLA, P. et al. **Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery.** Springer. University of Delhi, South Campus New Delhi. India. p. 69-110, 2013.

SOLIOZ, M.; ABICHT, H.K; MERMOND, M; MANCINI. S. **Response of gram-positive bacteria to copper stress.** Jornal of biological Inorganic Chemistry, 15, p.3-14, 2010.

SZYBALSKI, W., AND BRYSON, V. **Cross resistance of *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenes* var. aureus and *Mycobacterium ranae* to seventeen antibiotics.** Bact. Proc. p. 40, 1952.

THAKUR, I. S. **Industrial biotechnology problems and remedies.** Indu shekhar thakur. School of environmental Sciences. New Delhi, p. 190-195, 2006.

WEIL. R.R; BRADY. N.C. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos.** Bookman 3 ed. p. 611-620, 2013.