

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
CAMPUS APUCARANA/ LONDRINA**

GABRIELA BATISTA GOMES BRAVO

**RESISTÊNCIA AOS METAIS COBRE, CHUMBO, CROMO E
ZINCO EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DE
AMBIENTE AQUÁTICO**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2018

GABRIELA BATISTA GOMES BRAVO

**RESISTÊNCIA AOS METAIS COBRE, CHUMBO, CROMO E
ZINCO EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DE
AMBIENTE AQUÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto Maia

LONDRINA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

B826r Bravo, Gabriela Batista Gomes
Resistência aos metais cobre, chumbo, cromo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas em ambiente aquático / Gabriela Batista Gomes Bravo. – Londrina: [s.n.], 2018.
44 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciana Furlaneto Maia
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2018.
Bibliografia: f. 39-44

1. Biorremediação. 2. Metais Pesados. 3. Bactérias. I. Maia, Luciana Furlaneto, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

CDD: 628



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Campus Apucarana/Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

RESISTÊNCIA AOS METAIS COBRE, CHUMBO, CROMO E ZINCO EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DE AMBIENTE AQUÁTICO

por

Gabriela Batista Gomes Bravo

Dissertação de mestrado apresentada no dia 23 de fevereiro de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr^a Luciana Furlaneto Maia - Orientadora
(UTFPR – Londrina)

Prof. Dr^a Emanuele Júlio Galvão de França
(Universidade Estadual Norte do Paraná - UENP)

Prof. Dr^a Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
(UTFPR – Londrina)

Profa. Dra Alessandra Furtado da Silva
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso –

Dedico este trabalho à minha mãe, Zandira Batista, por ser a minha inspiração e o meu maior exemplo de dedicação, perseverança e competência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar meus caminhos e minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Luciana Furlaneto Maia pela oportunidade de realizar o mestrado em seu grupo de pesquisa, pela excelente orientação desde a iniciação científica. Agradeço por ter acreditado no meu potencial e o também pela confiança que me concedeu. Agradeço pelos ensinamentos que contribuiu para o meu crescimento não só profissional como também pessoal. Minha eterna gratidão pela oportunidade e por todo o aprendizado que me proporcionou.

Agradeço a Dr^a Alane Moralez, por toda dedicação, conhecimento repassado e paciência durante a realização desse trabalho. Pela amizade e companhia durante esses dois anos de mestrado. Obrigada pelos conselhos, pelas correções, sugestões e ajuda no desenvolvimento de todo o meu trabalho, vou leva-los sempre comigo.

À Prof^a Dr^a Márcia Furlaneto, por disponibilizar o seu laboratório, recursos e equipamentos, por sempre me receber de braços abertos e pelos ensinamentos repassados que foram de grande valia para este trabalho. Agradeço a todos os alunos do Laboratório Genoma pela excelente receptibilidade e por disponibilizar horários flexíveis para que eu pudesse desenvolver minhas análises.

A todos os colegas do laboratório LAMBA durante esses dois anos, pelo bom convívio e companhia de todos os dias. Em especial à Ariadne Gonçalves e Mariana Fogaça por sempre estarem dispostas a me ajudar sempre que precisava.

A CAPES pelo apoio financeiro, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, por compartilharem conhecimentos e experiências que contribuíram para o meu crescimento profissional.

À toda minha família e amigos que sempre me apoiaram durante o decorrer do trabalho com muito amor, paciência, compreensão e carinho.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

GOMES-BRAVO, G.B. **Resistência aos metais cobre, chumbo, cromo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas de ambiente aquático**. 2018. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

A poluição ambiental por metais pesado ocorre por meio de seu acúmulo na água, sedimentos e no solo. A biorremediação por microrganismos destaca-se como uma ferramenta para a descontaminação de ambientes com metais tóxicos. A utilização de bactérias com potencial de remediação comprovada e capacidade de sobrevivência no ambiente contaminado é importante para o sucesso da biorremediação. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de tolerância de bactérias isoladas do ambiente aquático aos metais tóxicos cobre, chumbo, cromo e zinco. Um total de 72 isolados bacterianos, caracterizados como Gram-positivas proveniente de corpos d'água da região de Apucarana – PR foram utilizadas nesse estudo. A técnica da placa gradiente foi utilizada como um teste inicial para selecionar os isolados com resistência ao metal cobre. A identificação genotípica foi realizada para caracterizar genes de resistência para o metal cobre, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR. Os isolados foram avaliados quanto a concentração inibitória mínima (CIM) para os metais cobre, chumbo, cromo e zinco, por meio do método de microdiluição em caldo. Também foi realizado o teste CIM em ágar para o metal cobre. E para avaliar a resistência a antimicrobianos foi realizado o teste disco-difusão. Os resultados revelaram que 97% dos isolados bacterianos apresentaram resistência ao metal cobre. Somente 7 isolados apresentaram gene de resistência para o cobre, o que representa aproximadamente 10% do total de isolados avaliados. Esses isolados foram submetidos a identificação genotípica pelo sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal, apresentando alta similaridade com as seguintes espécies: *Enterococcus lactis* (EL03), *Bacillus aerius* (BA04), *Bacillus licheniformis* (BL05), *Enterococcus casseliflavus* (EC06), *Enterococcus casseliflavus* (EC07) e dois isolados IS01 e IS02 não foram identificados. Os isolados que apresentaram melhor crescimento em concentração elevada de cobre foram IS01, IS02 e EL03. Para os demais metais, chumbo, cromo e zinco, destacaram-se os isolados EL03 e EC07. A maioria dos isolados foram sensíveis aos antibióticos testados, somente o isolado EL03 apresentou resistência fenotípica a tetraciclina, mostrando-se sensível ou com resistência intermediária para os demais antibióticos testados. Esses resultados revelam que as bactérias analisadas apresentaram resistência aos metais tóxicos testados caracterizando um potencial para a biorremediação, tendo em vista que muitas bactérias encontradas naturalmente no meio ambiente podem estar estritamente relacionadas com o processo de biorremediação reduzindo a toxicidade dos metais.

PALAVRAS-CHAVE: Metal pesado, bactérias, biorremediação.

ABSTRACT

GOMES-BRAVO, G.B. **Copper, lead, chromium and zinc metals resistance in Gram-positive bacteria from aquatic environment.** 2018. 44 p Dissertation (Master in Environmental Engineering) - Graduate Program in Environmental Engineering, Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2018.

Environmental pollution by toxic metals through their accumulation in water, sediments and not soil. Bioremediation by microorganisms stands out as a tool for the decontamination of environments with toxic metals. The use of bacteria with proven remediation potential and ability to survive without a contaminated environment is important for the success of bioremediation. The objective of this study was to evaluate the tolerability of bacteria isolated from the aquatic environment to the toxic metals copper, lead, chromium and zinc. A total of 72 bacterial isolates, characterized as Gram-positive proved of water bodies of the Apucarana-PR region were aspirated to study. The gradient plate technique was used as an initial test to select the metal copper isolates. Genetic identification was performed to characterize resistance genes for metal copper, using the polymerase chain reaction (PCR) technique. The isolates were subjected to a minimum inhibitory concentration (MIC) for copper, lead, chromium and zinc by means of the broth microdilution method. In addition, he performed the CIM agar test for copper metal. And to evaluate antimicrobial resistance for the test disc-diffusion. The results revealed that 97% of the bacterial isolates showed resistance to copper metal. Only 7 isolates showed a resistance gene for copper, which represents approximately 10% of the total isolates. *Enterococcus lactis* (EL03), *Bacillus aerius* (BA04), *Bacillus licheniformis* (BL05), *Enterococcus casseliflavus* (EC06), *Enterococcus casseliflavus* (EC07) were also submitted to genotype identification by the sequencing of the 16S region to make ribosomal DNA, and two isolates IS01 and IS02 were not identified. The isolates that presented the best growth in high concentration of copper, IS01, IS02 and EL03. For the other metals, lead, chromium and zinc, the isolates EL03 and EC07 were highlighted. Most of the isolates were sensitive to the antibiotics tested, only the EL03 isolate presented phenotypic resistance to tetracycline, showing a sensitive or resistance intermediate for the other antibiotics tested. These results reveal that as analyzed bacteria showed resistance to tested toxic metals that characterize a potential for bioremediation, since many bacteria found naturally in the environment may be related to the bioremediation process reducing the toxicity of the metals.

Keywords: Heavy metals, bacteria, bioremediation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo dos principais mecanismos de tolerância nas bactérias.....	16
Figura 2 - Crescimento dos isolados na placa gradiente para o metal cobre.	26
Figura 3 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, mostrando a relação entre os isolados analisados neste estudo.	27
Figura 4 - Crescimento dos isolados bacterianos frente a maior concentração do metal cobre (12,18 e 780 µg/mL) nas temperaturas de incubação a 28 e 37°C.	28
Figura 5 - Detalhe do crescimento em meio de cultura sólido contendo 50.000µg/mL de zinco (A) e 2.000µg/mL de cromo (B).....	33
Figura 6 - Crescimentos dos isolados entre a menor e maior concentração dos os metais chumbo (A), cromo (B) e zinco (C), nas temperaturas de incubação a 28 °C e 37 °C.	34

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 METAIS TÓXICOS	11
3.1.1 Chumbo.....	11
3.1.2 Cobre	12
3.1.3 Zinco	12
3.1.4 Cromo	13
3.2 CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS POR METAIS TÓXICOS ...	13
3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA A METAIS TÓXICOS E BIORREMEDIAÇÃO .	15
4 METODOLOGIA	19
5 RESULTADOS.....	20
CONCLUSÃO GERAL.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por metais tóxicos pode ser caracterizada como uma das mais severas agressões ambientais, tendo em vista que metais tóxicos não são biodegradáveis e se acumulam no meio ambiente.

Com o desenvolvimento industrial acelerado, intensificou a contaminação ambiental por meio de resíduos e efluentes contaminados. As atividades antropogênicas que envolvem mineração, deposição inadequada de resíduos, efluentes industriais e domésticos, aplicação de pesticidas e fertilizantes em abundância e indústrias (metalúrgicas, baterias, químicas, e etc.) são as principais causadoras de poluição ambiental por metais tóxicos.

Os métodos convencionais para remover os metais tóxicos do ambiente incluem precipitação, floculação e membranas filtrantes. Contudo são processos onerosos. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir ou recuperar a contaminação ambiental por metais tóxicos, como por exemplo a biorremediação feita por microrganismos, como bactérias. Nesse processo inclui a degradação do poluente por reações bioquímicas (HALTTUNEN, et al., 2006).

A utilização de bactérias com potencial de remediação comprovada e a capacidade de sobrevivência no ambiente contaminado proporciona uma alternativa para tratamentos e recuperação das áreas contaminadas.

Baseado nestes fatos, o presente estudo teve como objetivo analisar a tolerância a metais cobre, chumbo, zinco e cromo em bactérias isoladas de corpos d'água da cidade de Apucarana – PR, visando sua utilização na remediação da contaminação ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância de bactérias isolados do ambiente aquático à metais tóxicos (chumbo, cobre, cromo e zinco) e identificar o possível potencial para biorremediação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar isolados com resistência aos metais pesados chumbo, cobre, cromo e zinco;
- Identificar genotipicamente os isolados resistentes;
- Verificar a presença de genes de resistência ao metal cobre nos isolados resistentes;
- Verificar a concentração inibitória mínima do crescimento bacteriano em meio de cultura líquida e sólida contendo chumbo, cobre, cromo e zinco.
- Verificar a suscetibilidade antimicrobiana dos isolados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 METAIS PESADO

Metais são substâncias com alta condutividade elétrica, maleabilidade e possuem densidade específica maior do que 5 g/cm³. São classificados em três classes: metais, metaloides e metais pesados. Os metais compõem um grupo de elementos de grande importância biológica e industrial. Alguns metais são essenciais para humanos e microrganismos, como por exemplo o cobre e o zinco, porém, em altas concentrações são tóxicos (ROANE et. al., 2009; JAISHANKAR et.al., 2014)

Os metais pesado, a exemplo do chumbo e cromo, interrompem as funções metabólicas dos humanos e se acumulam nos tecidos, prejudicando órgãos como coração, cérebro, rins e etc. Outra maneira de interromper as funções metabólicas é por deslocamento de minerais nutricionais vitais de seu local original, impedindo as funções biológicas (SINGH, et. al., 2011).

Nos sistemas aquáticos, a introdução de metais ocorre naturalmente por meio de intemperismo e processos biogeoquímicos, mas em baixas concentrações, tendo em vista que a sua maioria está imobilizado em sedimentos e minérios. Recentemente, os metais tóxicos estão associados a toxicidade ambiental e biológica. Os metais cobre, chumbo, cromo e zinco são mais comumente associados a poluição ambiental (GADD, 2009; ROANE et. al., 2009).

3.1.1 Chumbo

O chumbo é encontrado na natureza de forma relativamente abundante, ocorre na maioria das vezes como sulfeto de chumbo, sulfato de chumbo e carbonato de chumbo. Suas características são maleabilidade e mal condutor de eletricidade. É muito utilizado em atividades industriais devido a sua resistência a corrosão. As principais atividades antropogênicas que utilizam esses metais são indústrias de tabaco, tintas, metalúrgicas, pesticidas, indústrias automotivas, mineração e etc. (QUINÁGLIA, 2006; BIONDO, 2007).

O chumbo é liberado em corpos d'água proveniente das emissões atmosféricas, lixiviação do solo e na maioria das vezes oriundo de fontes antrópicas. Esse metal não oferece nenhuma função essencial aos humanos, portanto é

altamente tóxico. A alimentação, o ar e a água são as principais fontes de exposição ao chumbo. Os efeitos nocivos à saúde por meio da exposição à esse metal são diversos, como danos ao sistema nervoso, trato gastrointestinal e rins (FU, WANG, 2011; SINGH, et. al., 2011; MORAIS et al, 2012; GAUTAM, et al., 2016).

3.1.2 Cobre

O cobre é considerado um metal precursor da era dos metais, que teve início à 12 mil anos atrás. Possui elevada condutividade térmica e elétrica, baixa corrosividade e habilidade de amalgamar. Pode estar presente na natureza como sulfeto, arsenito, cloreto, carbonato e na forma elementar. As atividades industriais que utilizam o cobre, tendo como principais fontes poluidoras a mineração, produção de pesticidas, indústria química, refinamento de metais, algicidas, fungicidas e etc. (QUINÁGLIA, 2006; BIONDO, 2007).

O cobre é um micronutriente essencial para plantas e animais, incluindo os humanos. Está envolvido em funções de enzimas e proteínas em uma ampla gama de processos metabólicos. Ao mesmo tempo, altos níveis de cobre podem prejudicar à saúde humana, podendo causar anemias, irritação estomacal, danos nos fígados, rins e intoxicação (GEOROPOULOS, et. al.; 2011; SINGH, 2011).

3.1.3 Zinco

O zinco é um elemento comum na crosta terrestre, encontrando-se no ar, solo e na água. Na natureza, o zinco pode ser encontrado nas formas de sulfeto de zinco, óxido de zinco, carbonato de zinco, silicato, cloreto de zinco, acetato de zinco, sulfato de zinco, entre outros. É um elemento essencial e benéfico para o metabolismo humano, animais, plantas e também de microrganismos. O zinco entra no meio ambiente por meio de fontes antrópicas como indústrias de óxido de zinco, tintas, borrachas, farmacêuticas, fungicidas, pilhas e baterias, têxtil e etc. (QUINÁGLIA, 2006).

O grau de toxicidade desse metal não é elevado, mas em altas concentrações podem ser prejudiciais à saúde causando efeitos como intoxicação, úlceras, anemias, má circulação sanguínea, alterações respiratórias e fibrose pulmonar (BIONDO, 2007; CHOUDHURY, SRIVASTAVA; 2001).

3.1.4 Cromo

O cromo é o sétimo elemento mais abundante na Terra, é um metal com forma cristalina cúbica, sem odor e muito resistente a corrosão. O cromo pode ser encontrado no meio ambiente em vários estados de oxidação, desde Cr^{2+} até Cr^{6+} . Não é encontrado de forma livre na natureza, comumente encontrado como óxidos. As formas mais estáveis são o cromo trivalente e o cromo hexavalente, ambos são estados tóxicos para animais, humanos e plantas. Quase todo o cromo hexavalente existente no meio ambiente provem de atividades antropogênicas: queima de petróleo e carvão, ligas de aço inox, galvanoplastias, curtumes, pigmentos, preservativos de madeiras, alguns fertilizantes e etc. (QUINÁGLIA, 2006; JAISHANKAR, et.al., 2014).

Esse metal é liberado no meio ambiente por meio de efluentes industriais e por fertilizantes. Quando disponibilizados na água, deposita-se em sedimentos de forma solúvel (Cr^{6+}) ou insolúvel e pode se bioacumular em plantas, microrganismos, peixes crustáceos e etc. Portanto, níveis elevados de cromo presentes em corpos d'água podem ser nocivos à saúde humana, causando efeitos como alergias, câncer e intoxicação (BIONDO, 2007; JAISHANKAR, et.al., 2014).

3.2 CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS POR METAIS PESADOS

A água é uma das substâncias mais comuns existentes na natureza, é encontrada principalmente no estado líquido, constituindo de um recurso natural renovável por meio do ciclo hidrológico. Todos os organismos vivos dependem de água para sobreviver, por isso é fundamental que os recursos hídricos apresentem características físicas e químicas adequadas para a sua utilização. A água deve conter substâncias essenciais à vida e estar livre de outras que possam produzir efeitos deletérios aos organismos vivos (BRAGA, 2005).

A qualidade da água e sua poluição estão relacionadas diretamente com seu uso. Os principais usos da água são: abastecimento doméstico, abastecimento industrial, irrigação, dessedentação de animais, preservação da flora e da fauna, recreação e lazer, criação de espécies, geração de energia elétrica, navegação, harmonia paisagística, diluição e transporte de despejos (VON SPERLING, 2005).

As diversas transformações do mundo atual, a industrialização acelerada, demanda por energia e a exploração inconsciente dos recursos naturais durante o

último século são os principais motivos para agravar a poluição ambiental dos recursos hídricos (GAUTAM, et al., 2016).

As atividades antropogênicas como galvanoplastia, curtimento de couro, indústrias (metalúrgicas, baterias, químicas), aplicação de pesticidas, fertilizantes e descarte irregular de efluentes industriais são as principais causadoras de poluição ambiental por metais tóxicos. Este fato é devido a diversos poluentes orgânicos e inorgânicos, resultantes dos processos industriais que são descarregados em corpos d'água irregularmente, provocando a contaminação não somente dos corpos d'água, mas também do solo e sedimento (MORAIS et al, 2012; OVES, et al., 2013; GAUTAM, et al., 2016).

Devido a mobilidade dos metais nos ecossistemas aquáticos e a sua toxicidade, os metais foram priorizados como principais contaminantes inorgânicos do meio ambiente. Os metais geralmente não são eliminados do ecossistema aquático por processos naturais em contraste com a maioria dos poluentes orgânicos, conseqüentemente, aumenta a concentração de metais no ambiente e a acumulação ao longo de uma cadeia alimentar, causando toxicidade aguda ou crônica aos seres vivos (GAUTAM, et al., 2016).

A preocupação com a contaminação por metais tóxicos aumentou nos últimos anos, devido aos efeitos tóxicos e de longo prazo que esses contaminantes podem acarretar a saúde humana e de outros organismos vivos. Os metais tóxicos de maior preocupação no tratamento de águas residuárias incluem zinco, cobre, chumbo e cromo (FU, WANG; 2011).

No Brasil, a Resolução CONAMA 357 de 25 de março de 2005, dispõe sobre as quantidades mínimas de metais que são permitidas em corpos d'água e efluentes dependendo da classe em que se encontram os corpos d'água com a finalidade de evitar a contaminação dos recursos hídricos (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetro inorgânicos da qualidade da água permitidos na Resolução CONAMA 357/2005.

Metais	Classe 1	Classe 2 e 3
	Valor máximo	Valor máximo
Chumbo	0,01 mg/L	0,033 mg/L
Cobre	0,009 mg/L	0,013 mg/L
Cromo	0,05 mg/L	0,05 mg/L
Zinco	0,18 mg/L	5 mg/L

Fonte: BRASIL, 2005.

3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA A METAIS PESADOS E BIORREMEDIAÇÃO

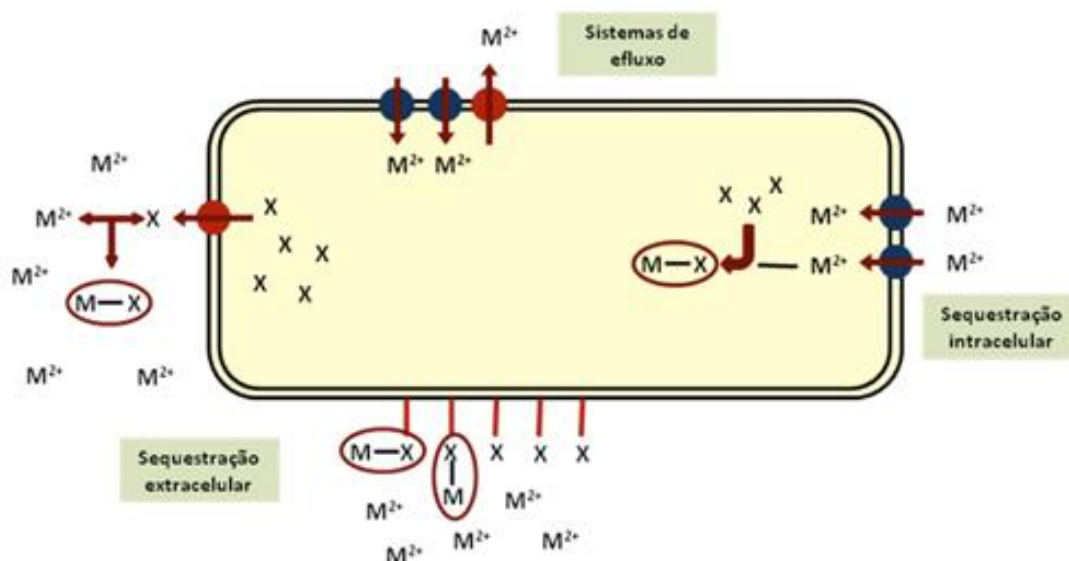
Os metais pesados podem exibir uma variedade de toxicidades aos microrganismos. Esses efeitos à comunidade microbiana são comumente associados a contaminação antropogênica. Surge-se então essa toxicidade por meio de fontes aéreas e aquáticas, práticas agrícolas, atividades industriais e resíduos tanto domésticos quanto industriais, incluindo os efluentes. Para que ocorra a toxidade microbiana, os metais tóxicos interagem diretamente com as células microbianas e/ou indiretamente afetando o crescimento e o metabolismo, interferindo na absorção de nutrientes ou também alterando o ambiente físico-químico da célula (GADD, 2009).

Concentrações tóxicas de metal podem afetar as atividades microbianas incluindo produtividade primária, metanogênese, fixação de nitrogênio, respiração, motilidade, ciclagem biogeoquímica de carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos, decomposição da matéria orgânica e síntese enzimática. Apesar do potencial toxicológico oferecido pelos metais tóxicos, microrganismos ainda sobrevivem, crescem e prosperam em ambientes poluídos por metal. Isso ocorre pelo fato de que os microrganismos exibem mecanismos que determinam a entrada e a saída de metais em células, contribuindo para a resistência e tolerância aos metais tóxicos (GADD, 2009).

Alguns metais são essenciais para o metabolismo microbiano, como por exemplo cobalto, cobre, níquel e zinco, mas em níveis elevados podem se tornar tóxicos. Esses metais essenciais desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica e na atividade das biomoléculas, mas alguns metais exigem mudança de valência antes do seu uso, o que indica que os microrganismos possuem sistemas de redução de óxidos e regulação de metal (BRUINS, et.al, 2000).

Bactérias se adaptam aos metais tóxicos por meio de uma variedade de sistemas de resistências, mediada por cromossomos, transposon e por plasmídeos. Alguns mecanismos de resistência bacteriana à metais são: exclusão por barreira permeável, sequestro intra e extracelular, transporte ativo ou bombas de efluxo e redução na sensibilidade dos alvos celulares aos íons metálicos (Figura 1) (BRUINS, et.al, 2000).

Figura 1 - Esquema representativo dos principais mecanismos de tolerância nas bactérias.



M⁺: metal tóxico; X: Constituintes da célula que interagem com os metais.

Fonte: Escola Superior de Biotecnologia - ESB.

O mecanismo de exclusão por barreira impermeável está relacionado com alterações na parede e membrana celular. Esse mecanismo é caracterizado como uma tentativa do organismo para proteger os componentes celulares essenciais que são sensíveis aos metais (BRUINS, et.al, 2000).

O sistema de transporte ativo ou bombas de efluxo representam uma categoria maior de resistência a metais. Os microrganismos usam o mecanismo de transporte ativo para exportar metais tóxicos de seu citoplasma. Esses mecanismos podem ser codificados por cromossomo ou plasmídeos. Os metais não essenciais entram nas células através de sistemas normais de transporte, mas são rapidamente exportados (BRUINS, et.al, 2000).

O sequestro intracelular é definido como a acumulação de metais dentro do citoplasma para prevenir a exposição aos componentes essenciais celulares. Os metais comumente sequestrados são cádmio, cobre e zinco. Já o sequestro extracelular ocorre quando o metal tóxico se liga a um complexo e não pode entrar na membrana celular, como por exemplo em *Citrobacter*, forma-se complexos insolúveis de fosfato de cádmio para conferir a resistência (BRUINS, et.al, 2000).

Alguns microrganismos se adaptam à presença de substâncias tóxicas, como os metais, alterando a sensibilidade dos componentes celulares essenciais, proporcionando um grau de proteção natural. Essa produção é alcançada por

mutações que diminuem a sensibilidade, mas não altera as funções básicas. Os microrganismos podem se proteger por meio da produção de componentes resistentes a metais ou de caminhos alternativos em uma plataforma para contornar componentes sensíveis. A resistência pode resultar de funções celulares normais que dão aos microrganismos um nível básico de tolerância (BRUINS, et.al, 2000).

A resistência bacteriana à metais tóxicos não é apenas disseminada em populações bacterianas ambientais, mas também em cepas bacterianas de ambientes clínicos e em agentes patogênicos humanos. Portanto, pode-se associar a resistência bacteriana à metais tóxicos com a resistência a antimicrobianos por meio de compartilhamento de função, expresso pelo mesmo gene, comumente definido como resistência cruzada. Essa resistência pode ser transferida entre organismos por meio de conjugação (mecanismo codificado por plasmídeo) ou transdução (um vírus bacteriano transfere o DNA de uma célula para a outra). Em alguns casos, resistência a certos antibióticos e metais é mediada pelo mesmo plasmídeo (BRUINS, et.al, 2000; DI CESARE et.al, 2016).

Portanto, a capacidade dos microrganismos como bactérias e fungos em remover metais tóxicos ou promover a sua transformação em formas menos tóxicas vem atraindo a sociedade nas últimas décadas. Com isso, grandes indústrias têm buscado com maior frequência técnicas e mecanismos adequados para o tratamento de efluentes com metais tóxicos principalmente para atender a legislação vigente. Métodos convencionais para remover os metais tóxicos do ambiente incluem precipitação, floculação e membrana filtrante, contudo são processos onerosos. Em contrapartida, processos de biorremediação de metais tóxicos por microrganismo passou a ser mais procurado devido ao seu baixo custo, alta aplicabilidade e por apresentarem bons resultados (GUO et al., 2010; HALTTUNEN, et al., 2006; HORNINK, 2015).

De acordo com Biondo (2007) a biorremediação é definida como um processo que utiliza organismos vivos tais como, bactérias, fungos, algas e plantas no processo de remoção ou remediação de contaminação ambiental no ambiente. A biorremediação por microrganismos ocorre devido a capacidades destes de imobilizar metais pesados, por simples adsorção em superfície celular, promovendo sua precipitação, ou por processos de formação de complexos intracelulares. Uma variedade de cepas bacterianas foram estudadas em diversos trabalhos para a remoção de íons metálicos, conforme descrito no Quadro 1 .

Quadro 1 – Espécies bacterianas utilizadas na remoção de diferentes metais.

Metal	Espécie bacteriana	Referência
Cromo	<i>Spirulina</i> sp.; <i>Bacillus thuringiensis</i>	REZAEI, 2016; SAHIN e OZTURK, 2005
Chumbo	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; <i>Bacillus lactis</i>	HALTTUNEN et.al., 2007
Cobre	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OVES et. al., 2013
Zinco	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i>	LIMCHAROENSUK et.al., 2015

A biorremediação pode ocorrer por bioacumulação e por biossorção. A bioacumulação ocorre quando há a captação de um íon metálico por meio de material biológico com atividade metabólica. E a biossorção envolve duas fases, a adsorção e a absorção. A adsorção é independente de energia e atividade metabólica, chamada também de captação passiva. E a absorção apresenta já depende de energia e metabolismo (MUSTAPHA, HALIMOON; 2015).

4 METODOLOGIA

As metodologias utilizadas nesse trabalho encontram-se descritas nos resultados.

5 RESULTADOS

Tolerância ao cobre e resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-positivas isoladas de água

Resumo

O cobre é um micronutriente essencial para todos os seres vivos, porém em grandes concentrações pode causar sérios problemas ambientais. A utilização de técnicas eficazes para a remediação de cobre reduz o impacto negativo deste metal e melhora das condições ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância fenotípica de 72 isolados bacterianos, provenientes de ambiente aquático, ao metal cobre e a presença de gene de resistência a este metal (*tcrB*), pela técnica de PCR. A técnica da placa gradiente foi utilizada para determinar a tolerância ao metal cobre. As concentrações de cobre utilizadas foram 12,18 e 780 µg/mL. Os isolados positivos para fenótipo e genótipo de resistência ao cobre foram utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a suscetibilidade a antimicrobianos. Como resultados obtive-se que 97% dos isolados foram tolerantes ao cobre, e 10% dos isolados apresentaram o gene *tcrB*. Destes, 100% dos isolados apresentaram crescimento na maior concentração de cobre utilizada. Na temperatura de incubação a 28°C obtivemos o melhor crescimento celular e maior tolerância ao cobre na menor e maior concentração. A maioria dos isolados apresentaram níveis de resistência intermediária aos antimicrobianos testados, e 14% apresentou resistência a tetraciclina. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as bactérias caracterizadas nesse estudo podem ser utilizadas para investigação de potenciais para a biorremediação deste metal, tendo em vista que muitas bactérias encontradas naturalmente no meio ambiente podem estar estritamente relacionadas com o processo de biorremediação reduzindo a toxicidade dos metais.

1 Introdução

A contaminação de corpos d'água por metais tóxicos tem sido um desafio à questão ambiental. Essas contaminações podem ocorrer devido a diversas atividades antropogênicas, como por exemplo, indústrias de tintas e pigmentos, aplicações de pesticidas e fertilizantes, metalúrgicas e industriais químicas (KANG et al., 2016; KAR et al., 2008; MORAIS et al., 2012; NAIK, DUBEY, 2013).

A procura por novas tecnologias economicamente viáveis para a remoção de metais tóxicos do ambiente direciona-se para processos de biorremediação por microrganismos, devido ao grande potencial como agentes de bioadsorção, imobilização e transformação dos metais (DAS, et al., 2008; GAUTAM, et al., 2016; ROANE, et al., 2009).

O cobre é um micronutriente essencial para células eucarióticas e procarióticas, porém em concentrações elevadas podem causar danos, tais como bloqueio de reações bioquímicas, inativação enzimática, interferência no processo de transcrição e tradução de genes e lise celular. Entre os efeitos nocivos do cobre à saúde humana destaca-se a anemia, irritação intestinal e estomacal, danos no fígado e rins. Em geral, os microrganismos possuem mecanismos de sobrevivência a este metal (NIES, 1999; MATYAR, et al., 2010; ORELL, et al., 2010).

Diversos trabalhos relatam a resistência de microrganismos ao metal cobre, a exemplo de *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de efluentes domésticos (Filali, et al., 2000), *Xantomonas axonopodis*, isolada de maracujazeiro (Franco e Takatsu, 2004), *Enterobacter*, de estação de tratamento de água residuais (Lu et al., 2006), *Bacillus* e *Staphylococcus* isolados de efluentes e solos de curtumes (Alam, et al., 2011), *Escherichia coli* de efluentes de curtumes (Selvi, et al., 2012), *Pseudomonas fluorescens*, de água residuais de suínos (Zhou, et al., 2015), *Salmonella*, de carnes (Deng et al., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* de drenos industriais (Haroun, et al., 2017).

Bactérias utilizam diversos mecanismos para sobreviver aos metais, como exclusão por barreira permeável, sequestro intra e extracelular, transporte ativo de substâncias, bombas de efluxo, desintoxicação enzimática e redução na sensibilidade dos alvos celulares. Muitos dos genes responsáveis por estes mecanismos se encontram em plasmídeo conjugativos (BRUNIS, et al., 2000; DA SILVA, et al., 2012).

O mecanismo de homeostase ao cobre já foi amplamente estudado em procariotos, podendo ser mediado pela expressão de proteínas chaperona de cobre, proteínas transportadoras de Cu^2 , ATPases transportadora de Cu^2 e Cu-Zn superóxido dismutase. Em *Enterococcus hirae*, e em outras bacteriais Gram positivas, a regulação da homeostase ao cobre se dá por proteína de membrana denominada CPxATPases (MAGNANI e SOLIOZ, 2005).

A resistência cruzada aos metais pesados e aos antibióticos ou à ligação de genes de resistência a antibióticos com determinantes da resistência ao metal pesado no mesmo plasmídeo (co-resistência) também pode permitir a manutenção da resistência aos antibióticos na ausência de antibióticos em ambientes poluídos de metais pesados (ORELL, et al., 2010).

Porém, para melhorar a aplicabilidade de bioissorção no tratamento de águas residuais, é importante isolar e identificar mais cepas microbianas que possam

absorver metais com elevada eficiência e especificidade, bem como para projetar melhores bioprocessos que efetivamente removem ou recuperam metais pesados de sistemas aquáticos. Este fato motiva-se a isolar novas cepas bacterianas tolerantes ao cobre de ambiente aquático e com potencial contaminação por este metal, bem como correlacionar com a resistência a antimicrobianos, visando potencial aplicação em processos de biorremediação.

2 Metodologia

2.1 Material Biológico

Neste estudo foram avaliados 72 isolados bacterianos provenientes de quatro corpos d'água do Córrego Jaboti, Lago Jaboti, Represa do Barreiro e Ribeirão Biguaçu, da cidade de Apucarana – norte do Estado do Paraná. Trata-se de uma região de ocupação agrícola e presença de indústria têxtil. Os isolados estão armazenados em caldo Brain Heart Infusion - BHI (Himedia) acrescido de 20% de glicerol e mantidos a -20°.

2.2 Teste de tolerância ao cobre em Placa Gradiente

Para verificar a tolerância dos isolados ao metal cobre foi utilizada a técnica da placa gradiente descrita por Szybalski e Bryson (1952) com modificações. Para tanto, a montagem da placa consistiu de duas camadas de meio ágar. A camada inferior continha 10 mL de meio Muller Hilton (MH) ágar (Himedia), geleificada de forma inclinada. A camada superior foi composta de 10 mL de MH ágar acrescido da solução de sulfato de cobre (CuSO_4) com a concentração de 0,013 mg/L, formando assim um gradiente de concentração do metal. Após montagem da placa, os isolados foram inoculados em linhas horizontais partindo da posição de menor concentração para a de maior concentração de cobre. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foram observadas presença ou ausência de crescimento ao longo da linha do inóculo.

2.3 Extração de DNA total

O DNA total foi extraído pelo método da fervura (Marques e Suzart, 2004), com modificações. Os isolados bacterianos foram cultivados em 3mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratórios Ltda., Brasil) e incubados a 37°C por 18 horas, sob agitação constante de 180 rpm. Após esse período, o cultivo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. Ao sedimento celular acrescentou-se 100 µL de água deionizada estéril e as amostras foram submetidas a 100°C por 30 minutos, seguida de banho de gelo por 3 minutos. Foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos e coletados 50 µL do sobrenadante.

2.4 Presença de genes de resistência ao metal cobre

A identificação do gene *tcrB*, que codifica para resistência ao metal cobre, foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As reações foram realizadas em termociclador (Biosystems) em um volume final de 20 µL, contendo 2 µL de DNA (10 ng), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (1,5 U) (Invitrogen), 2 µL Tampão da Taq, 1 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 1,4 µL de dNTP (175 µM), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (20pm) (Tabela 2).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta (UV). O tamanho do produto amplificado foi comparado ao marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen™ byLife Technologies).

2.5 Identificação genotípica dos isolados

Os isolados com resistência ao cobre e que apresentaram gene de resistência *tcrB* foram selecionados para a identificação genotípica pelo sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal. A amplificação da região 16S rDNA foi realizada conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores para resistência ao cobre e da região 16S do rDNA.

Primers	Sequência nucleotídica (3'-5')	Tamanho amplicon (pb)	Ciclo	Referência
tcrB F	CATCACGGTAGCTTTAAGGAGATTTTC	663	95°C, 10m; 30 X 94°C, 30s, 55°C, 30s; 72°C, 1m; 72°C, 10m	HASMAN et al., (2006)
tcrB R	ATAGAGGACGCCGCCACCATTG			
F 27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1450	95°C, 2m; 30 X 95°C, 1m, 55°C, 1m; 72°C, 1m; 72°C, 7m	WANG,P. et al (2007)
R 1492	GGTTACCTTGTTACGACTT			

Os produtos da amplificação da PCR foram encaminhados para empresa especializada em sequenciamento ATCGene Análises Moleculares LTDA. As sequências geradas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo NCBI ("National Center for Biotechnology Information"). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - "Basic Local Alignment Search Tools".

A árvore filogenética baseada na sequência 16S do DNA ribossomal foi construída com o algoritmo *Neighborjoining*/UPGMA do programa MEGA7.

2.4 Concentração Inibitória Mínima ao cobre

Os isolados foram avaliados quanto a concentração inibitória mínima (MIC) de cobre pelo método de microdiluição em caldo em placas poliestireno de 96 poços, de acordo com a metodologia descrita por Wiegand et al. (2008), com modificações. Os isolados foram cultivados em meio MH caldo, a 37 °C por 24 horas, a 120 rpm. Após o cultivo, a concentração celular dos isolados foi ajustada utilizando o tubo 0,5 da escala de MacFarland correspondente a 1×10^8 UFC/mL. As concentrações do metal foram 12,18 µg/mL e 780 µg/mL.

Os ensaios foram realizados com um volume total de 100 µL contendo MH caldo + metal + inóculo bacteriano, por poço, seguido de incubação a 28°C e 37°C por 24 h. O desenvolvimento celular foi mensurado em DO_{600nm} leitor de microplaca (Bio-Tek EL 808).

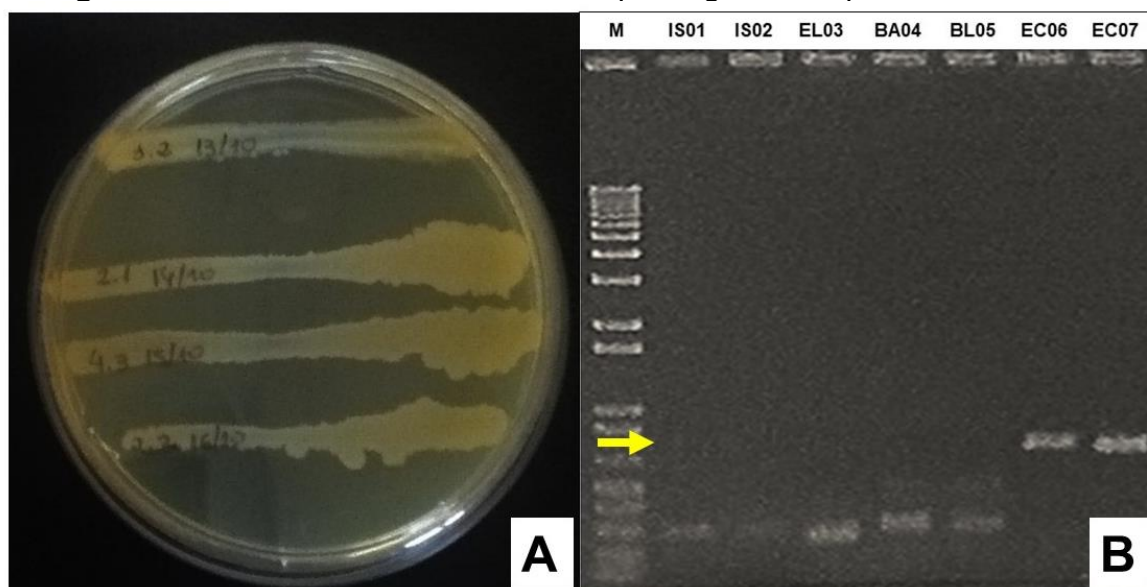
2.5 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A resistência a antibióticos foi determinada pelo teste disco-difusão, seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2014). Foram testados oito antimicrobianos: ampicilina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, norfloxacinina 10 µg, teicoplanina 30 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg. Os isolados previamente cultivados em meio BHI caldo por 24 h a 37 °C foram ajustados a uma concentração celular de 1×10^8 UFC/mL. Em seguida, foram inoculados por espalhamento em superfície de ágar Mueller Hinton com auxílio de um *swab* estéril, até obter uma camada confluenta e foram depositados os discos de antibióticos. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 – 24h. A interpretação das zonas de inibição foi realizada de acordo com a tabela de valores de resistência e antibiogramas do CLSI M 100 S-24 (2014). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

3 Resultados e Discussão

Os resultados revelaram que 97% dos isolados apresentaram crescimento contínuo na placa gradiente (Figura 2A), sendo resistentes ao metal cobre. A amplificação correspondente a região do gene *tcrB* foi positivo em 2 isolados, porém 5 isolados também apresentaram amplificação em tamanho não esperado (Figura 2B); mesmo assim estes 7 isolados foram selecionados para as análises posteriores. Cabe ressaltar que a resistência ao cobre pode ocorrer por outros mecanismos que não são codificados pelo gene *tcrB*, necessitando de investigação futura.

Figura 2 - Crescimento dos isolados na placa gradiente para o metal cobre.



(A) Crescimento contínuo dos isolados. (B) Gel representativo para confirmação do gênero de resistência ao metal cobre. Marcador de peso molecular 1Kb plus. Amplificação do gene *tcrB* na região correspondente ao peso molecular aproximado de 663 pb (seta).

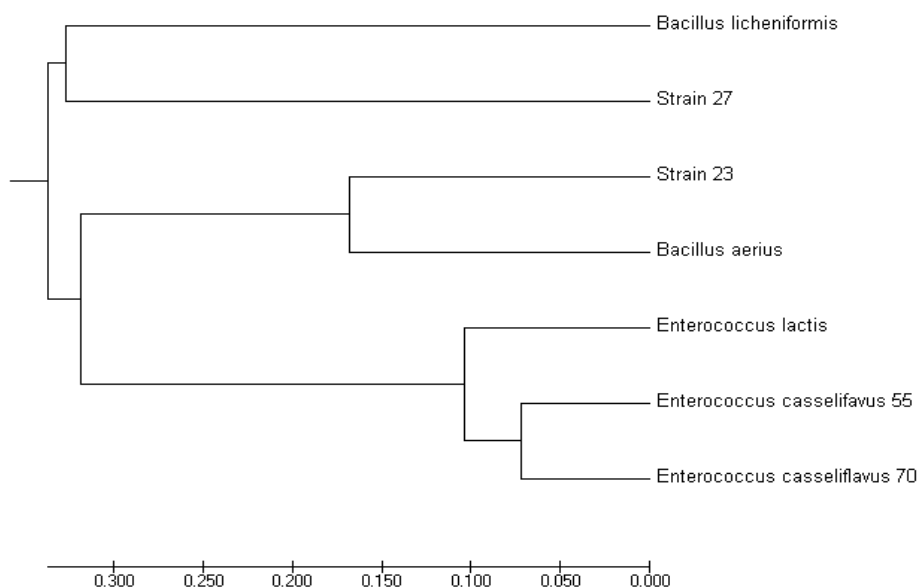
Fonte: Autoria própria.

Na análise filogenética dos isolados foram encontrado alta similaridade com as espécies *Enterococcus lactis* (acesso NR117562.1) *Bacillus aerius* (NR_118439.1), *Bacillus licheniformis* (KR999957.1), *Enterococcus casseliflavus* (NR_119280.1) e *Enterococcus casseliflavus* (NR_104560.1). Estes isolados foram submetidos as seguintes nomenclaturas: EL03, BA04, BL05, EC06 e EC07, respectivamente.

Dois isolados, denominados IS01 e IS02, não foram identificados pelo alinhamento do BLAST. Contudo, em análise morfotintorial foi observado que trata de bactérias Gram-positivas, muito resistentes às condições ambientais.

Na análise filogenética observa-se uma heterogeneidade dos isolados, mostrando assim grande diversidade entre estes (Figura 3).

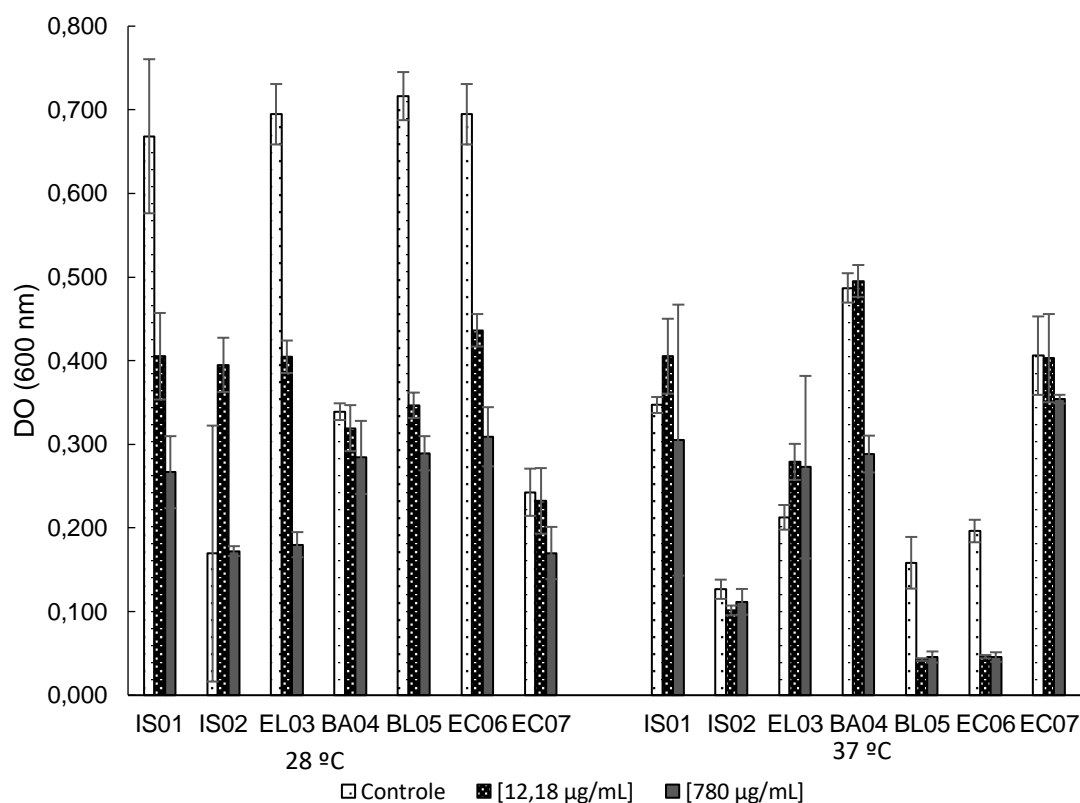
Figura 3 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, mostrando a relação entre os isolados analisados neste estudo.



Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que a resistência ao metal cobre pelo teste da concentração inibitória mínima foi isolado-temperatura-dependente (Figura 4). Há uma tendência de maior crescimento bacteriano sem e com metal na temperatura de 28°C; por se tratar de isolados provenientes de ambiente aquático, provavelmente há uma adaptação dessas células a temperaturas mais baixas. O isolado que melhor apresentou resultados de resistência ao metal a 28°C foi IS02, pois teve crescimento superior ao controle; já a 37°C o melhor isolado foi EL03. Estes isolados apresentam potencial para uso como biorredutores.

Figura 4 - Crescimento dos isolados bacterianos frente a maior concentração do metal cobre (12,18 e 780 $\mu\text{g/mL}$) nas temperaturas de incubação a 28 e 37°C.



IS01: isolado 23; IS02: isolado 27; EL03: *Enterococcus lactis*; BA04: *Bacillus aerius*; BL05: *Bacillus licheniformes*; EC06: *Enterococcus casseliflavus* 55; EC07: *Enterococcus casseliflavus* 70.

Fonte: Autoria própria.

Magnani e Solioz (2005), Matyar et al. (2010) e Rahman e Singh (2016) também relataram isolados bacterianos provenientes de ambiente aquático resistentes a elevadas concentrações de cobre, porém em concentrações bem menores da utilizada em nosso estudo.

Alam et al. (2011) ao estudar a resistência de isolados de efluentes industriais identificou que 23% dos isolados classificados como Gram-positivos foram resistentes a 800 $\mu\text{g/mL}$ de cobre. No presente estudo, os isolados foram coletados de corpos d'água, onde não são permitidos descarte de efluentes contaminados, portanto, o isolamento de bactérias com alta resistência ao cobre nos faz acreditar em uma possível contaminação ambiental por cobre.

A resistência bacteriana a metais tóxicos é um fator importante a ser considerado no estudo da remediação de áreas contaminadas, pois essa resistência está diretamente relacionada com a capacidade de sobrevivência e ao crescimento bacteriano em altas concentrações de metais tóxicos (KANG et al., 2016).

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos está apresentado no Quadro 2. Neste estudo foram testados os antimicrobianos ampicilinas, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, norfloxacina, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina, indicados para o teste de sensibilidade para Gram positivos. Como resultado obtive-se que apenas o isolado EL03 apresentou resistência fenotípica a tetraciclina, mostrando-se sensível ou com resistência intermediária para os demais antibióticos testados; já o isolado IS02, resistente ao cobre, apresentou sensibilidade ou resistência intermediária aos antimicrobianos testados. Cabe ressaltar que não foi realizado análises moleculares para verificar a presença de genes de resistência aos antibióticos que pudessem estar silenciados.

Quadro 2 - Perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados testados.

Isolado	Perfil de sensibilidade
IS01	Amp ^S ; Cip ^S ; Eri ^S ; Gen ^S ; Nor ^S ; Tei ^S ; Tet ^S ; Van ^S
IS02	Amp ^S ; Cip ^I ; Eri ^I ; Gen ^S ; Nor ^I ; Tei ^I ; Tet ^S ; Van ^I
EL03	Amp ^S ; Cip ^I ; Eri ^I ; Gen ^S ; Nor ^S ; Tei ^S ; Tet ^R ; Van ^S
BA04	Amp ^S ; Cip ^S ; Eri ^I ; Gen ^S ; Nor ^S ; Tei ^S ; Tet ^S ; Van ^S
BL05	Amp ^S ; Cip ^S ; Eri ^I ; Gen ^S ; Nor ^S ; Tei ^S ; Tet ^S ; Van ^S
EC06	Amp ^S ; Cip ^I ; Eri ^S ; Gen ^S ; Nor ^I ; Tei ^S ; Tet ^S ; Van ^S
EC07	Amp ^S ; Cip ^S ; Eri ^S ; Gen ^S ; Nor ^S ; Tei ^S ; Tet ^S ; Van ^S

S: sensível; I: intermediário; R: resistente; Amp: Ampicilina; Cip Ciprofloxacina; Eri Eritromicina; Gen: Gentamicina; Nor: Norfloxacina; Tei: Teicoplanina; Tet: Tetraciclina; Van: Vancomicina.

Diversos autores relataram que bactérias resistentes à metais também apresentam resistência a antibióticos (DA SILVA, 2012; KIMIRAN-ERDEM, 2007; MATYAR, 2008; SUNDARI, 2017).

No gênero *Enterococcus*, o gene *tcrB* já foi amplamente descrito, sendo frequentemente encontrado em plasmídeos conjugativos, que carregam também os genes para resistência à eritromicina (*ermB*), tetraciclina (*tetM*) e vancomicina (*vanA*) (PASQUAROLI et al., 2014; HENRIK e FRANKM 2002). Devido a localização desses genes, a resistência adquirida ao cobre já foi reportada em bactéria Gram positivas (HASMAN e AARESTRUP, 2002) e Gram negativas (BROWN et al., 1995).

Em estudo realizado por Amachawadi et al (2013), revelaram que todos os isolados de *Enterococcus* positivos para o gene *tcrB* também apresentaram resistência á eritromicina e tetraciclina. Contudo, este estudo mostrou que essa correlação não é dependente, uma vez que apenas um isolado foi resistente concomitantemente ao cobre e a tetraciclina. Os resultados deste trabalho corroboram

com os autores Cesare et al (2014), que relatam que isolados clínicos apresentam maior resistência a antimicrobianos quando comparado com isolados ambientais, que apresentam maior resistência a metais.

A resistência a antimicrobianos e a metais tóxicos é importante para a sobrevivência de bactérias em ambientes contaminados, pois na maioria das vezes as bactérias podem compartilhar elementos de mobilidade genética e como consequência, esses genes podem ser trocados entre bactérias, via transferência horizontal de genes. Kimiran-Erdem et al (2007) diz que essa resistência está associada aos plasmídeos contidos nos microrganismos. O aumento de resistência em bactérias pode estar relacionado ao processo de sobrevivência e adaptação a pressões seletivas em determinados ambientes.

Os resultados do presente estudo demonstram um potencial dos isolados IS01, IS02 e EL03 para a avaliação de processos de biorremediação, tendo em vista que cresceram em concentrações elevadas de cobre.

A poluição do meio ambiente por metais tóxicos vem crescendo rapidamente junto com a industrialização, pois muitas empresas ainda lançam o seus efluentes contaminados diretamente no meio ambiente. De acordo com Banerjee et al. (2015), a biorremediação de metais tóxicos por bactérias pode ser uma alternativa mais viável e barata para o tratamento de efluentes.

4 Conclusão

A resistência ao cobre não está associada apenas ao gene *tcrB*, uma vez que a maioria dos isolados tolerantes ao cobre não apresentaram este gene, ou seja, a alta resistência ao cobre não foi associada a alta resistência aos antimicrobianos avaliados.

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho pode-se identificar bactérias com resistência a elevadas concentrações de metais, o que as torna um grande potencial para realizar a biorremediação.

A capacidade das bactérias de sobreviver a ambientes extremos como a presença de metais tóxicos mostra claramente a importância de estudar a resistência a esses poluentes, pois podem ser utilizados em processo de biorremediação natural desses ambientes.

Resistência de *Enterococcus* sp aos metais chumbo, cromo e zinco

Resumo

Metais como chumbo, cromo e zinco podem causar diversos problemas ambientais devido a sua alta toxicidade. A capacidade de *Enterococcus* tolerar a altas concentrações de metais tóxicos tem se tornado uma alternativa eficaz para tratamento de ambientes contaminados. Este trabalho propôs avaliar a resistência de 3 isolados (EL03, EC06 e EC07) de *Enterococcus* sp aos metais chumbo, cromo e zinco. Foi utilizada a técnica da concentração inibitória mínima (CIM) em ágar e em caldo com diferentes concentrações dos metais, e incubação a 28 e 37 °C. Os resultados mostraram que 100% dos isolados foram resistentes nas todas as concentrações de metais testadas. O melhor crescimento foi obtido na maior concentração do metal chumbo a 28°C para os 3 isolados, já o isolado EL03 também apresentou melhor crescimento a 37°C. O isolado EC07 apresentou maior resistência aos metais cromo e zinco a 28°C, quando comparado ao controle, porém seu crescimento a esta temperatura foi baixo. Contudo, independente do crescimento, todos os isolados mostraram ser resistentes aos metais testados, apresentando a possibilidade de serem utilizados em processos de biorremediação.

1 Introdução

As principais preocupações com a contaminação ambiental por metais tóxicos, como por exemplo, chumbo, cromo e zinco são os possíveis efeitos tóxicos, mutagênicos e cancerígenos sobre os seres humanos e outros sistemas vivos. Dentre os efeitos a saúde humana, esses metais podem causar: anemia, irritação intestinal, danos ao sistema nervoso, danos no fígado, retardo mental em crianças entre outras doenças (SINGH et al., 2011; JAISHANKAR et al., 2014). A remoção de metais tóxicos no ambiente pode ser realizada pelo processo de biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos. Diversas bactérias desenvolveram respostas adaptativas a presença de metais em altos níveis, proliferando e se tornando dominantes no ambiente (Kuiper et al., 2004), pois utilizam mecanismos fisiológicos como bombas de efluxo, acúmulo e complexação do metal dentro da célula e redução do contaminante a uma forma menos tóxica (TEEMU, et al., 2007; ALAM et al., 2011; MICHALAK, et al. 2013; HAROUN et al., 2017). Porém, são poucos os estudos de resistência do gênero *Enterococcus* sp aos metais pesados, e uma vez que este microrganismo é resistente às condições adversas para seu crescimento, este estudo avaliou a resistência aos metais chumbo, cromo e zinco de três isolados de *Enterococcus* sp, visando seu uso potencial para a biorremediação.

2 Metodologia

2.1 Isolados bacterianos e metais tóxicos

Neste estudo foram utilizados os isolados *Enterococcus lactis* EL03, *Enterococcus casseliflavus*, EC06 e *E. casseliflavus* EC07, provenientes de ambiente aquático. Estes isolados foram testados e identificados em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da UTFPR. Foram testados os seguintes metais: Chumbo ($Pb(NO_3)_2$), Zinco ($ZnSO_4$), Cromo ($K_2Cr_2O_7$) (Cinética Reagentes & Soluções Ltda.). A solução estoque foi preparada em água destilada e esterilizada, sendo diluída em meio MH (Mueller Hinton) (Himedia).

2.2 Concentração Inibitória Mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos metais pesados foi realizada em meio de cultura sólido e líquido, segundo metodologia descrita por Wiegand, et al. (2008), com modificações. O cultivo celular foi realizado em MH líquido, à 37 °C por 24 horas, e a turbidez foi ajustada até atingir 0,5 na escala de MacFarland. Posteriormente, foram inoculados em placas contendo MH ágar com adições de diferentes concentrações dos metais, descritas na Tabela 3.

Tabela 3 -Concentrações dos metais chumbo, cromo e zinco utilizados nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) em ágar.

Ensaio	Chumbo ($\mu\text{g/mL}$)	Cromo ($\mu\text{g/mL}$)	Zinco ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,033	0,05	5
2	0,066	0,10	10
3	0,132	0,20	0,020
4	0,33	0,5	500
5	303	500	50.000
6	1.320	2.000	200.000

Fonte: Autoria própria.

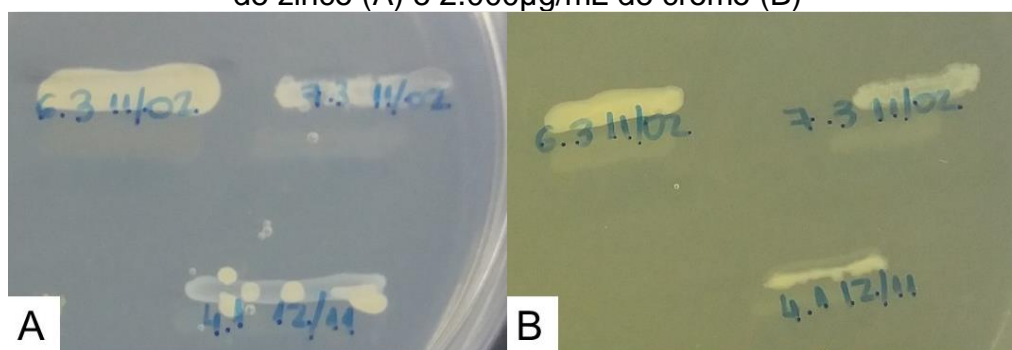
Já em cultura líquida, a CIM foi realizada pelo método de microdiluição em microplacas de poliestireno. O cultivo celular ajustado foi depositado em poços contendo MH líquido com as seguintes concentrações dos metais: chumbo 24, 375 $\mu\text{g/mL}$, 195 $\mu\text{g/mL}$ e 1560 $\mu\text{g/mL}$; cromo 46, 9 $\mu\text{g/mL}$, 375 $\mu\text{g/mL}$ e 3000 $\mu\text{g/mL}$; e

zinco 78 $\mu\text{g/mL}$, 6250 $\mu\text{g/mL}$ e 50.000 $\mu\text{g/mL}$. A densidade óptica foi mensurada em um leitor de microplaca (Bio-Tek EL 808) a 600nm, após 24 horas de incubação a 28°C e 37°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições e a maior concentração de metal que inibiu 80% do crescimento foi considerada a concentração inibitória mínima.

3 Resultados e Discussão

Os resultados apresentados após o CIM em ágar foram satisfatórios, sendo 100% a frequência de resistência aos metais testados para todo os isolados. Os isolados apresentaram crescimento confluinte em meio ágar contendo as maiores concentrações de metais testados (Figura 5).

Figura 5 - Detalhe do crescimento em meio de cultura sólido contendo 50.000 $\mu\text{g/mL}$ de zinco (A) e 2.000 $\mu\text{g/mL}$ de cromo (B)

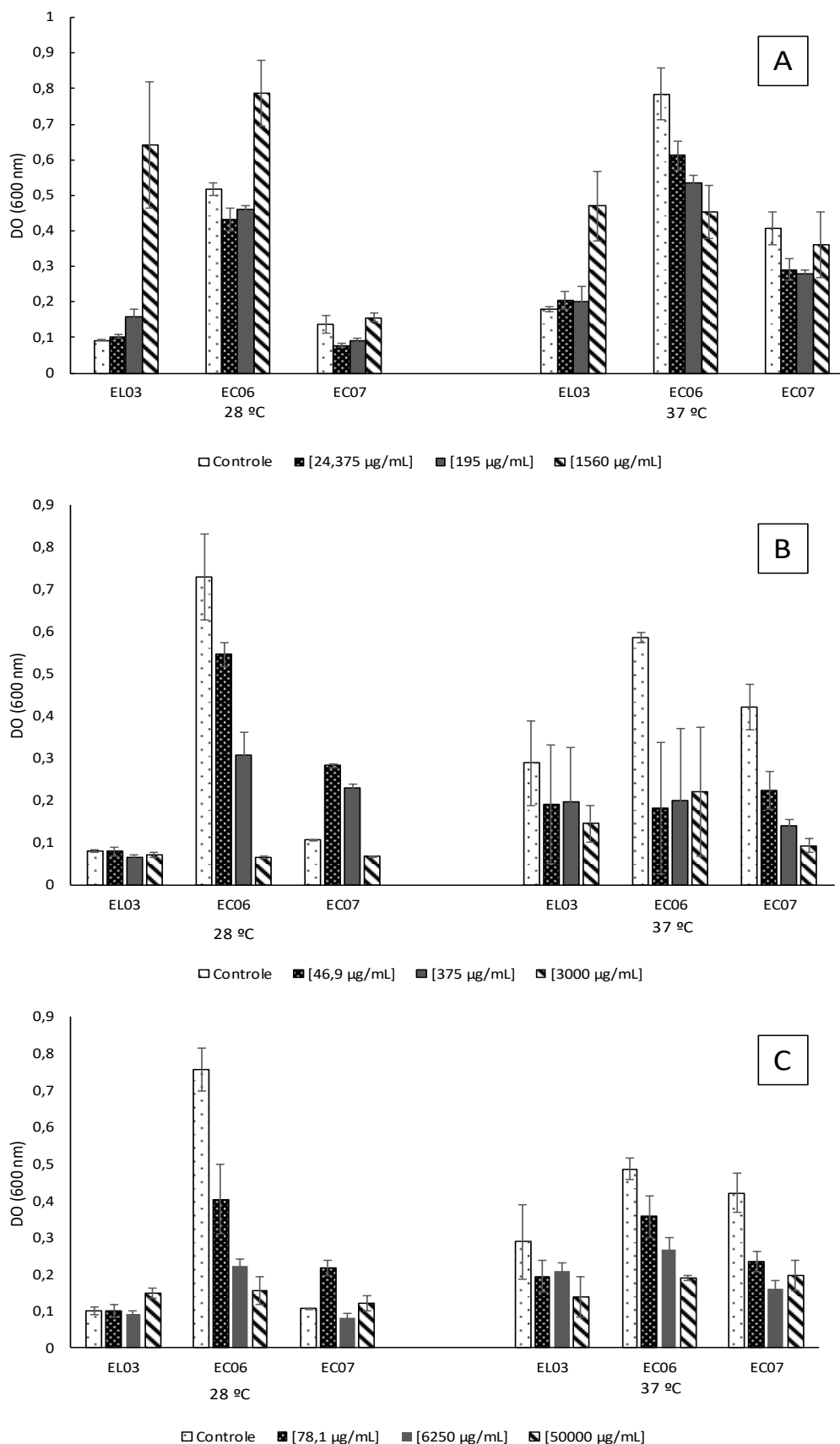


Fonte: Autoria própria.

Os resultados do CIM em caldo também foram satisfatórios. A Figura 6 apresenta o perfil de crescimento de cada isolado frente aos metais chumbo, cromo e zinco e em duas temperaturas de incubação. Os resultados mostraram que a resistência ao metal é isolado-dependente nas condições testadas neste estudo.

O isolado *Enterococcus casseliflavus* (EC06) apresentou maior resistência para os metais chumbo, cromo e zinco quando incubados a 28 °C. Já o isolado *Enterococcus lactis* (EL03) apresentou maior resistência ao metal chumbo, aparentemente esse isolado sem o metal não apresentou bom crescimento, o mesmo ocorreu para *Enterococcus casseliflavus* (EC07) para os metais cromo e zinco na temperatura 28 °C, ressaltando assim uma maior segurança ao utiliza-lo como biorremediadores.

Figura 6 - Crescimentos dos isolados entre a menor e maior concentração dos os metais chumbo (A), cromo (B) e zinco (C), nas temperaturas de incubação a 28 °C e 37 °C.



Os metais pesados como o cromo e zinco são considerados essenciais e participam do metabolismo celular microbiano; já o metal chumbo não é essencial, portanto, tóxico mesmo em níveis de traço. Os metais essenciais também podem produzir efeitos tóxicos quando em concentrações elevadas (Ji and Silver 1995), influenciando os processos de crescimento, morfologia da célula, metabolismo, formação e destruição da membrana celular (BRUINS et al., 2000).

De acordo com Neis (2003) são diversos os mecanismos que os microrganismos utilizam em resposta a metais pesados. Esses mecanismos podem ser codificados por genes cromossomais ou plasmidiais, e englobam fixação desses metais em complexos intra e extracelular, extrusão de íons metálicos por transporte ativo, reações de oxidação, redução, metilação e desmetilação (Leedjäv et al., 2008). Neste estudo não avaliamos os mecanismos de resistência aos metais, porém, comparando os resultados dos testes com os dados de crescimento do controle (meio de cultura sem metal) sugere-se que os isolados EC03 e EC06 apresentam algum mecanismo de utilização do metal chumbo para seu desenvolvimento, e não apenas o uso de bomba de efluxo.

As bactérias têm habilidade de fazer ligações com metais e são capazes não somente de tolerar concentrações de metais, mas também a desintoxicação de ambientes contaminados. Mustapha e Halimoon (2015) afirmam que é evidente que a contaminação por efluentes tanto industriais quanto domésticos são as razões pelo qual bactérias desenvolvam mecanismos de resistência ao longo de um período, oferecendo perigo a saúde humana e ao meio ambiente.

A propriedade de crescimento bacteriano em elevadas concentrações de metais tóxicos pode se mostrar uma alternativa para tratamento desses poluentes no meio ambiente. Nesse estudo, destaca-se que os isolados de *Enterococcus* sp podem ser caracterizados como resistentes aos metais tóxicos testados, pois cresceram nas temperaturas e concentrações do metal testadas. Embora a resistência foi isolado-dependente, observamos que o melhor resultado de resistência se deu a temperatura de 28°C, muito próximo da temperatura ambiente onde estes microrganismos foram isolados (dados não apresentados).

Ainda, é sabido que bactérias que crescem em ambiente contaminado por esses poluentes podem ser utilizadas como indicadoras de contaminação por metais pesados (DIAZ-RAVINA & BAATH,1996).

Alguns trabalhos relataram a resistência de *Enterococcus* a metais tóxicos, contudo, estes trabalhos correlacionam a co-resistência entre antimicrobianos e metais. Fard et al (2011) descreveram a resistência ao zinco em isolados de *E. faecalis* provenientes de suínos. Em isolados de ambiente aquático, Kimiran-Erdem et al (2007) analisaram a resistência ao zinco em isolados de *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *E. solitarius*; já Aktan et al (2013) estudaram a múltipla resistência a metais em isolados de *E. faecalis*. Os trabalhos não apresentam consenso em relação a concentração de metal em que os isolados bacterianos foram resistentes, portanto, cada trabalho traz uma concentração distinta desses metais; contudo, salientamos que nossos isolados apresentaram resistência a elevadas concentrações de metal chumbo, cromo e zinco, bem acima do permitido no ambiente pela legislação brasileira.

Enterococcus são ambíguos na natureza, sendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* bastante controversas com funções pouco claras e ainda podem abrigar vários genes codificadores de fatores de virulência (Sharma et al., 2012). Portanto, é pertinente propor a utilização de outras espécies deste gênero em processos de biorremediação.

Não há relatos na literatura que aborda a resistência de *E. lactis* a metais, sendo nosso trabalho o primeiro a relatar este fato. *E. lactis* tem sido extensivamente estudado devido ao seu potencial probiótico (Nami et al., 2015). *E. gallinarum* pode estar amplamente distribuído no ambiente e ser correlacionado com produção de bacteriocinas e ação probiótica (Mendoza et al., 2015), degradação de corantes têxteis (Soni, et al., 2016), e surtos de infecção hospitalar (Su et al., 2016). Enfatizamos que os isolados testados neste trabalho foram provenientes de ambiente aquático de uma região polo de indústrias têxteis.

4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar a concentração inibitória mínima dos três metais (chumbo, cromo e zinco) em todos os isolados testados. Estes apresentaram crescimento a concentrações variadas dos metais, sendo também variável pela temperatura de incubação.

Os isolados de *Enterococcus* sp provenientes de corpos d'água apresentam potencial remediador de metais tóxicos, chumbo, cromo e zinco e *Enterococcus lactis* pode apresentar resistência ao metal chumbo.

Com base nos resultados obtidos, todos os isolados foram capazes de tolerar a concentrações elevadas de metais tóxicos. Isso nos mostra que as espécies bacterianas isoladas do ambiente aquático nesse estudo podem ser utilizadas como ferramenta para a biorremediação em tratamento de áreas contaminadas com os metais chumbo, zinco e cromo.

CONCLUSÃO GERAL

Por meio desse estudo, foi possível selecionar e identificar isolados provenientes de ambientes aquáticos com resistência aos metais chumbo, cobre, cromo e zinco.

Um total de 7 isolados apresentaram genes de resistência ao metal cobre.

Os isolados não apresentaram resistência a antimicrobianos, sendo estes sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados.

Foi possível avaliar a concentração inibitória mínima de crescimento bacteriano em meio de cultura líquida e sólida contendo os metais chumbo, cobre, cromo e zinco. A maioria apresentou crescimento na presença desses metais tanto em concentrações de metais quanto em temperaturas diferentes.

Destaca-se os isolados IS01, IS02 e EL03 para o metal cobre; e os isolados EL03 e EC07 apresentaram maior resistência para o metal chumbo, cromo e zinco quando incubados a 28°C.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. Z.; AHMAD, S.; MALIK, A. Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil. **Environmental Monitoring Assesss**, v. 178, n.1, p. 281-291, 2011.
- AKTAN, Y.; TAN, S.; ICGEN, B. Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 6, p. 5285-5293, 2013
- BANERJEE, G.; PANDEY, S.; RAY, A. K.; KUMAR, R. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. **Water Air Soil Pollut.** v.266, n.4, p.91, 2015.
- BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; MIERZWA, J. C.; BARROS, M. T L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução a Engenharia Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.
- 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: 13 de dez.2017.
- BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.
- BROWN, N. L.; BARRETT, S. R.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T.O.; ROUCH, D. A. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. **Molecular microbiology**, v. 17, n. 6, p. 1153-1166, 1995.
- CHOUDHURY, R.; SRIVASTAVA, S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. **Current Science**, p. 768-775, 2001.
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing**. Approved standard M100 – S24. v. 34, n. 1, 2014.
- DA SILVA, V. L.; CAÇADOR, N. C.; DA SILVA, C. D. S. F.; 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, n. 2, p. 179-185, 2012.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – an overview. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 7, p. 159-169, 2008.

DENG, W.; QUAN, Y.; YANG, S.; GUO, L.; ZHANG, X.; LIU, S.; GU, Y. Antibiotic Resistance in Salmonella from Retail Foods of Animal Origin and Its Association with Disinfectant and Heavy Metal Resistance. **Microbial Drug Resistance**, 2017.

DIAZ-RAVINA, M.; BAATH, E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2970-2977, 1996

DI CESARE, A.; ECKERT, E.; CORNO, G. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. **Journal of Limnology**, v. 75, n. s2, 2016.

FARD, R. M. N.; HEUZENROEDER, M. W.; BARTON, M. D. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. **Veterinary microbiology**, v. 148, n. 2-4, p. 276-282, 2011.

FILALI, B. K.; TAOUFIK, J.; ZEROUAL, Y.; DZAIRI, F. Z.; TALBI, M.; BLAGHEN, M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. **Current microbiology**, v. 41, n. 3, p. 151-156, 2000.

FRANCO, M.M.; TAKATSU, A. Sensitivity of Xanthomonas axonopodis pv. Passiflorae to copper. **Bioscience Journal**, v 20, n2; p207-210, 2004.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. **Journal of environmental management**, v. 92, n. 3, p. 407-418, 2011.

GADD, G. M. Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. **Applied Microbiology**, p. 321 – 334, 2009.

GAUTAM, P. K.; GAUTAM, R. K.; BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAYA, M. C.; PANDEY, J. D. Heavy metals in the environment: fate, transport, toxicity and remediation Technologies. **Nova Science Publishers**, 2016.

GEOROPOULOS, P. G.; ROY, A.; YONONE-LIOY, M.J.; OPIEKUN, R.E.; LIOY, P.J. Copper: Environmental dynamics and human exposure issues. **The International Copper Association, Environmental and Occupational Health Sciences Institute (EOHSI), Piscataway, NJ**, p. 81-107, 2001.

GUO, H.; LUO, S.; CHEN, L.; XIAO, X.; XI, Q.; WEI, W.; HE, Y. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium Bacillus sp. L14. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8599-8605, 2010.

HALTTUNEN, T.; SALMINEN, S.; TAHVONEN, R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 114, n. 1, p. 30-35, 2007.

HASMAN, H.; KEMPF, I.; CHIDAINE, B.; CARIOLET, R.; ERSBOLL, A. K.; HOUE, H.; HANSEN, H. C. B.; 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**, v.72, n.9, p. 5784-5789, 2006.

HASMAN, H.; 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.

HAROUN, A. A.; KAMALUDEEN, K.K.; ALHAJI, L.; MAGAJI, Y.; OALKHENA, E.E. Evaluation of Heavy Metal Tolerance Level (MIC) and Bioremediation Potentials of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Makera-Kakuri Industrial Drain in Kaduna, Nigeria. **European Journal of Experimental Biology**, v. 7, n. 5, p. 28, 2017.

HORNINK, K. R. **Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre**. Tese(Doutorado) Universidade de São Paulo. 2015.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60-72, 2014.

JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **Journal of industrial microbiology**, v. 14, n. 2, p. 61-75, 1995.

SONI, R.K.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; ACHARYA, P. B. Decolorization, Degradation and Subsequent Toxicity Assessment of Reactive Red 35 by *Enterococcus gallinarum*. **Current Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 325-336, 2016.

KANG, C.H.; KWON, Y.J.; SO, J.S. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. **Ecological Engineering**, v. 89, p. 64–69, 2016.

KAR, D.; SUR, P.; MANDAI, S. K.; SAHA, T.; KOLE, R. K. Assessment of heavy metal pollution in surface water. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 119–124, 2008.

KIMIRAN - ERDEM, A.; ARSLAN, E. O.; YURUDU, N. O. S.; ZEYBEK, Z.; DOGRUOZ, N.; COTUK, A. Isolation and Identification of Enterococci from Seawater Samples: Assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. **Environmental Monitoring Assesss**, v. 125, n. 1-3 p.219-228, 2007.

LEEDJÄRV, A.; IVASK, A.; VIRTALA, M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2680-2689, 2008.

LIMCHAROENSUK, T., SOOKSAWAT, N., SUMARNROTE, A., AWUTPET, T., KRUATRACHUE, M., POKETHITIYOOK, P., & AUESUKAREE, C.. Bioaccumulation and biosorption of Cd 2+ and Zn 2+ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 322-330, 2015.

LU, W.B.; SHI, J.J.; WANG, C.H.; CHANG, J.S. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. **Journal of hazardous materials**, v. 134, n. 1, p. 80-86, 2006.

MAGNANI, D.; SOLIOZ, M. Copper Chaperone Cycling and Degradation in the Regulation of the Cop Operon of *Enterococcus hirae*. **Biometals**, v. 18, n. 4, p. 407-412, 2005.

MARQUES, E. B. D.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1069-73, Nov 2004.

MATYAR, F.; KAYA, A.; DINÇER, S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. **Science of the total environment**. v. 407, n. 1 p. 279-285, 2008.

MATYAR, F.; AKKAN, T.; UÇAK, Y.; ERASLAN, B. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Oskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environmental Monitoring Assess**, v. 167, n.1, p. 309-320, 2010.

MENDOZA, M. G.; ALE, C.E.; NADER-MACIAS, M.E.F.; PASTERIS, S.E. Characterization of a Bacteriocin Produced by *Enterococcus gallinarum* CRL 1826 Isolated from Captive Bullfrog: Evaluation of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* and Gram-Negatives. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 8, p. 1, 2015.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process—a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1389-1416, 2013

MORAIS, S.; GARCIA E COSTA, F.; PEREIRA, M. L. Heavy metals and human health. **Environmental Health - Emerging Issues and Practice**. p. 227–246, 2012.

MUSTAPHA, M. U.; HALIMOON, N. Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 33-37, 2015.

NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 98, p. 1-7, 2013.

NAMI, Y.; HAGSHENAS, B.; HAGSHENAS, M.; ABDULLAH, N.; KHOSROUSHAHI, A. The prophylactic effect of probiotic *Enterococcus lactis* IW5 against different human cancer cells. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1317, 2015.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 730- 750, 1999.

NIES, Di. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 313-339, 2003.

ORELL, A.; NAVARRO, C. A.; ARANCIBIA, R.; MOBAREC, J. C.; JEREZ, C. A. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. **Biotechnology Advances**. v. 28,n. 6, p. 839-848, 2010.

OVES, M.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. **Saudi journal of biological sciences**, v. 20, n. 2, p. 121-129, 2013.

PASQUAROLI, S.; DI CESARE, A.; VIGNAROLI, C.; CONTI, G.; CITTERIO, B.; BIAVASCO, F. Erythromycin-and copper-resistant *Enterococcus hirae* from marine sediment and co-transfer of *erm* (B) and *tcrB* to human *Enterococcus faecalis*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 80, n. 1, p. 26-28, 2014.

QUINÁGLIA, G. A. **Caracterização dos Níveis Basais de Concentração de Metais nos Sedimentos Estuarino da Baixada Santista**. 2006. 269 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RAHMAN, Z.; SINGH, V. P. Assessment of heavy metal contamination and Hg-resistant bacteria in surface water from different regions of Delhi, India. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2016.

REZAEI, H. Biosorption of chromium by using *Spirulina* sp. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 846-853, 2016.

ROANE, T. M.; RESING, C.; PEPPER, I. L.; MAIER, R. M. Microorganisms and Metal Pollutants. In: **Environmental Microbiology**. p. 421-441, 2009.

ŞAHİN, Y.; ÖZTÜRK, A. Biosorption of chromium (VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1895-1901, 2005.

SELVI, A. T.; DEVI, R. A.; MADHAN, B.; KANNAPPAN, S.; CHANDRASEKARAN, B. Isolation and characterization of bacteria from tannery effluent treatment plant and their tolerance to heavy metals and antibiotics. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 34-41, 2012.

SHARMA, S.; CHATURVEDI, J.; CHAUDHARI, B. P.; SINGH, R. L.; KAKKAR, P. Probiotic *Enterococcus lactis* IITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2012.

SINGH, R.; GAUTAM, N.; MISHRA, A.; GUPTA, R. Heavy metals and living systems: an overview. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 246, 2011.

SU, Po-Yi P.; MILLER, S.; RUTISHAUSER, R. L.; BABIK, J. Broad-range PCR for early diagnosis of nosocomial *Enterococcus gallinarum* meningitis. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 8, p. 640-642, 2016.

SUNDARI, N. S. Characterization of chromium bioremediation by *Stenotrophomonas maltophilia* SRS 05 isolated from tannery effluent. **International Research Journal of Engineering and Technology**. v. 4, n. 2, p. 403-429, 2017.

SZYBALSKI, W.; BRYSON, V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. **Microbial cross resistance to toxic agentes**. v. 64, p. 489-499, 1952

TEEMU, H.; SEPPO, S.; JUSSI, M.; RAIJA, T.; KALLE, L. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. **International journal of food microbiology**, v. 125, n. 2, p. 170-175, 2008.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade da água e ao tratamento de esgoto**. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; UFMG, 2005. 452 p.

WANG, P.; LI, X.; XIANG, M.; ZHAI, Q. Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 103, n. 6, p. 563 – 567, 2007.

WIEGAND, I; HILPERT, K; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**. v.3, n. 2, p.163-175, 2008.

ZHOU, Y., XU, Y. B., XU, J. X., ZHANG, X. H., XU, S. H., & DU, Q. P. Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p. 2839-2850, 2015.