RESISTÊNCIA A METAIS POR *Enterobacter* sp. UENF18, BACTÉRIA ISOLADA DE UMA PLANTA AQUÁTICA

GLACIELEN RIBEIRO DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO 2021

GLACIELEN RIBEIRO DE SOUZA

RESISTÊNCIA A METAIS POR *Enterobacter* sp. UENF18, BACTÉRIA ISOLADA DE UMA PLANTA AQUÁTICA

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO 2021

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S729 Souza, Glacielen Ribeiro de.

RESISTÊNCIA A METAIS POR Enterobacter sp. UENF18, BACTÉRIA ISOLADA DE UMA PLANTA AQUÁTICA / Glacielen Ribeiro de Souza. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

64 f. : il.
Bibliografia: 48 - 60.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.
Orientadora: Aline Chaves Intorne.

1. Bactéria resistente . 2. Cádmio. 3. Cobre. 4. Biofilme. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD- 660.6

GLACIELEN RIBEIRO DE SOUZA

RESISTÊNCIA A METAIS POR *Enterobacter* sp. UENF18, BACTÉRIA ISOLADA DE UMA PLANTA AQUÁTICA

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

Aprovada em 24 de fevereiro de 2021

Banca Avaliadora:

DSc. Aline Chaves Intorne (orientadora)
Doutorado em Biociências e Biotecnologia - UENF
Instituto Federal do Rio de Janeiro

DSc. Edésio José Tenório de Melo
Doutorado em Ciências Biológicas - UFRJ
Universidade Estadual do Norte Fluminense

DSc. Cibele Maria Stivanin de Almeida
Doutorado em Química – PUC-Rio
Universidade Estadual do Norte Fluminense

DSc. Rachel Ann Hauser-Davis
Doutorado em Ciências - Química – PUC-Rio
Fundação Oswaldo Cruz

Esta Dissertação é dedicada à minha família, pessoas mais importantes da minha vida. Em especial, aos meus pais que me apoiam constantemente.

AGRADECIMENTO

A Deus por me dar forças para seguir em frente nas horas mais difíceis e por todas as bênçãos recebidas;

Aos meus pais, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza e Nilton Costa de Souza, por todo apoio, incentivo, por serem meu alicerce e me amarem incondicionalmente;

Ao meu irmão por ser meu amigo e companheiro à distância;

À toda minha família por torcerem tanto por mim;

À minha orientadora, Aline Intorne, pelo acolhimento, incentivo, conselhos valiosos, oportunidades, parceria e confiança;

Ao professor Edésio pela parceria, ideias instigantes e pela colaboração nos ensaios de microscopia;

À professora Marília pela colaboração nos ensaios de cinética;

Aos membros da banca, DSc. Edésio José Tenório de Melo, DSc. Cibele Maria Stivanin de Almeida e a DSc. Rachel Ann Hauser-Davis, por terem aceitado prontamente o convite;

À Georgia Bechara Mothé por acreditar e confiar em mim;

À minhas companheiras de jornada, Gabriela Petroceli, Mariana Miranda e Moara Cardoso, pelo carinho e momentos de descontração;

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

Aos professores, técnicos e colegas do LFBM e LBT;

Á todos que contribuíram direta ou indiretamente para eu estar aqui hoje;

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro;

À UENF pela estrutura e pela concessão da bolsa de estudos, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de realizar o mestrado.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA iv
AGRADECIMENTO v
LISTA DE FIGURA vii
LISTA DE TABELA viii
RESUMO ix
ABSTRACT x

1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1. Contaminação de ambiente aquático 13
2.2. Metais contaminantes 14
2.2.1. O cobre e o cádmio 16
2.3. Resistência a cobre e cádmio por *Enterobacter* 18
3. OBJETIVOS 22
4. METODOLOGIA 23
4.1. Material biológico, condições de cultivo e preparo do inóculo 23
4.2. Preparo das soluções estoques de metais 24
4.3. Ensaio de concentração inibitória mínima 24
4.4. Cinética de crescimento 24
4.5. Microscopia Óptica 26
4.6. Produção de biofilme 26
4.7. Análises estatísticas 27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
5.1. A multiresistência a metais em *Enterobacter* sp. UENF18 28
5.2. Efeito de cobre no crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18 33
5.3. Cobre influência os efeitos de cádmio em *Enterobacter* sp. UENF18 36
5.4. Morfologia de Enterobacter sp. UENF18 em soluções simples e binária de Cu-Cd .. 44
6. CONCLUSÃO 47
7. REFERÊNCIAS 48
8. APÊNDICE A 61
9. APÊNDICE B 62
10. APÊNDICE C 63
11. APÊNDICE D 64
12. APÊNDICE E 64

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de resistência a metais em bactéria.. 19
Figura 2: Modelo de maturação de biofilme bacteriano.. 20
Figura 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de metais em *Enterobacter* sp. UENF18. . 29
Figura 4: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 na presença de Cu.. 33
Figura 5: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 na presença de Cu e pH ajustado.. 36
Figura 6: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 em soluções simples e binária.. 37
Figura 7: Número de indivíduos em função do tempo em sistema simples e binário..... 39
Figura 8: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 na presença de Cd.. 40
Figura 9: Formação de biofilme por Enterobacter sp. UENF18 em resposta ao estresse do metal..... 42
Figura 10: Produção de biofilme por Enterobacter sp. UENF18 sob estresse por metal.. ... 43
Figura 11: Observações microscópicas de Enterobacter sp. UENF18 em diferentes tempos de cultivo na presença e ausência de Cu e Cd.. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de *Enterobacter* resistentes a cobre e cádmio. 21
Tabela 2: Composição do meio de cultivo LB.. 23
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de Cd e Cu em *Enterobacter*. 32
Tabela 4: pH do meio de cultivo, inicial e final, com a adição do metal Cu. 35
Tabela 5: Quantificação do crescimento celular de *Enterobacter* sp. UENF18 em soluções simples e binária no tempo final (T_f) de cultivo. 38
Tabela 6: Concentração de Cu e Cd permitida pelas legislações. 46

RESUMO

Com o progresso da indústria e da agricultura, e o aumento da população, a contaminação aquática por metais tornou-se uma preocupação mundial. Isso porque o excesso desses elementos biodisponíveis pode gerar danos à saúde humana e ao equilíbrio dos ecossistemas. Bactérias do gênero *Enterobacter* têm demonstrado resistência e capacidade de bioremediar ambientes contaminados com vários metais, como cádmio (Cd), cobre (Cu) e chumbo (Pb). Recentemente, foi descrito que a cepa *Enterobacter* sp. UENF18 isolada da planta aquática *Salvinia auriculata* resistiu a altas concentrações de Cu. Nesse sentido, o presente trabalho dedicou-se a explorar a resistência de *Enterobacter* sp. UENF18 a metais, com ênfase na ação conjunta de cobre e cádmio. Para tanto, foi avaliada a concentração inibitória mínima de cádmio, cobalto, ferro e zinco para a bactéria *Enterobacter* sp. UENF18, utilizando $CdCl_2.H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$ e $ZnCl_2$ em placas de Petri com meio LB. Em seguida, foi realizado o estudo da cinética desta cepa sob condições de estresse com cobre. A bactéria foi cultivada em meio LB líquido com concentrações crescentes de $CuCl_2.2H_2O$ (600 a 1000 mg L^{-1}) a 30 ºC e 160 rpm por 16 h, em incubadora orbital. Foi aferido pH inicial e final da cultura. Além do cobre, foi avaliada a resposta da bactéria a soluções simples e binárias de Cu-Cd. Também foi verificada a produção de biofilme nos diferentes tratamentos, usando lã de vidro. Para identificar possíveis alterações morfológicas induzidas pelos metais, foi realizado ensaio de Microscopia Óptica das células. Como resultado, a cepa UENF18 foi resistente a altas concentrações dos metais testados, visto que a CIM compreendeu os valores de 150 mg L^{-1} de Co, 500 mg L^{-1} de Cd, 770 mg L^{-1} de Zn e 3000 mg L^{-1} de Fe. As colônias apresentaram mudanças morfológicas quando expostas a altas concentrações dos metais, destacando-se a redução no diâmetro e mudança na pigmentação. Os resultados de cinética mostraram que a cepa é muito resistente ao metal, mesmo em meio ácido. Os dados sugerem que o cobre antagonizou os efeitos tóxicos do cádmio, possibilitando o crescimento de células na solução binária Cu-Cd, sendo que nessa condição a formação de biofilme foi estimulada, possivelmente como estratégia para proteger as células e/ou quelar os metais em excesso. Dessa forma, foi possível verificar que *Enterobacter* sp. UENF18 possui mecanismos elaborados atuando na sobrevivência em elevadas concentrações de metais com potencial biotecnológico para remediação ambiental.

Palavras-chave: Bactéria resistente, cádmio, cobre, biofilme.

ABSTRACT

With the progress of industry and agriculture, and the increase in population, aquatic contamination by metals has become a worldwide concern. This is because the excess of bioavailable elements can cause damage to human health and the balance of ecosystems. Bacteria belonging to the Enterobacter genus are resistant and capable of bioremediating environments contaminated with various metals, such as cadmium (Cd), copper (Cu) and lead (Pb). Recently, the Enterobacter sp. UENF18 isolated from the aquatic plant Salvinia auriculata resisted high Cu measurements. In this sense, the present work was dedicated to exploring the resistance of Enterobacter sp. UENF18 to metals, with an emphasis on the joint action of copper and cadmium. For this purpose, the minimum inhibitory concentration of cadmium, cobalt, iron and zinc was evaluated for an Enterobacter sp. UENF18, using $CdCl_2.H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$ and $ZnCl_2$ in Petri dishes with LB medium. Then, the study of the kinetics of this strain was carried out under copper stress conditions. A bacterium was grown in liquid LB medium with increasing requirements for $CuCl_2.2H_2O$ (600 to 1000 mg L^{-1}) at 30 ºC and 160 rpm for 16 h, in an orbital incubator. Initial and final pH of the culture was measured. In addition to copper, the bacterial response to simple and binary Cu-Cd solutions was evaluated. The production of biofilm in the different treatments was also verified, using glass wool. To identify possible morphological changes induced by metals, an Optical Microscopy test was performed on the cells. As a result, strain UENF18 was resistant to the highs of the metals tested, as the MIC comprised the values of 150 mg L^{-1} of Co, 500 mg L^{-1} of Cd, 770 mg L^{-1} of Zn and 3000 mg L^{-1} of Fe. As colonies morphological changes when exposed to high specifications of metals, the reduction in diameter and the change in pigmentation stand out. The results of indistinct kinetics that the strain is very resistant to metal, even in acidic medium. The data obtained that copper antagonized the toxic effects of cadmium, enabling the growth of cells in the Cu-Cd binary solution, in which case the formation of biofilm was stimulated, possibly as a strategy to protect the cells and / or chelate the metals in excess. Thus, it was possible to verify that Enterobacter sp. UENF18 has equipment designed to give priority to high metal services with biotechnological potential for environmental remediation.

Keywords: Resistant bacteria, cadmium, copper, biofilm.

1. INTRODUÇÃO

Os metais são elementos químicos e alguns são necessários à vida. Entretanto, as múltiplas aplicações em processos e produtos industriais e na agricultura aumentaram a sua disponibilidade na biosfera, levantando preocupações sobre os efeitos negativos na saúde humana e no meio ambiente (JAIN et al., 2020; MISHRA et al., 2019). Muitos metais são oligoelementos (micronutrientes) para os seres vivos, mas em altas concentrações, eles podem ser tóxicos para plantas, animais e microrganismos (TCHOUNWOU et al., 2012). Os metais diferem de outros agentes tóxicos porque não podem ser degradados, o que constitui uma ameaça quando biodisponíveis, principalmente, em virtude da possível bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica (ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; ALI; KHAN, 2018; KABUTEY et al., 2019).

Existem diversos métodos físico-químicos para tratar a contaminação por metais em água, como osmose reversa, precipitação química e filtração por membrana. Todavia, estes processos são onerosos e podem trazer mais contaminação ao ambiente ao gerar subprodutos (HASSAN et al., 2017; ULLAH et al., 2015). Nesse sentido, o uso de plantas para mitigar danos causados pelo excesso de metais, chamado de fitorremediação, proporciona benefícios quanto ao acúmulo desses elementos encontrados na água, e por apresentar maior viabilidade econômica e socioambiental em relação aos tratamentos convencionais (FAVAS et al., 2016; RATHOURE, 2020). É válido destacar, que o sucesso da fitorremediação também está relacionado aos microrganismos associados à planta, que promovem o crescimento vegetal e ajudam na resposta ao estresse, realizando processos biológicos essenciais, como a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fitormônios (DUTTA et al., 2018).

Ao longo da evolução, diversos mecanismos de resistência se desenvolveram em bactérias, que atenuam a toxicidade causada pela presença de metais no ambiente (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016). São transportadores de efluxo de nutrientes, a produção de biofilme, entre outras características que precisam de um melhor entendimento para realizar a fitorremediação efetiva de ambientes contaminados (CHEN et al., 2016a).

Enterobacter é um gênero composto de bactérias anaeróbicas facultativas Gram-negativas, que podem estar associadas a diversas espécies vegetais e nichos ecológicos (SANDERS; SANDERS, 1997). Estudos relatam que algumas espécies do gênero possuem características promotoras do crescimento vegetal, como *Enterobacter cloacae* (ANDRÉS-BARRAO et al., 2017; CHEN et al., 2016a; REMANS et al., 2012). Algumas dessas características compreendem a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes, biocontrole de fitopatógenos, produção de fitormônios e sideróforos (COCOZZA et al., 2014; FATNASSI et al., 2013; GLICK, 2010; PŁOCINICZAK et al., 2019).

Estudos mostram que algumas cepas de *Enterobacter* sp. são capazes de crescer na presença de elevadas concentrações de metais, como Cádmio (Cd), Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) (JIANG et al., 2019; LU et al., 2006; SUN et al., 2020a). Por exemplo, recentemente, Silva (2019) isolou bactérias da planta aquática *S. auriculata* e encontrou uma cepa capaz de fixar nitrogênio, produzir compostos indólicos, solubilizar nutrientes e resistir ao Cu. Quando a bactéria foi inoculada na planta, os dados mostraram a promoção do crescimento vegetal com ganho de biomassa fresca (51%). Na presença de 0,01 mmol L^{-1} (1,7 mg L^{-1}) de cobre ($CuSO_4$), a bactéria aparenta ter protegido a planta, mantendo o crescimento vegetal. Neste sentido, o presente trabalho dedicou-se a explorar a resistência de *Enterobacter* sp. UENF18 aos metais cobre, cádmio, cobalto, ferro e zinco, com ênfase na ação de cobre e cádmio, concomitantemente, no crescimento da cepa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminação de ambiente aquático

A água cobre, aproximadamente, 70% o planeta. Encontrada principalmente no estado líquido, constitui um recurso natural renovável por meio do ciclo hidrológico (JOSEPH et al., 2019). Todavia, o crescimento populacional humano e o avanço da urbanização desordenada vêm pressionando os estoques de água doce por meio de uma maior demanda hídrica nas cidades (LIU et al., 2017). Nos últimos 100 anos, a demanda humana de água aumentou quase 6 vezes (WADA et al., 2016) e continua a crescer constantemente a uma taxa de 1% ao ano (UNESCO, 2020). Estima-se que a utilização de água no planeta aumentará 55% até 2050 (OECD, 2012).

Aliado a limitação do recurso hídrico, o comprometimento da qualidade da água é um fator que aflige a humanidade. Quase 80% da população mundial está exposta a altos níveis de ameaça à segurança da água (VÖRÖSMARTY et al., 2010; WHEATER, 2019). Consequentemente, a água é um dos elementos-chave dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, por si só ou interligada com diferentes aspectos. 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 (WHO, 2017).

De acordo com as informações do banco de dados da FAO AQUASTAT (do inglês, *Food and Agriculture Organization*), 56% da água coletada anualmente no planeta são liberadas como águas residuais, incluindo drenagens agrícolas e efluentes. No geral, 80% dessas águas residuais são lançadas *in natura* nos corpos hídricos (EGEA-CORBACHO; GUTIÉRREZ; QUIROGA, 2019), causando a morte de cerca de 14 mil pessoas diariamente (BOLISETTY; PEYDAYESH; MEZZENGA, 2019). Dessa forma, é esperado que mais de 240 milhões de pessoas não tenham acesso a uma fonte de água segura até 2050 (OECD, 2012) e 40% da população mundial viverá sob forte estresse hídrico (UNESCO, 2020). Inclusive no Brasil, o relatório projeta uma severa seca, principalmente, no nordeste, centro-oeste e sudeste.

Dentre as substâncias encontradas na água destacam-se os metais, que devido às atividades antropogênicas contaminaram ou tiveram suas concentrações aumentadas nos ecossistemas de água doce (JOSEPH et al., 2019). Os efluentes domésticos e industriais são as principais fontes desses contaminantes que reduzem a qualidade das águas (FLÖRKE et al., 2013). Com isso, projetos e propostas inovadoras para remediação de tais ambientes têm surgido e atraído interesse, como as Soluções Baseadas na Natureza (do inglês, *Nature-Based Solutions* - NBS) (IWA, 2019; ORAL et al., 2020). Assim, a biorremediação tem grande potencial para tratar efluentes de forma que atenda os requisitos do desenvolvimento sustentável, fornecendo simultaneamente benefícios ao bem-estar humano e à biodiversidade.

2.2. Metais contaminantes

Os metais são liberados no ambiente por meio de fontes geogênicas, como o intemperismo e atividade vulcânica, e antropogênicas decorrentes da mineração e indústria de galvanoplastia, dentre outros (GALL; BOYD; RAJAKARUNA, 2015). Estes elementos respondem pela maior parte da tabela periódica, totalizando 91 metais descritos. No âmbito biológico, são classificados como essenciais (Cu, Zn, Fe) e não essenciais (Cd, Hg, Pb). No entanto, qualquer um desses elementos em quantidades excessivas é um contaminante e pode deteriorar gravemente os ecossistemas aquáticos (MISHRA et al., 2019). Assim, apesar de alguns metais serem essenciais para funções biológicas, atuando como cofatores enzimáticos, por exemplo (ZORODDU et al., 2019), o seu acúmulo pode gerar efeitos indesejáveis, como danos ao DNA e estresse oxidativo (ALI; KHAN, 2018).

Metais como cobre, cádmio, cromo (Cr), zinco (Zn), chumbo e mercúrio (Hg) são frequentemente encontrados em reservatórios de água doce (AZIMI et al., 2017). Com o desenvolvimento industrial, a biodisponibilidade desses elementos foi aumentada (SILVA; GOUVEIA, 2020). O setor agrícola também contribui com o aporte de compostos metálicos por meio do uso excessivo de pesticidas, fungicidas, herbicidas e fertilizantes químicos, principalmente, fertilizantes de fósforo (LI et al., 2019), que possuem em sua composição metais, incluindo o cobre (BIELMYER-FRASER et al., 2017; DAS; GOSWAMI, 2016; KHAN et al., 2019) e o cádmio (ALI;

KHAN, 2018; GRANT, 2011). Os efluentes domésticos não tratados agravam a poluição (MUSHTAQ et al., 2020).

Neste cenário, um fator agravante são as influências desfavoráveis das mudanças climáticas, que devido à escassez de água, têm levado as sociedades a reciclarem águas residuais sem precauções sanitárias satisfatórias (RASHEED et al., 2019). A reutilização da água recuperada requer a obtenção de água com qualidade mínima para cada uso (EGEA-CORBACHO; GUTIÉRREZ; QUIROGA, 2019). Para isso, é necessário desenvolver novas tecnologias para o tratamento de água e a remoção de contaminantes (KAJITVICHYANUKUL; MUSIKAVONG; PHENRAT, 2019).

No Brasil, o rompimento de barragens de mineradoras tem chamado atenção devido à quantidade de rejeitos metálicos liberados abruptamente no ambiente, causando a morte de pessoas e animais. Nos últimos cinco anos, foram dois grandes desastres: a ruptura da Barragem de Mariana (5 de novembro de 2015) e da Barragem de Brumadinho (25 de janeiro de 2019) (ARMADA, 2019).

O desastre ambiental na cidade de Mariana foi o maior do mundo em termos de volume de lama mobilizada e distância percorrida. Foram despejados entre 50 e 60 milhões m^3 de resíduo, que impactaram o rio Doce por 668 km entre os estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Segundo Queiroz et al. (2018) a lama que chegou aos estuários continha muitos metais em sua composição, incluindo 21,3 mg kg^{-1} de Cu. Ao longo da trajetória outros metais como Cd, Cr, Ni, Pb e Zn apresentaram concentrações acima do Nível Limiar Inferior (TEL-NOAA), o limite mínimo que causa danos a organismos vivos (HATJE et al., 2017).

Em Brumadinho, também em Minas Gerais, o rompimento da barragem espalhou 12 milhões m^3 de rejeitos por mais de 46 km, matando 270 pessoas (THOMPSON et al., 2019). Na água, os teores de Fe, Al, Mn, Zn, Cu, Pb, Cd e U foram superiores aos permitidos pela resolução brasileira para águas doce classe I (abastecimento humano após tratamento simplificado), enquanto, nos sedimentos, os níveis de Cr, Ni, Cu e Cd foram superiores às diretrizes de qualidade de sedimentos estabelecidas pela Administração Oceânica e Atmosférica Nacional (TEL-NOAA) (VERGILIO et al., 2020).

2.2.1. O cobre e o cádmio

O cobre (Cu) é o terceiro metal mais utilizado no mundo, ficando atrás apenas do ferro (Fe) e alumínio (Al) (IBRAM, 2012). O Brasil é o 15º país na exploração de Cu (IBRAM, 2012; VASCONCELOS et al., 2018). Este elemento é essencial para plantas, animais e microrganismos; às concentrações excessivas, no entanto, induz uma série de efeitos tóxicos (MISHRA et al., 2019).

O excesso de cobre nas células hepáticas humanas, por exemplo, interrompe a função normal do fígado, diminuindo a taxa de metabolismo dos nutrientes. Também causa nefrite e necrose dos túbulos renais (AMEH; SAYES, 2019). Além disso, pode causar doenças neurodegenerativas (AWUAL, 2017), anemia crônica e até mesmo a morte (SAXENA et al., 2019). Já o cádmio (Cd) não é essencial, sendo tóxico aos seres vivos mesmo em baixa concentração (LI et al., 2018c).

Os alimentos são a principal fonte de exposição ao cádmio em não-fumantes (JÄRUP; ÅKESSON, 2009; RAHIMZADEH et al., 2017; SATARUG et al., 2010). Este elemento se acumula principalmente nos rins e tem uma meia-vida biológica longa, de 10 a 35 anos (WHO, 2017). Nas plantas, o Cd pode causar impactos negativos na absorção e translocação de nutrientes essenciais e na taxa de crescimento (KHAN et al., 2017). Em nível molecular, o Cd causa estresse oxidativo, mudanças epigenéticas na expressão do DNA e interferência competitiva com a ação fisiológica de zinco ou magnésio (BERNHOFT, 2013; MATOVIĆ et al., 2011; WANG et al., 2012; ZHANG; REYNOLDS, 2019). Por isso é considerado o terceiro contaminante de maior perigo para o meio ambiente, depois do mercúrio e do chumbo (ISMAEL et al., 2019).

De acordo com Begg et al. (2015) a produção global de cádmio aumentou mais de 1.000 vezes desde o início do século XX. As principais fontes de contaminação ambiental por Cd são o uso de fertilizantes fosfatados, as atividades industriais, mineração e águas residuais (ALI; KHAN, 2018; KHAN et al., 2017). Estima-se que 83% do cádmio extraído é utilizado, para a produção de baterias, enquanto o restante é empregado em ligas, revestimentos, chapeamento e como estabilizador para plásticos (ZHANG; REYNOLDS, 2019).

No caso do cobre, as principais fontes de contaminação são provenientes do processo produtivo das indústrias de acabamento de metais, galvanoplastia,

plásticos, gravura, madeira, pintura, têxtil, papel, baterias e elétrica, além da agricultura (AL-SAYDEH; EL-NAAS; ZAIDI, 2017; KAMAR; NECHIFOR, 2015). Logo, não só pela mineração, mas também pelos diferentes usos, verifica-se que a contaminação por cobre é crítica, podendo causar danos à saúde humana e animal (AWUAL, 2017; IRAWATI et al., 2016).

Devido ao exposto acima, esses dois metais, cobre e cádmio, são tidos como contaminantes prioritários pela Agência Americana de Proteção Ambiental (GIRI; SINGH; MAHATO, 2019). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução Nº 357/2005, determina que a concentração máxima admissível de Cd é 0,001 mg L^{-1} e de Cu é 0,009 mg L^{-1} , em águas doces de classe I e II. Para as águas de classe III, esse valor pode chegar a 0,013 mg L^{-1} para Cd e 0,01 mg L^{-1} para Cu (BRASIL, 2005). Dessa forma, o tratamento de efluentes deve atender aos parâmetros exigidos para lançamento em cada corpo d'água próximo às indústrias e/ou locais agrícolas que gerem esse tipo de água residual.

Mas é importante destacar que por ser considerado essencial para vários setores econômicos, é esperado que a demanda de cobre aumente substancialmente até 2050 (KUIPERS et al., 2018). Elshkaki et al. (2016) afirmam que a partir de 2050 aumentará até 300% acima dos níveis atuais e, simultaneamente, aumentará também a disposição do contaminante no ambiente (VALENTA et al., 2019). Santos et al. (2019) preveem o aumento em estuários (zonas dinâmicas de transição entre a água do rio e do mar) na ordem de 115% da concentração livre do metal, principalmente, devido a biodisponibilidade do Cu com a diminuição do pH.

Devido à ampla utilização de cobre e cádmio, esses elementos são frequentemente encontrados em ecossistemas aquáticos. No Brasil, pode-se citar a bacia hidrográfica do baixo São Francisco, onde foram detectados em níveis muito elevados, acima das concentrações permitidas pela resolução nacional (SOUZA et al., 2016). Da mesma forma, o Rio Xingu e afluentes apresentaram contaminação por metais na água, sedimento, solo e biota (REGINA et al., 2017). Dos Santos et al. (2020), relatam em seu estudo concentrações de metais, incluindo Cu e Cd, na água do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, acima dos valores de referência estabelecidos pelas regulamentações brasileiras para água doce classe II e internacionais por recomendação da Organização Mundial de Saúde. A

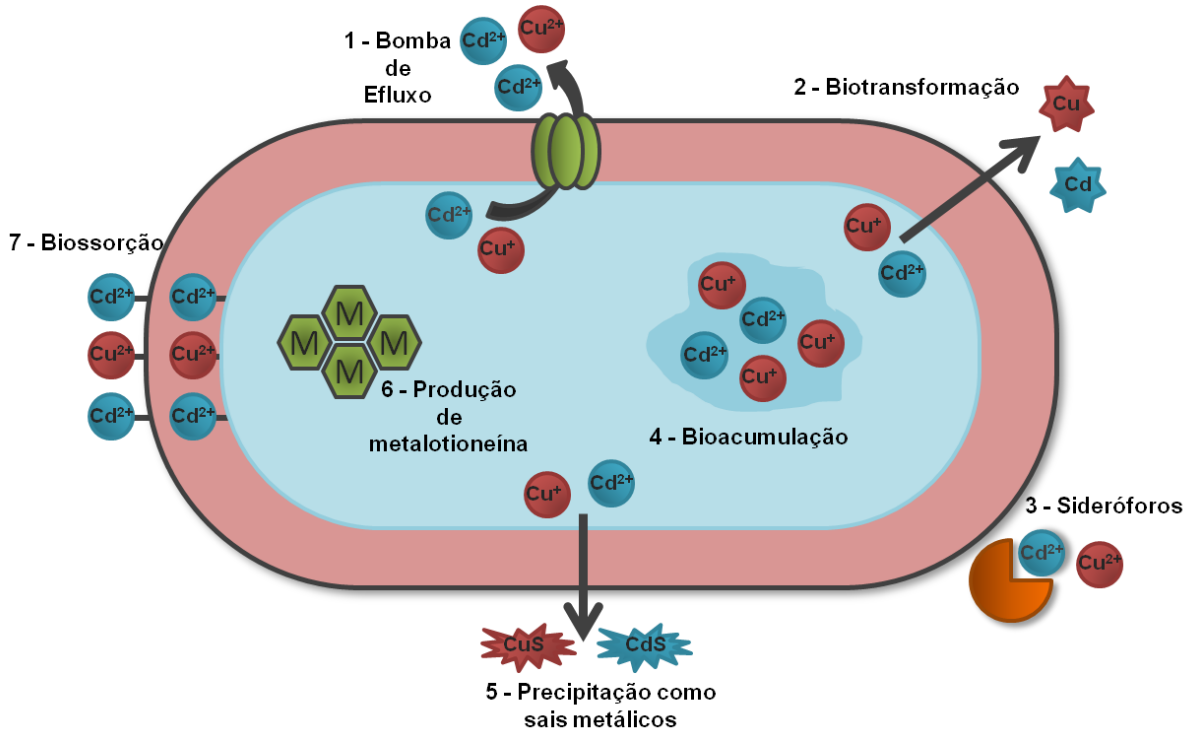
contaminação no Rio Ivinhema foi correlacionada, pelos autores, com atividades antrópicas, o que não é esperado para uma área de conservação ambiental.

2.3. Resistência a cobre e cádmio por *Enterobacter*

As bactérias são um dos membros mais antigos dos sistemas vivos e possuem maior adaptabilidade para prosperar em condições adversas. Elas são conhecidas por se desenvolverem nos mais variados habitats devido ao seu tamanho pequeno e metabolismo diversificado. As bactérias possuem ainda alta relação entre a área de superfície e o volume, com transferência eficiente de características genéticas (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016). Por essas razões, as bactérias dispõem de vários mecanismos de resistência a metais e apresentam potencial para uso em biorremediação (Figura 1).

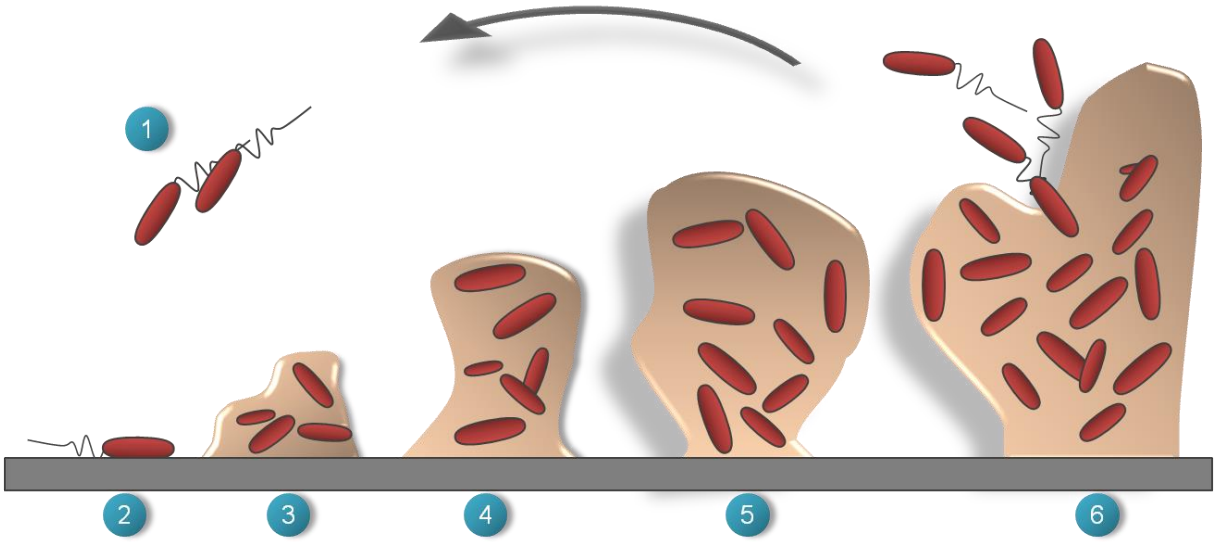
A primeira linha de proteção contra metais é o efluxo desses elementos por proteínas de membrana (CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017; DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016; STEUNOU et al., 2020). Porém, os mecanismos bacterianos relacionados à resistência metálica que podem ser mais facilmente explorados para o desenvolvimento de tecnologias *eco-friendly* de mitigação dos impactos ambientais são outros (GIOVANELLA et al., 2017). Neste caso, são destacados a biossorção (SAHMOUNE, 2018; SARANYA et al., 2018), bioacumulação (LI et al., 2018a; SHARMA; SHUKLA, 2021), biotransformação (EMENIKE et al., 2018; JOBBY et al., 2019), a produção de sideróforos (PATEL; SHAIKH; SAYYED, 2018; SCHWABE et al., 2020) e a formação de biofilmes (GIOVANELLA et al., 2017; MOSHARAF et al., 2018). Autores como Tsekova; Kaimaktchiev e Tzekova (1998) sugerem ainda que a competição interiônica determina o acúmulo seletivo de metais por bactérias e isso difere entre as espécies.

Figura 1: Mecanismos de resistência a metais em bactéria. 1- bombas de efluxo, que expelem o excesso de íons metálicos, como cobre (Cu^{+}) e cádmio (Cd^{2+}), da célula; 2- biotransformação, mediada por reações de oxidação microbiana e redução de metais; 3- produção de sideróforos (moléculas orgânicas que podem quelar e mobilizar vários metais); 4- bioacumulação, que envolve a transferência do metal da matriz contaminada para a biomassa microbiana; 5- precipitação do metal no ambiente; 6- produção de metalotioneína (proteínas ricas em cisteína que podem ligar íons metálicos); 7- biossorção, processo de absorção do metal ou retenção por adsorção. Adaptado de Osman et al. (2019).



Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas aderidas a uma superfície com múltiplos estágios de maturação (Figura 2). A sua adesão é mediada pela produção de uma matriz de exopolissacarídeos secretadas pelas bactérias (EPS) (HARRISON; TURNER; CERI, 2005). Há relatos na literatura que biofilmes são até 65 vezes mais resistentes a metais do que células planctônicas (GRUJIĆ et al., 2017). Nesse sentido, Mosharaf et al. (2018) afirmam que o biofilme protege as células de estresses ambientais adversos. A malha de polissacarídeo se liga aos metais (HULLEBUSCH; ZANDVOORT; LENS, 2003; LI; YU, 2014), mesmo em pH ácido, (FERRIS et al., 1989) aumentando a resistência das cepas e mitigando os efeitos deletérios do excesso de metal.

Figura 2: Modelo de maturação de biofilme bacteriano. 1 – Células bacterianas planctônicas, ou seja, de vida livre. 2- Início da formação do biofilme a partir da adesão da célula à superfície. 3 – Formação de microcolônia e a produção de EPS, que media a fixação das bactérias na superfície e auxilia na formação da estrutura do biofilme. 4 e 5 – Expansão e maturação do biofilme. 6 – Dispersão de células. Fonte: O próprio autor.



Estudos mostram diversas cepas bacterianas resistentes aos metais Cu (CORAL et al., 2005; FERRIS et al., 1989; HOLMES et al., 2009) e Cd (ABBAS et al., 2018; HOLMES et al., 2009; SAEED et al., 2019), como, por exemplo, a cepa *Cupriavidus metallidurans* CH34, que foi isolada em 1976 e se tornou uma bactéria modelo para o estudo de resistência a metais (MERGEAY; HOUDT, 2020). *Enterobacter* também foi descrita como resistente a Cd e formadora de biofilme na presença deste metal (SHARMA; BAROT; ARCHANA, 2020).

Enterobacter são bacilos móveis por flagelos peritricosos, que pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Segundo Ristuccia; Cunha (1985), bactérias *Enterobacter* medem 0,5 a 0,8 µm de largura por 1,0 a 2,0 µm comprimento. O gênero foi descrito pela primeira vez em 1960, mas ao longo dos anos houve mudanças taxonômicas (HORMAECHE; EDWARDS, 1960). Essas bactérias estão associadas a uma variedade de hospedeiros e nichos ecológicos e são encontradas no solo, na água e em associação com plantas e animais (GRIMONT; GRIMONT, 2006; SANDERS; SANDERS, 1997). *Enterobacter* possui um sistema versátil e sofisticado de regulação da permeabilidade da membrana e dispõe de reguladores que podem potencializar ou acelerar a adaptação bacteriana ao estresse ambiental (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019).

Diversos trabalhos descrevem a resistência a Cu e Cd em *Enterobacter* (Tabela 1). Essas bactérias também foram descritas como formadoras de biofilme (MOSHARAF et al., 2018; SHARMA; BAROT; ARCHANA, 2020). *Enterobacter* ludwigii CEB04, por exemplo, apresentou alta capacidade de formar biofilme (SHAFEEQ et al., 2020).

Tabela 1: Cepas de *Enterobacter* resistentes a cobre e cádmio reportados da literatura.

Cepas	Local isolado	Metais	Referências
CGMCC	Solo	Pb e Cd	Jiang et al. (2019)
J1	Água residual industrial	Pb, Cd e Cu	Lu et al. (2006)
SL	Solo	Cr, Zn e Cd	Sun et al. (2020)
CBSB1	Raiz	Cd e Pb	Qiu et al. (2014)
YSU	Água do rio	Hg, Cd, Zn, Cu, Au, Cr, Ag, As e Se	Holmes et al.(2009)
pCBL1	Água residual industrial	Cd, Cr e Pb	Haq; Zaidi; Shakoori (1999)

Estudos de populações de bactérias planctônicas sugerem que os microrganismos sofrem mudanças fisiológicas complexas em resposta às concentrações tóxicas de metais (HARRISON; CERI; TURNER, 2007). Os resultados de Lu et al. (2006), mostraram que a cepa *Enterobacter* sp. J1 foi capaz de adsorver Cd, Cu e Pb em meio ácido. Nessas condições as células apresentaram mudanças morfológicas significativas, por exemplo, a superfície das células carregadas de metal apresentou distorção. Resultados semelhantes foram descritos por Xu et al. (2017), relatando que a cepa *Enterobacter cloacae* TU apresentou depressões e deformações celular ao ser submetida a estresse por Cd. Modificações morfológicas, nanopartículas formadas na superfície da célula, alteração no tamanho e vacuolização no interior das células, também foram relatadas em outros trabalhos com *Enterobacter* (JIANG et al., 2019; SUN et al., 2020a; WANG et al., 2020).

A cepa *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 isolada da planta aquática *S. auriculata* foi descrita como resistente a Cu e apresentou características promotoras do crescimento vegetal (SILVA, 2019). Neste sentido, será interessante entender melhor a resposta da bactéria a metais para explorar informações sobre estratégias para a desintoxicação ou remoção de metal do meio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a cepa *Enterobacter* sp. UENF18, isolada da planta aquática *S. auriculata* quanto a resistência a metais com ênfase nos efeitos após a exposição ao cobre e cádmio concomitantemente.

3.2. Objetivos específicos

A. Determinar a concentração inibitória mínima dos metais cádmio, cobalto, ferro e zinco para *Enterobacter* sp. UENF18;
B. Avaliar a cinética de crescimento da cepa em meio líquido suplementado com diferentes concentrações Cu;
C. Avaliar a influência de uma solução binária, de Cu-Cd no crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18;
D. Avaliar a produção de biofilme pela bactéria em solução simples de Cu e Cd e binária de Cu-Cd;
E. Identificar possíveis modificações na morfologia da célula bacteriana sob estresse com Cu e Cd.

4. METODOLOGIA

4.1. Material biológico, condições de cultivo e preparo do inóculo

A bactéria *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18, renomeada *Enterobacter* sp. UENF18, foi isolada da planta aquática *S. auriculada*, coletada na Lagoa do Jacú entre 21° 43' 33,8" S e 41° 20' 22,4" W, em Campos dos Goytacazes, RJ, (BIZZO et al., 2014; SILVA, 2019). A cepa foi estocada em solução de óleo mineral, a 28 ºC. Para ativação das células, uma alçada (≅ 1µL) da cultura estoque foi inoculada em estrias cruzadas na placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) (Tabela 2). A placa foi incubada por 24 h a 30 °C em estufa bacteriológica (Heraeus Instruments).

Tabela 2: Composição do meio de cultivo LB. Após o preparo, o meio teve o pH ajustado, com NaOH, para 6,0 .

Meio LB				
Reagente	**Concentração ($g\ L^{-1}$)**	**Marca**	**Cidade**	**Pureza**
Triptona	10,0	Kasvi	São José do Pinhais/ Brasil	99%
Extrato de levedura	5,0	Vetec Química Fina Ltda	Duque de Caxias/ Brasil	99,9%
Cloreto de sódio	10,0	Vetec Química Fina Ltda	Duque de Caxias/ Brasil	99%
Glicose	10,0	Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda	Diadema/ Brasil	99,9%
Agar*	15,0	Vetec Química Fina Ltda	Duque de Caxias/ Brasil	99,9%

*Componente adicionado apenas ao meio sólido.

Para o preparo do inóculo, uma alçada da cultura bacteriana de placa fresca foi inoculada em frascos Erlenmeyer com chicana de 250 mL, contendo 50 mL de meio LB. Os frascos foram cobertos com manta feita de algodão e gaze, e incubados por 5 h a 30 °C e 160 rpm em agitador orbital (Shaker SL-222, SOLAB, Piracicaba, Brasil) até atingir a fase logarítmica de crescimento (APÊNDICE A).

Todo o material utilizado para cultivo dos microrganismos foi esterilizado em autoclave vertical (CS-50, PRISMATEC) à 121 °C e 1 atm por 15 min.

4.2. Preparo das soluções estoques de metais

Para os ensaios de estresse com metal, soluções estoque foram preparadas com os sais de grau analítico: cloreto de cobre II ($CuCl_2.2H_2O$), cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$), cloreto cobalto II ($CoCl_2.6H_2O$), cloreto de ferro ($FeCl_3.6H_2O$) e cloreto zinco ($ZnCl_2$), pureza P.A., em água ultra pura (resistividade > 18 MΩ.cm) (ELGA – Purelab Classic, Cotia, Brasil). As soluções foram esterilizadas por filtração com membrana (filtro K18-230 0,22 µm, KASVI) e armazenadas. A partir dessas soluções foram preparados os meios de cultura suplementados com metais. Todos os sais de metais de grau analítico foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Indaiatuba, Brasil.

4.3. Ensaio de concentração inibitória mínima

Para avaliar a resistência da bactéria aos referidos metais, foram realizados ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de uma substância capaz de inibir o crescimento de um organismo (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). Para tanto, 10 µL do inóculo em fase logarítmica de crescimento (*mid-log*) foram transferidos para placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 100, 200, 300, 400 e 500 mg L^{-1} de Cd; 150, 445 e 740 mg L^{-1} de Co, 550, 1350, 2160, 2700 e 3000 mg L^{-1} de Fe e 150, 460 e 770 mg L^{-1} de Zn. As concentrações foram escolhidas a partir de resultados prévios com a cepa e de acordo com a relevância ambiental. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 30 ºC por 5 dias em estufa bacteriológica. Para controle, o crescimento também foi realizado em placas de Petri com meio LB sem adição de metal.

O experimento foi feito em triplicata com pelo menos três experimentos independentes. A CIM de Cu para *Enterobacter* sp. UENF18 já havia sido obtida anteriormente por Silva (2019).

4.4. Cinética de crescimento

Para avaliar o efeito do Cu no crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18, uma alíquota de 5 mL do inóculo foi transferida para frascos Erlenmeyer com chicana de 500 mL, contendo 95 mL de meio LB suplementado com 600, 750, 900 e 1000 mg L^{-1} de Cu, as concentrações forma definidas a partir de ensaios prévios e de relevância ambiental, separadamente. Também foi preparado um frasco sem adição

de Cu para controle. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 30 °C e 160 rpm. O crescimento celular foi monitorado, medindo-se a densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) em intervalos regulares em um espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800, Quioto, Japão) até atingir a fase estacionária. No tempo final, as culturas de cada frasco foram inoculadas em placas de Petri com meio LB controle para avaliar a viabilidade celular após o tratamento com as soluções de Cu.

Para verificar possíveis variações de pH após a adição de Cu, foi aferido o pH inicial da cultura. Confirmada a redução do pH após adicionar as soluções de Cu, foi realizado um novo ensaio com pH inicial ajustado para 6,0 após adição de Cu, com NaOH esterilizado (filtro K18-230 0,22 µm, KASVI). Em seguida, os Erlenmeyers com meio de cultivo foram incubados sob agitação durante 8 h para confirmar a ausência de contaminação e depois foi adicionado o inóculo, realizando-se o experimento como descrito acima. Ao final, foi aferido o pH novamente.

Todos os ensaios de cultivo foram realizados em duplicata com quatro experimentos independentes.

4.5. Ação conjunta de cobre e cádmio

Para o ensaio com solução mista de Cu-Cd, a fim de analisar o efeito do Cu na resistência ao Cd, a cepa foi inoculada em uma solução pura de 600 mg L^{-1} de Cu e 500 mg L^{-1} de Cd, separadamente, e em uma solução binária com 600 mg L^{-1} de Cu + 500 mg L^{-1} de Cd, seguindo o mesmo protocolo descrito no tópico anterior. Neste ensaio, durante o cultivo também foram retiradas amostras para contagem de indivíduos e microscopia. Ao final do ensaio foi definido o peso seco das culturas para confirmar o crescimento celular. Para quantificar o peso seco, 85 mL do meio fermentado de cada tratamento foi centrifugado a 4.700 rpm por 7 min (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e lavado três vezes com água destilada. Em seguida, o material foi colocado para secar em cadinhos em estufa de circulação (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos, Vargem Grande do Sul, Brasil) por 24 h a 85 ºC. Os cadinhos foram então pesados e os valores convertidos em concentração celular (mg L^{-1}).

A partir dos resultados obtidos, foi proposto um novo ensaio para verificar se um tratamento prévio com Cu melhoraria a resistência da cepa a Cd. Neste sentido, o experimento foi montado como descrito acima, começando com o cultivo da cepa

em frascos com meio LB acrescido de 600 mg L^{-1} de Cu e sem adição de Cu (controle) por 6 h. Em seguida, 5 mL de cada cultura foi centrifugada a 4700 rpm por 7 min e os *pellets* foram ressuspensos em novos frascos contendo meio LB com 500 mg L^{-1} de Cd. Então, os frascos foram incubados nas mesmas condições já descritas para avaliar a cinética de crescimento.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata com três experimentos independentes.

4.5. Microscopia Óptica

Para observar possíveis alterações morfológicas e realizar a contagem dos indivíduos, as células sob estresse e controle foram observadas em microscópio óptico (Axiolab Zeiss – objetivas 40 x e 63 x, Alemanha). Para tanto, alíquotas de 1 mL de meio fermentado foram retiradas a cada 4 h nos ensaios de cinética do crescimento. Então, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 6 min (Centrifuge 5418 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 900 uL de solução de formaldeído 37%. Posteriormente, 10 uL da amostra foi espalhada sob uma lâmina e fixada com o kit Coloração de Gram, seguindo as recomendações do fabricante (RENYLAB Química e Farmacêutica, Barbacena - MG, Brasil), para registro da morfologia celular no microscópio óptico. Para contagem de indivíduos, as células foram colocadas em uma câmera de Neubauer e observadas no microscópio óptico.

O ensaio de microscopia foi realizado em colaboração com o Prof^{o}. Edésio José Tenório de Melo no setor de toxicologia celular do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/CBB) da UENF.

4.6. Produção de biofilme

Para quantificar a produção de biofilme em *Enterobacter* sp. UENF18, a cepa foi cultivada sob as mesmas condições do ensaio de cinética, no entanto, em cada Erlenmeyer foi adicionado 0,1 g lã de vidro. Após 28 h de incubação, as lãs foram retiradas e coradas com 2 mL de cristal violeta 0,1% por 30 min. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com 4 mL de água destilada. Logo após, as lãs foram transferidas para frascos de 50 mL contendo 30 mL de Tampão fosfato (TPO_4) 0,05 mol L^{-1} pH 7,2 e incubados, em shaker orbital, por 30 min sob agitação de 100 rpm. Esse procedimento de lavagem foi repetido por duas vezes. Em seguida, as lãs

foram colocadas para secar em estufa a 50 ºC *overnight*. No dia seguinte, foi adicionado 3 mL de etanol 100% nos frascos, lavado e descartado. Novamente, foi adicionado 3 mL de etanol 100%, que foi coletado e utilizado para leitura em espectrofotômetro a 560 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e foi feito um tratamento apenas com a lã de vidro (branco) e o meio de cultura sem a bactéria para controle.

Para registro do biofilme a cepa foi cultivada sob as mesmas condições anteriores em duplicata. Após 28 h de crescimento da bactéria, as lãs de vidro foram coradas com 2 mL de safranina 0,1% por 30 min e lavadas 3 vezes com água destilada. Posteriormente, a lã de vidro foi espalhada em uma lâmina, que foi observada em microscópio óptico para registro das imagens.

4.7. Análises estatísticas

Os resultados apresentados nos gráficos e tabelas representam a média dos experimentos replicados independentes. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 9.0 para avaliar as diferenças significativas entre cada tratamento a um nível de significância de $p < 0,05$.

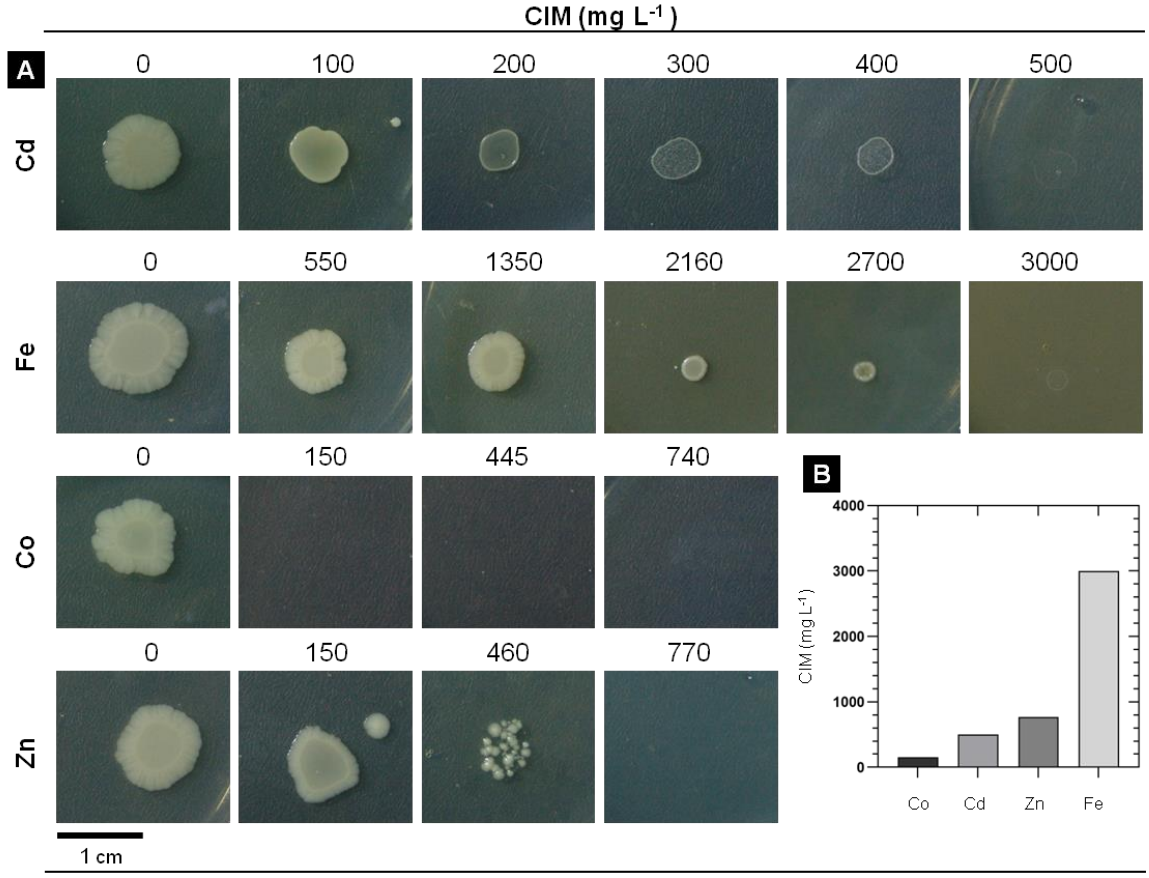
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. A multirresistência a metais em *Enterobacter* sp. UENF18

A cepa *Enterobacter* sp. UENF18 foi isolada dos tecidos da planta aquática *S. auriculata* por Silva (2019). Essa macrófita foi descrita como hiperacumuladora de metais (BIZZO et al., 2014; PANFILI et al., 2017). Dalcorso et al. (2019) afirmam que cepas isoladas de plantas hiperacumuladoras são mais resistentes e têm maior potencial para a biorremediação desses compostos.

Silva (2019) descreveu a cepa *Enterobacter* sp. UENF18 como resistente a Cu ($CuSO_4.5H_2O$), tendo apresentado uma CIM de 9 mmol L^{-1} (≅ 2247 mg L^{-1}) em meio sólido. No cultivo em meio líquido foi verificado crescimento em 1 mmol L^{-1} (≅ 250 mg L^{-1}) após 36 h de incubação. Inicialmente, no presente trabalho, a cepa *Enterobacter* sp. UENF18 foi submetida a ensaio de resistência multimetálica através da análise da CIM. O resultado dessa análise para quatro metais diferentes: Cd, Co, Fe e Zn, é apresentado na Figura 3.

Figura 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de metais em *Enterobacter* sp. UENF18. A- Morfologia da colônia sob estresse por metal. B- Ordem de toxidade dos metais em UENF18.



Como se pode observar, a CIM encontrada para Cd na cepa *Enterobacter* sp. UENF18 foi 500 mg L^{-1}, tendo apresentado formação de colônia até 400 mg L^{-1}. A concentração de Fe que inibiu o crescimento da bactéria foi 3000 mg L^{-1}, de Co foi 150 mg L^{-1} e de Zn foi 770 mg L^{-1}. Com base nos dados obtidos (Figura 3B), a ordem de toxicidade desses metais em *Enterobacter* sp. UENF18 é Co> Cd> Zn> Fe. Dessa forma, Co foi considerado o elemento mais tóxico para a cepa, seguido por Cd e Zn, e o Fe foi o menos tóxico.

Resultado semelhante foi descrito por Subrahmanyam et al. (2018), no qual a cepa *Enterobacter* sp. C1D apresentou baixa resistência ao metal Co em relação aos demais metais testados, os autores não postularam uma hipótese desse comportamento. A CIM encontrada neste caso foi de 10 mg L^{-1}, em meio R2A sólido, ou seja, 15 vezes inferior ao presente trabalho. Os autores encontraram CIM de 750 mg L^{-1} para Zn e 400 mg L^{-1} para Cu. Abedinzadeh; Etesami e Alikhani (2019), também relataram em seu estudo com isolados de milho, que 100% das cepas rizosféricas e endofíticas (incluindo *Enterobacter*) foram sensíveis ao Co - $CoCl_2.6H_2O$ (0,5 mmol L^{-1} ≅ 119 mg L^{-1}), seguido de Cd – $CdCl_2$ (2,5 mmol L^{-1} de

rizosfera e 0,5 mmol L^{-1} as endofíticas ≅ 503/101 mg L^{-1}) e Zn - $ZnCl_2.H_2O$ (3 mmol L^{-1} ≅ 409 mg L^{-1}).

Poucos trabalhos abordam a CIM a Fe em microrganismos. Todavia, é interessante que *Enterobacter* sp. UENF18 apresente uma resistência tão elevada. Por exemplo, a CIM encontrada no presente trabalho é cerca de 2 vezes maior do que a encontrada para *Enterobacter* sp. CTWI-06, cuja CIM foi 1300 mg L^{-1} em meio LB e SLP sólido (PATTNAIK et al., 2020). Por mais que seja um dos elementos mais abundante na crosta terrestre, a biodisponibilidade de Fe é extremamente limitada, havendo competição entre os organismos para assegurar as quantidades necessárias deste micronutriente (CORNELIS; ANDREWS, 2010; NEILANDS, 1981). Dessa forma, uma maior resistência a Fe pode sugerir maior afinidade e captação dos íons deste metal.

As diferenças nas CIMs encontradas para cada metal podem estar relacionadas aos diferentes mecanismos de resistência da cepa. Silva et al. (2012) afirmam que dependendo do metal as respostas podem ser distintas na bactéria, isso se dá devido às características estruturais da parede celular, por exemplo.

A cepa cultivada na presença de metais apresentou variações na aparência da colônia e na morfologia em comparação com o controle. Estas mudanças foram mais pronunciadas com o aumento das concentrações de metal, como, por exemplo, redução no diâmetro das colônias. A estrutura dessas colônias também foi alterada quando expostas a Cd e Fe, se tornando mais translúcidas com o aumento da concentração desses metais. Em 100 mg L^{-1} de Cd a colônia também apresentou uma coloração mais amarelada. Enquanto, na presença de Fe foram perdidas as franjas na borda da colônia a partir da concentração de 2160 mg L^{-1}. Já em 460 mg L^{-1} de Zn, as colônias ficaram menores e mais espalhadas.

As modificações morfológicas são comuns para que as células tenham vantagens em ambientes novos ou adversos. De acordo com Sousa et al. (2013), a morfologia da colônia pode ser um importante processo adaptativo ocorrido em bactérias para superar os estressores ambientais. A pigmentação também pode ser uma resposta ao estresse (BABITHA; SOCCOL; PANDEY, 2007). Carotenóides podem ser produzidos como uma resposta antioxidante para proteger a bactéria (PINTO et al., 2021). Já a despigmentação pode ser resultado da alteração nas propriedades eletrônicas de moléculas que são a fonte da cor, como consequência

da interação coordenada do metal com essas moléculas (AGARWAL; RATHORE; CHAUHAN, 2020).

Os resultados obtidos no ensaio de CIM mostram que a bactéria foi resistente aos metais estudados. Dentre os metais testados no presente trabalho e por Silva (2019), foi considerando que a cepa UENF18 é muito resistente a Cd e Cu. *Enterobacter* sp. UENF18 obteve valores de resistência, em meio sólido, superiores aos observados em outras cepas do mesmo gênero (Tabela 3). Dessa forma, os metais Cd e Cu foram selecionados para analisar o crescimento da cepa em meio líquido e as respostas ao estresse.

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de Cd e Cu em *Enterobacter*.

Cepa	Cd	CIM	Cu	CIM	Meios de cultivo	pH	Temperatura	Referência
***Enterobacter* sp. UENF18**	**$CdCl_2.H_2O$**	**500**	**NA**	**NA**	**LB**	**6,0**	**30 ºC**	**Presente trabalho**
Enterobacter sp. 3.1.3.0.X.18	NA	NA	$CuSO_4.5H_2O$	2247*	DYGS	7,0	30 ºC	Silva (2019)
Enterobacter cloacae R7	$CdCl_2$	503*	$CuCl_2$	426*	MSM	7,2	28 ºC	Abedinzadeh; Etesami e Alikhani (2019)
Enterobacter sp. Zm-123	$CdCl_2.5/2H_2O$	200	$CuSO_4.5H_2O$	100	LB	NR	30 ºC	Zhang et al. (2020)
Enterobacter sp. MN17	$Cd(NO_3)_2$	200	$CuSO_4$	250	TSA	NR	28 ºC	Sabir et al. (2020)
Enterobacter ludwigii NSX1	$CdCl_2$	50	$CuCl_2$	0	SLP	7,2	28 ºC	Liu et al. (2015)
Enterobacter cancerogenus NSE2	$CdCl_2$	150	$CuCl_2$	0	SLP	7,2	28 ºC	Liu et al. (2015)
Enterobacter ludwigii NCR3	$CdCl_2$	50	$CuCl_2$	150	SLP	7,2	28 ºC	Liu et al. (2015)
Enterobacter ludwigii LCR9	$CdCl_2$	20	$CuCl_2$	100	SLP	7,2	28 ºC	Liu et al. (2015)
Enterobacter sp. DNB-S2	$CdSO_4$	2606*	$CuCl_2.2H_2O$	534*	LB	NR	35 ºC	Sun et al. (2020)

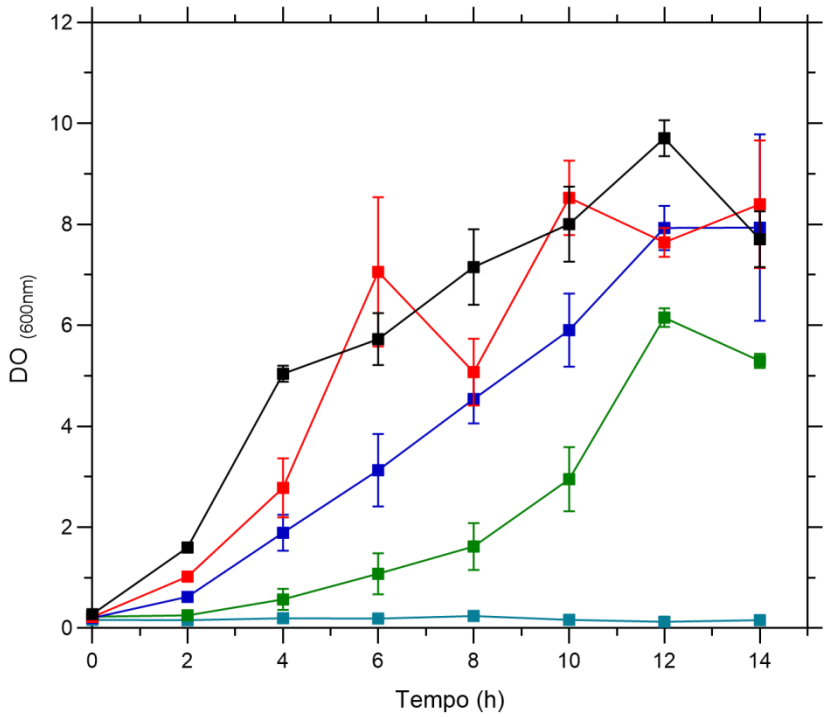
NA – não avaliado, NR – não relatado, * - valor aproximado da conversão de unidades, de acordo com os sais utilizados pelos autores.

5.2. Efeito de cobre no crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18

De acordo com os dados obtidos no ensaio de crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18 em meio líquido com Cu, observou-se um comportamento distinto entre os tratamentos (Figura 4 – APÊNDICE B). As cinéticas de crescimento em meio suplementado com 600 e 750 mg L^{-1} de Cu apresentaram velocidades de crescimento levemente inferiores ao controle (sem adição de Cu), o que pode ser observado pela menor inclinação dessas das curvas, mas ao final do cultivo a produção de células foi similar, obtendo-se $DO_{600} \simeq 8{,}0$ em 14 h.

Na concentração de 900 mg L^{-1} de Cu, a cultura apresentou uma fase lag de 4 h e houve redução do crescimento celular, apresentando $DO_{600} \simeq 5{,}0$ ($p=0{,}0312$) ao final de 14 h. Enquanto a adição de 1000 mg L^{-1} de Cu resultou na inibição do crescimento celular ($p=0{,}0003$). Todavia, quando as células foram inoculadas em placas de Petri ao final do cultivo, elas estavam viáveis.

Figura 4: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 na presença de Cu. Células cultivadas em meio LB na ausência de Cu suplementado (■) ou na presença de: 600 (■), 750 (■), 900 (■) e 1000 mg L^{-1} de Cu (■). Médias seguidas de ± desvio padrão (n=4). As diferenças significativas entre os tratamentos foi realizado de acordo com o teste de Tukey ($p<0{,}05$) . Em relação ao controle, apenas o tratamento com 900 e 1000 mg L^{-1} de Cu apresentaram diferença significativa. Todos os tratamentos, exceto a concentração 1000 mg L^{-1} de Cu, apresentam correlação muito forte com o tempo de acordo com o teste Pearson r (r= ≥ 0,9).



Como ocorreu com *Enterobacter* sp. UENF18, a fase lag em concentrações maiores de Cd também já foi descrita para *Enterobacter* sp. DNB-S2 (SUN et al., 2020a) e *Enterobacter* sp. EG16 (CHEN et al., 2016b), no qual a medida que aumentou a concentração do metal houve aumento da fase de latência. Essa fase de adaptação, ao agente estressor, não foi observada em concentrações inferiores de Cd para *Enterobacter* sp. Zm-123, mas houve redução na quantidade de célula ao final do cultivo (ZHANG et al., 2020). Ma; Rajkumar; Freitas (2009) também observaram fase lag em *Achromobacter xylosoxidans* Ax10 cultivada em 100 e 150 mg L^{-1} de Cu ($CuSO_4$ – LB). Neste trabalho, *A. xylosoxidans* Ax10 foi descrita como uma cepa muito resistente ao Cu, por ter sido isolada de solo de mina contendo altos teores do metal. No entanto, as concentrações testadas e a multiplicação celular (DO≃ 3,0 em 16 h com 50 mg L^{-1} de Cu) foi muito inferior à verificada no presente estudo. Possivelmente, essas diferenças se devem às condições de cultivo distintas. Por exemplo, a aeração de *Enterobacter* sp. UENF18 foi bastante favorecida pelo uso de chicanas e manta, o que melhora o crescimento, mas não foi realizado no cultivo de A. xylosoxidans Ax10. O mesmo ocorreu com *Enterobacter asburiae* ENSD102. A cepa obteve DO≃ 1,4 e 1,2 em meio suplementado com 500 e 750 mg L^{-1} de $CuSO_4$, respectivamente, após 42 h de cultivo (MOSHARAF et al., 2018).

De acordo com os resultados de Rojas-Tapias; Bonilla e Dussán (2012) o aumento da concentração de Cu ($CuSO_4.5H_2O$) levou à inibição do crescimento bacteriano (*Pseudomonas putida* CC22, *Enterobacter sakazakii* CC24, *Acinetobacter* sp. CC30, e *Acinetobacter* sp.CC33), em meio LB líquido, corroborando o dado encontrado no presente estudo, na concentração 1000 mg Cu L^{-1}. Embora o Cu seja considerado um elemento essencial para o crescimento bacteriano, quando em altas concentrações torna-se tóxico para as células. Isso se deve, principalmente, à alteração da permeabilidade das membranas; inibição de atividades enzimáticas; e geração de radicais hidroxila, que podem danificar proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (FESTA; THIELE, 2011; TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

Os parâmetros de crescimento, como meio de cultivo, pH, temperatura, concentração de Cu, podem ser otimizados a fim de melhorar os resultados obtidos. Nesse caso, vale ressaltar que pH acima de 7,0 pode formar hidróxido e precipitar o

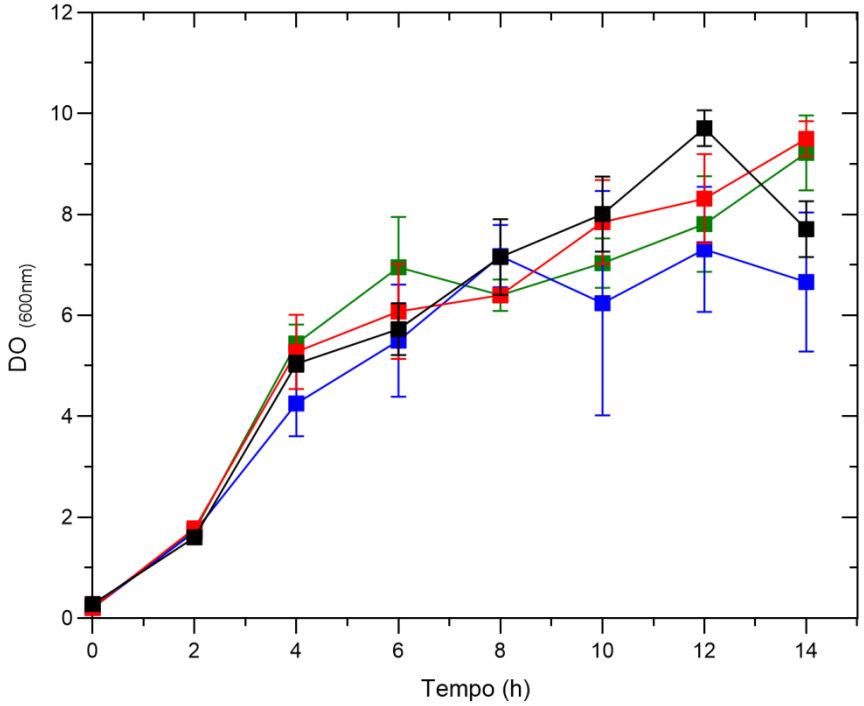
Cu. Já em pH muito ácido, os locais de adsorção de metal na superfície celular são ocupados por H_3O^+ (íon hidrônio) (EL-SHANSHOURY; ELSILK; ATEYA, 2013; SUN et al., 2020a), o que não é interessante para fins de remediação. No entanto, ao adicionar $CuCl_2.2H_2O$ ao meio de cultivo, foi observado acidificação no meio (Tabela 4). Dessa forma, em um segundo experimento, após a adição do Cu ao meio, o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH. Como resultado, nas três concentrações de Cu (600, 750 e 900 mg L^{-1}) avaliadas, a produção de célula ao final do cultivo foi semelhante ao controle e não foi observado fase de adaptação (Figura 5 - APÊNDICE B).

Tabela 4: pH do meio de cultivo, inicial e final, com a adição do metal Cu.

Concentrações de Cu		Controle*	600 mg L^{-1}	750 mg L^{-1}	900 mg L^{-1}
Sem ajuste	pH inicial	6	4,9	4,7	4,6
	pH final	6,7	6,4	5,8	5,2
Com ajuste	pH inicial	6	6	6	6
	pH final	6,7	6,3	6,2	6,6

* O pH do controle não foi ajustado. O pH está representado como média.

Figura 5: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 na presença de Cu e pH ajustado. Células cultivadas em meio LB na ausência de Cu suplementado (■) ou na presença de: 600 (■), 750 (■) e 900 (■). Médias seguidas de ± desvio padrão (n=4). As diferenças significativas entre os tratamentos foi realizado de acordo com o teste de Tukey (p<0,05) . Em relação ao controle, os tratamentos não apresentaram diferença significativa, mas apresentam correlação muito forte com o tempo de acordo com o teste Pearson r (r= ≥ 0,9).



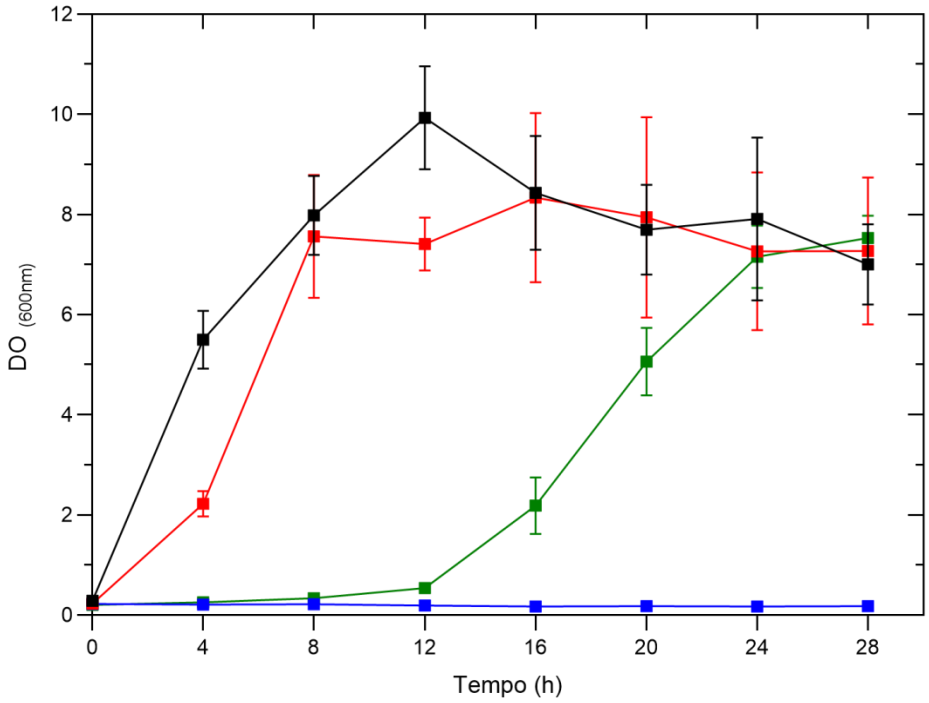
Os perfis de crescimento não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (p>0,05). Tais resultados sugerem que o pH influenciou no crescimento da UENF18 na presença de Cu. Condições ótimas de pH permitem que as enzimas fiquem em suas formas químicas adequadas permitindo maior atividade (BASTOS, 2016). Mas para maior precisão desses resultados é necessário determinar Cu no meio e analisar a disponibilidade do metal ao adicionar a base.

O pH tem influência direta na biodisponibilidade e a remoção de metais (CHEN et al., 2010; LI et al., 2018b). Joseph et al. (2019), por exemplo, mostraram que a adsorção de metais pelos microrganismos é ineficiente em valores de pH <4, enquanto valores de pH entre 5 e 7 mostraram ser os mais eficazes. Assim, é interessante averiguar melhor a relação do pH e Cu no crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18.

5.3. Cobre influência os efeitos de cádmio em *Enterobacter* sp. UENF18

Devido aos resultados promissores com Cu e outros metais testados em meio sólido, também foi avaliada a resistência da cepa em solução mista de Cu-Cd. Tendo em vista que esses elementos coexistem no ambiente *in natura* e em efluentes, foi explorado o comportamento de *Enterobacter* sp. UENF18 ao estresse conjunto dos dois metais. Desta forma, na Figura 6 é apresentada a cinética de crescimento da cepa UENF18 em cultivo sob estresse individual de Cd e Cu, e o sistema binário Cu-Cd, enquanto os valores de cada repetição estão no APÊNDICE C.

Figura 6: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 em soluções simples e binária. Células cultivadas em meio LB na ausência de metal (■) ou na presença de: 600 mg L^{-1} de Cu (■), 500 mg L^{-1} de Cd (■), e Cu-Cd com 600 mg L^{-1} de Cu + 500 mg L^{-1} de Cd (■). Médias seguidas de ± desvio padrão (n=9). A diferença significativa entre os tratamentos foi obtida de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$) . Em relação ao controle, apenas o tratamento com 500 mg L^{-1} de Cd e Cu-Cd apresentaram diferença significativa. Todos os tratamentos apresentaram correlação com o tempo de acordo com o teste Pearson r.



Nota-se que no tratamento com solução pura de Cu (600 mg L^{-1}) e na solução mista Cu-Cd (600 mg L^{-1} de Cu + 500 mg L^{-1} de Cd) a produção celular bacteriana, após 28 h de cultivo, foi semelhante comparado ao controle. No entanto, a fase de latência no sistema binário foi muito maior, com duração de 12 h. Tal comportamento sugere que o estresse para as células foi intenso neste tratamento. Provavelmente, foi necessário ativar mais aparatos de proteção e resistência para conseguir se multiplicar. No tratamento com o Cd (500 mg L^{-1}) não houve crescimento. Dessa forma, os resultado sugerem que a adição de Cu ao meio

reduziu o efeito tóxico de Cd, resultando em uma melhor resposta da cepa *Enterobacter* sp. UENF18.

Para confirmar esse comportamento da bactéria no sistema binário, ao final do cultivo foi verificada não apenas a DO, mas também a concentração celular e foi feita contagem do número de células (Tabela 5). Corroborando com os resultados anteriores, pode-se observar o crescimento em todos os tratamentos, exceto na solução pura de Cd. A contagem de células ao longo do cultivo também confirma o comportamento da bactéria com Cu amenizando o estresse com Cd (Figura 7).

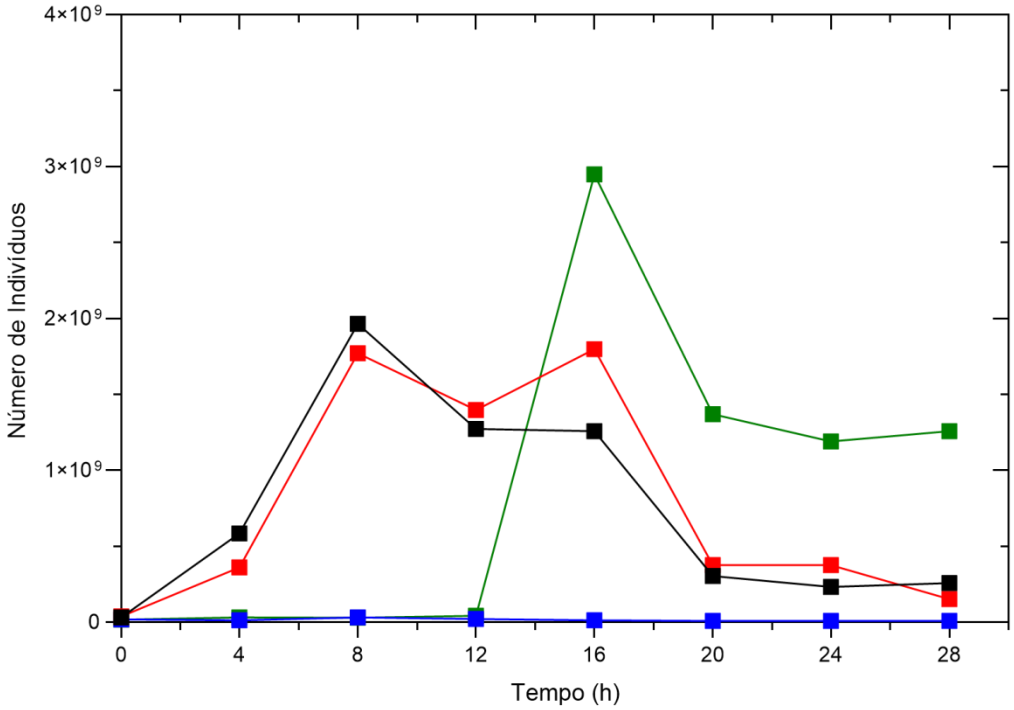
Tabela 5: Quantificação do crescimento celular de *Enterobacter* sp. UENF18 em soluções simples e binária no tempo final (Tf) de cultivo.

Concentração (mg L^{-1})	**Crescimento celular (T_f)**		
	Densidade Óptica (600 nm)	Concentração Celular	Número de Células
0	7,00 ± 0,8	3,10 ± 0,03	3.10^8
600 Cu	7,30 ± 1,0	3,00 ± 0,05	2.10^8
500 Cd	0,20 ± 0,05	0,08 ± 0,001	1.10^7
600 Cu + 500 Cd	7,50 ± 0,5	3,35 ± 0,03	1.10^9

A concentração celular está representada como a média ± desvio padrão (n=4).

A DO está representada como a média ± desvio padrão (n=9).

Figura 7: Número de indivíduos em função do tempo em sistema simples e binário. Células cultivadas em meio LB na ausência de metal (■) ou na presença de: 600 mg L^{-1} de Cu (■), 500 mg L^{-1} de Cd (■), e Cu-Cd com 600 mg L^{-1} de Cu + 500 mg L^{-1} de Cd (■). As diferenças significativas entre os tratamentos foram dadas de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). Em relação ao controle, apenas o tratamento com 500 mg L^{-1} de Cd apresentou diferença significativa. Os tratamentos com 500 mg L^{-1} de Cd e Cu-Cd apresentam correlação com o tempo de acordo com o teste Pearson r.

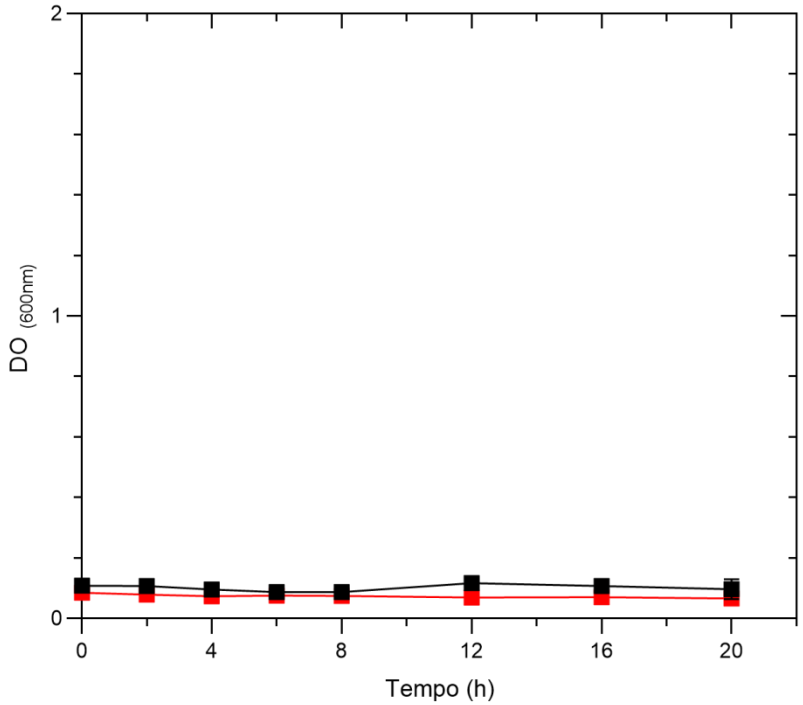


Na contagem de indivíduos, observa-se que o comportamento das células no tratamento controle e 600 mg L^{-1} de Cu são coincidentes, o mesmo contemplado na Figura 6, no qual não apresenta diferença significativa ($p>0,05$). A partir de 8 h começa a haver morte celular e com 20 h de cultivo as células vivas reduzem consideravelmente. No tratamento com 500 mg L^{-1} de Cd não houve crescimento considerável, corroborando o encontrado no ensaio com DO. No sistema binário constatou-se a fase lag de 12 h e uma produção celular expressiva a partir desse tempo de cultivo, o que consolidando os resultados anteriores.

Um outro ensaio foi realizado para verificar se o Cu fornece proteção às células contra os efeitos do Cd através da ativação prévia de mecanismos que possibilitam a resposta de resistência a Cd (Figura 8 - APÊNDICE D). No entanto, mesmo a cepa sendo pré-tratada com Cu, não houve produção celular em 500 mg L^{-1} de Cd. Portanto, é possível concluir que a presença do Cu é necessária para haver crescimento da cepa na presença de Cd nas condições apresentadas, o que sugere

a possibilidade de competição interiônica influenciando a resposta de resistência da cepa *Enterobacter* sp. UENF18 a Cd.

Figura 8: Cinética de crescimento de Enterobacter sp. UENF18 na presença de Cd. Células cultivadas em meio LB na presença de metal 500 mg L^{-1} de Cd (■) e na presença 500 mg L^{-1} de Cd após tratamento prévio com 600 mg L^{-1} de Cu (■). Médias seguidas de ± desvio padrão (n=3). A diferença significativa entre os tratamentos foi obtida de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). Os tratamentos apresentaram diferença significativa entre si ($p<0,0001$). Apenas o tratamento previamente tratado com Cu apresentou correlação significativa com o tempo de acordo com o teste Pearson r.



Geralmente, quando os íons metálicos competem pelos mesmos locais de adsorção, os metais com maior afinidade podem deslocar aqueles com menor afinidade (CHRISTOPHI; AXE, 2000). Nesse sentido, os dados sugerem que Cu compete com Cd por sítios de adsorção, suprimindo sorção ou mesmo fazendo a dessorção de Cd, o que reduz a toxicidade deste metal nas células.

Enterobacter possui um sistema versátil e sofisticado para regular a permeabilidade da membrana (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019). Essa permeabilidade seletiva é responsável pela resistência intrínseca da bactéria. O gênero também possui grupos funcionais aniônicos que se ligam a vários cátions. O Cu^{2+} exibe uma coordenação preferencial para grupos nitrogenados e oxigenados (HAN et al., 2017). Esses grupos funcionais desempenham um papel importante no aumento da capacidade de sobrevivência bacteriana em ambiente tóxico

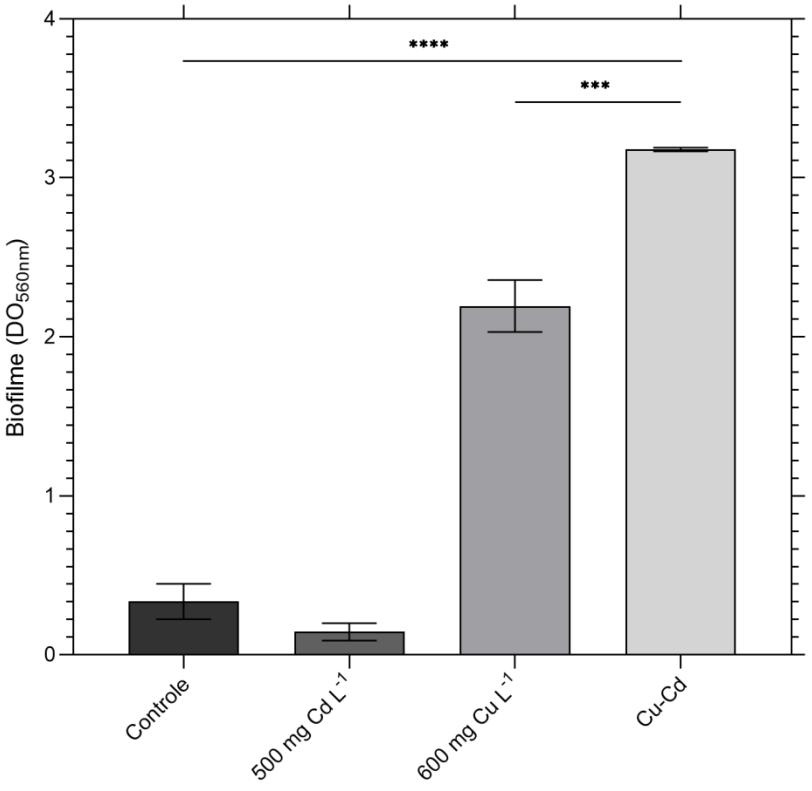
(MANGAIYARKARASI et al., 2011; NAIK; PANDEY; DUBEY, 2012; SUN et al., 2020a), uma vez que a superfície da bactéria torna-se mais carregada negativamente e interage mais prontamente com os metais carregados positivamente (JOSEPH et al., 2019). Sun et al. (2020a) relatam que radicais, da superfície celular, amida, carboxila, alcanos e hidroxila, estão relacionados à resistência de *Enterobacter* sp. DNB-S2, fixando o Cd e reduzindo a sua biodisponibilidade.

A troca iônica é um mecanismo importante envolvido na sorção competitiva de metais, no qual os grupos funcionais orgânicos se ligam a Cu e Cd via coordenação ou quelação (ZHENG et al., 2016). O tamanho do íon e a carga dos metais influenciam na sua afinidade de sorção. O Cu tem raios hidratados (0,838 nm) ligeiramente menores do que Cd (0,852 nm) (MOHAN; PITTMAN JR; STEELE, 2006) e tem maior eletronegatividade, o que contribui para uma afinidade de sorção mais forte do que Cd (LOURIE; GJENGEDAL, 2011; MOHAN; PITTMAN JR; STEELE, 2006; QIN et al., 2006). Inúmeros estudos afirmam que o Cu tem maior afinidade de adsorção do que o Cd (CHRISTOPHI; AXE, 2000; DU et al., 2016; LU et al., 2008; NAKAJIMA; SAKAGUCHI, 1986; QIN et al., 2006; SELIM, 2013; VASCONCELOS et al., 2009). Especula-se que esses mecanismos estejam envolvidos na resistência de *Enterobacter* sp. UENF18 a mistura binária Cu-Cd.

5.4. A produção de biofilme em resposta a cobre e cádmio em Enterobacter sp. UENF18

O biofilme é uma estratégia bacteriana para resistir a toxicidade de metais (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2019; GRUJIĆ et al., 2017; HULLEBUSCH; ZANDVOORT; LENS, 2003). Foi verificado que *Enterobacter* sp. UENF18 é capaz de formar biofilme *in vitro* sob estresse (Figura 9 - APÊNDICE E). Observa-se que não houve formação de biofilme significativa no controle e no tratamento com 500 mg L^{-1} de Cd ($p=0,0557$). Sob estresse de 600 mg L^{-1} de Cu a formação de biofilme foi estimulada, no entanto, no sistema binário Cu-Cd a quantidade foi ainda 45% maior ($p=0,0005$).

Figura 9: Formação de biofilme por Enterobacter sp. UENF18 em resposta ao estresse do metal. As barras de erro são o desvio padrão de culturas replicadas. Médias seguidas de * indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). Em relação ao controle apenas o tratamento com Cu e Cu-Cd apresentou diferença significativa (p<0,0001).

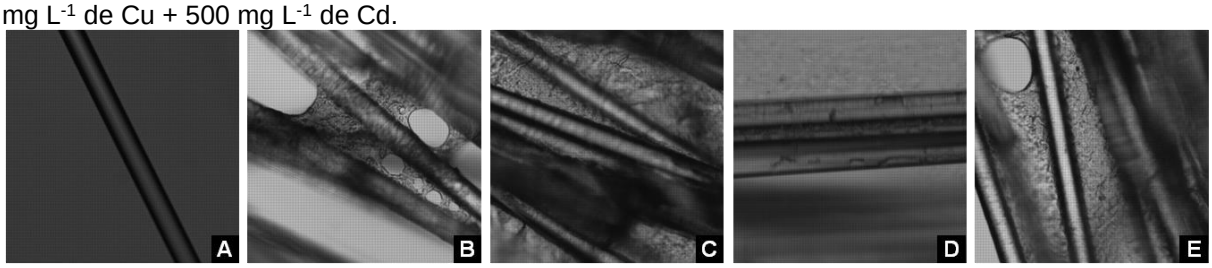


Yin; Hu e Xiong (2011) mostraram que uma matriz de EPS adsorveu Cu e Cd no cultivo de *Aspergillus fumigatus* por meio de grupos funcionais. *A* biossorção desses metais estava relacionada à afinidade relativa dos íons metálicos à matriz de EPS, seguindo a ordem de Cu> Cd. As células do biofilme produzem EPS contendo polissacarídeos, lipídios, proteínas e DNA extracelular, que fornecem diferentes grupos funcionais para ligação dos íons metálicos por meio de processos de biossorção passivos, que imobilizam tais elementos e protegem as células (HARRISON; CERI; TURNER, 2007). Teitzel; Parsek, (2003) estudando *Pseudomonas aeruginosa* verificaram que o biofilme foi até 600 vezes mais resistente ao estresse causado por metais do que células planctônicas.

Na Figura 10, é possível observar a adesão de *Enterobacter* sp. UENF18 na lã de vidro. Nota-se que essa tendência de formar biofilme não é registrada na Figura 10D, referente ao tratamento com Cd, confirmando os resultados da quantificação (Figura 9). Para ter formação de biofilme as células precisam sobreviver às concentrações de metal por tempo suficiente para permitir a fixação e

a expressão de genes relacionados ao biofilme (GUGALA; LEMIRE; TURNER, 2017). No entanto, é incomum para células vivas que não crescem (RAHMAN et al., 2015).

Figura 10: Produção de biofilme por Enterobacter sp. UENF18 sob estresse por metal. Após 28 h de cultivo, observa-se em: A- Imagem da lã de vidro. B- Tratamento controle, sem adição de metal. C- Tratamento com 600 mg L^{-1} de Cu. D- Tratamento com 500 mg L^{-1} de Cd. E- Tratamento com 600 mg L^{-1} de Cu + 500 mg L^{-1} de Cd.



Os estudos de Alviz-Gazitua et al. (2019) mostram que Cd inibe o início do estilo de vida do biofilme no extremófilo resistente a metais *Cupriavidus metallidurans* CH_{34}. *Enterobacter* sp. C1D também não formou biofilme com 120 mg L^{-1} de Cd, mas concentrações menores de Cd (10-40 mg L^{-1}) afetaram positivamente a formação da estrutura (SHARMA; BAROT; ARCHANA, 2020). Estudos sugerem que, dependendo da concentração do metal, é possível erradicar completamente a formação de biofilme (do inglês, *minimum biofilm eradication concentration* - MBEC), assim como cepas planctônica (do inglês, *minimum bactericidal concentration* - MBC) (HARRISON et al., 2004).

A concentração de 500 mg L^{-1} de Cd foi o suficiente para inibir o crescimento de *Enterobacter* sp. UENF18 (Figura 6 e 7), impedindo a formação de biofilme (Figura 7), mas não erradicou as células planctônicas (Tabela 5). Dessa forma, é possível concluir que a cepa é muito resistente ao metal, dado que íons metálicos de Cd são muito tóxicos mesmo em concentrações de 0,001–0,1 mg L^{-1} (WANG; CHEN, 2006).

Muitos mecanismo e genes estão relacionados a resistência de *Enterobacter* a Cu e Cd (ASTOLFI et al., 2018; SINGH; NALWAYA; JHA, 2017; SUN et al., 2020a; WANG et al., 2020). Entretanto, não parece haver ainda evidência direta que liga a resistência a metal em células planctônicas e de biofilmes à competição interiônica. Para averiguar essa hipótese, serão necessários experimentos futuros para determinar a sorção de Cu e Cd de solução simples e binária pela bactéria

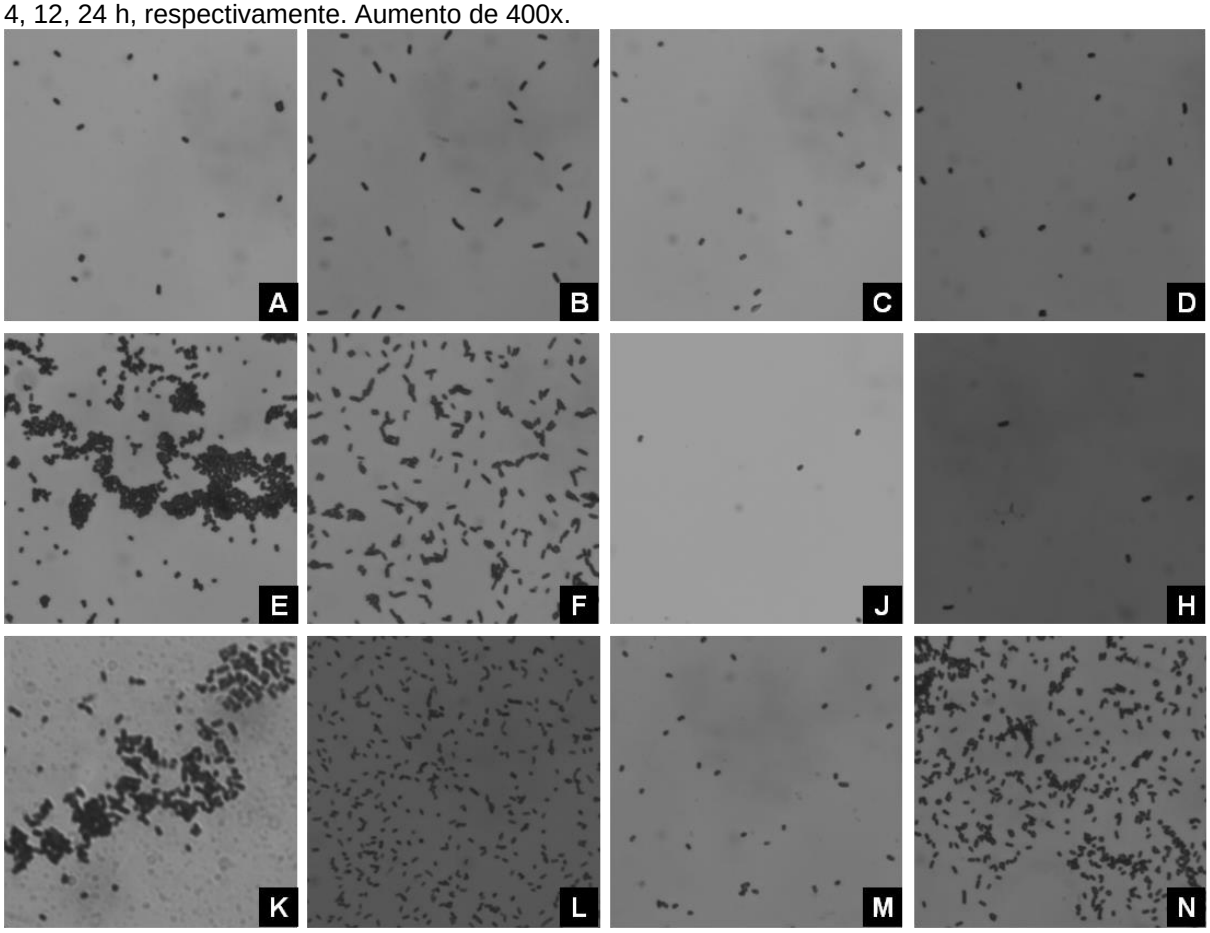
Enterobacter sp. UENF18 e verificar quais outros mecanismos podem estar envolvidos nessa resposta da cepa.

5.4. Morfologia de Enterobacter sp. UENF18 em soluções simples e binária de Cu-Cd

Para examinar prováveis mudanças morfológicas nas células estressadas durante o ensaio de cinética de crescimento, foi realizado análise de microscopia óptica das amostras (Figura 11). Como pode ser observado, *Enterobacter* sp. UENF18 apresenta células pequenas no formato de bastonetes, no início do cultivo, sendo encontrados separadamente. Durante o cultivo, a maioria das células formaram grumos, que são aglomerados de bactérias (Figura 11A, 11E e 11K).

Ao adicionar os metais, no geral, notou-se que as células apresentaram morfologia heterogênea sob o mesmo tratamento. Observa-se que em 600 mg L^{-1} de Cu nos tempos 4 e 12 h, houve um aumento notável no tamanho das células. No tratamento binário de Cu-Cd, um alongamento sutil também foi apresentado (Figura 11D e 11H). Com 24 h de cultivo as células apresentaram tamanhos diversificados (Figura 11K a 11N). Corroborando com os resultados do tópico anterior, pode-se observar na Figura 11N, o crescimento das células no sistema binário Cu-Cd, apresentando muito mais células do que a solução simples de Cd (Figura 9M). No tratamento com 500 mg L^{-1} de Cd, não há alteração no tamanho das células, comparado ao controle e ao tempo de cultivo (Figura 11C, 11J e 11M). Todavia, as células estavam translúcidas, sugerindo haver modificação no citoplasma, sendo necessário análises ultraestruturais futuras para confirmação.

Figura 11: Observações microscópicas de Enterobacter sp. UENF18 em diferentes tempos de cultivo na presença e ausência de Cu e Cd. A, E e K – Controle nos tempos 4, 12, 24 h, respectivamente. B, F e L – 600 mg L^{-1} de Cu nos tempos 4, 12, 24 h, respectivamente. C, J e M- 500 mg L^{-1} de Cd nos tempos 4, 12, 24 h, respectivamente. D, H e N- solução binária Cu-Cd nos tempos 4, 12, 24 h, respectivamente. Aumento de 400x.



Enterobacter cloacae RSN3 apresentou aumento no tamanho das células na presença de arsênio (As), mas ao aumentar as concentrações do metal as células reduziram seu volume (DASH et al., 2020). Do mesmo modo, mudanças morfológicas, como aumento no tamanho e alteração na forma das células, foram relatadas na bactéria *Acidocella* GS19h como um mecanismo de defesa para reduzir o estresse por metais (Cd, Cu, Ni e Zn) (CHAKRAVARTY et al., 2007). O metal pode causar alterações na fisiologia microbiana, sem afetar seu crescimento (AGARWAL; RATHORE; CHAUHAN, 2020; SILVA et al., 2012), como ocorreu na concentração de 600 mg L^{-1} de Cu e no tratamento binário com Cu-Cd.

Considerando todos os dados apresentados, a bactéria *Enterobacter* sp. UENF18 dispõe de mecanismos que lhe permitem resistir a elevada concentração dos metais Cu e Cd, principalmente, se considerar que as concentrações testadas estavam muito acima dos limites permitidos pelas

legislações ambientais (Tabela 6) e das relatadas na literatura para outras cepas (Tabela 3). Portanto, faz-se necessário avaliar esses mecanismos de resistência relacionados ao processo de adaptação a condições adversas e a capacidade de remediar metais em sistema simples e multimetais, com o intuito de viabilizar a sua aplicação biotecnológica em Estações de Tratamento de Água (ETA) e Efluente (ETE), reduzindo a liberação de produtos químicos perigosos na água para minimizar os impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

Tabela 6: Concentração de Cu e Cd permitida pelas legislações.

Metal	Valor Máximo Permitido (mg L^{-1})						
	USEPA[a]	WHO[b]	NOAA[c]		CONAMA[d]		MS[e]
			Agudo	Crônico	Classe I e II	Classe III	
Cu	1,3	2,0	0,013	0,009	0,009	0,013	2,0
Cd	0,005	0,003	0,002	0,00025	0,001	0,01	0,005

[a]Valores estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos água potável (USEPA, 2009).
[b]Valores estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde água potável (WHO, 2017).
[c]Valores estabelecidos pela Administração Nacional Oceânica e Atmosférica para água doce (BUCHMAN, 2008).
[d]Valores estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente para água doce (BRASIL, 2005).
[e]Valores estabelecidos pelo Ministério da Saúde para água potável (BRASIL, 2017).

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que *Enterobacter* sp. UENF18, isolada de planta aquática, possui elevada resistência a metais, visto que a CIM compreendeu os valores de 150 mg L^{-1} de Co, 500 mg L^{-1} de Cd, 770 mg L^{-1} de Zn e 3000 mg L^{-1} de Fe. No ensaio de cinética de crescimento, em meio suplementado com Cu, a cepa foi capaz de crescer em 900 mg L^{-1} do metal, mesmo em pH ácido, no qual o metal fica mais biodisponível. Destaca-se que em solução binária Cu-Cd, a cepa conseguiu contornar o processo de inibição e obteve produção de células expressiva, além de afetar positivamente a formação de biofilme. Mudanças morfológicas também foram verificadas ao estudar os efeitos de soluções simples de Cu e Cd e binária Cu-Cd, como o alongamento das células, que são respostas adaptativas sob condições de estresse para resistir aos metais.

Embora ainda haja muito a ser investigado sobre os mecanismos de resistência a metal na cepa *Enterobacter* sp. UENF18, às aplicações futuras desses processos têm verdadeiro potencial de remediação ambiental, com possibilidade de proteger a vida dos ecossistemas e assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento. Dessa forma, conhecer melhor os mecanismos de resistência da cepa isolada e em consórcio sob estresse de multimetais são áreas notáveis para pesquisas futuras.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, S. Z. et al. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, p. 243–262, 2018.

ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L .) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 20, n. e00305, 2019.

AGARWAL, M.; RATHORE, R. S.; CHAUHAN, A. A rapid and high throughput MIC determination method to screen uranium resistant microorganisms. **Methods and protocols**, v. 3, n. 1, p. 21, 2020.

AL-SAYDEH, S. A.; EL-NAAS, M. H.; ZAIDI, S. J. Copper removal from industrial wastewater : A comprehensive review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 56, p. 35–44, 2017.

ALI, H.; KHAN, E. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/ webs - concepts and implications for wildlife and human health. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 25, n. 6, p. 1353–1376, 2018.

ALVIZ-GAZITUA, P. et al. The response of *Cupriavidus metallidurans* CH34 to cadmium involves inhibition of the initiation of biofilm formation, decrease in intracellular c-di-GMP levels, and a novel metal regulated phosphodiesterase. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1499, 2019.

AMEH, T.; SAYES, C. M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles : A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 103220, 2019.

ANDRÉS-BARRAO, C. et al. Complete genome sequence analysis of *Enterobacter* sp . SA187 , a plant multi-stress tolerance promoting endophytic bacterium. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2023, p. 1–21, 2017.

ARAÚJO, L. C. A. DE; OLIVEIRA, M. B. M. DE. Effect of Heavy Metals on the Biofilm Formed by Microorganisms from Impacted Aquatic Environments. Em: DINCER, S. (Ed.). . **Bacterial Biofilms**. IntechOpen ed. [s.l: s.n.].

ARMADA, C. A. S. The environmental disasters of Mariana and Brumadinho and the brazilian social environmental law state. **SSRN Electronic Journal**, 2019.

ASTOLFI, M. C. T. et al. Draft genome sequence of the novel *Enterobacter cloacae* strain amazonensis, a highly heavy metal-resistant bacterium from a contaminated stream in Amazonas, Brazil. **Genome announcements**, v. 6, n. 22, 2018.

AWUAL, R. New type mesoporous conjugate material for selective optical

copper (II) ions monitoring e removal from polluted waters. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 85–94, 2017.

AZIMI, A. et al. Removal of heavy metals from industrial wastewaters: a review. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 1, p. 37–59, 2017.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Effect of stress on growth , pigment production and morphology of *Monascus* sp . in solid cultures. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 118–126, 2007.

BEGG, S. L. et al. Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in *Streptococcus pneumoniae* . **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

BERNHOFT, R. A. Cadmium toxicity and treatment. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

BIELMYER-FRASER, G. K. et al. Assessment of metal contamination in the biota of four rivers experiencing varying degrees of human impact. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 23, 2017.

BIZZO, A. L. T. et al. Short-term physiological responses to copper stress in <i>Salvinia auriculata<i> Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 3, p. 268–277, 2014.

BOLISETTY, S.; PEYDAYESH, M.; MEZZENGA, R. Sustainable technologies for water purification from heavy metals : review and analysis. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 463–487, 2019.

BRASIL. **Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <%3Cwww.mma.gov.br/port/%0Aconama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2021.

BRASIL. **Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 03 de outubro de 2017**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html>. Acesso em: 3 jan. 2021.

BUCHMAN, M. F. **Screening Quick Reference Tables (SQuiRTs NOAA)**. Seattle: National Oceanic and Atmospheric Administration, 2008.

CHAKRAVARTY, R. et al. Morphological changes in an *Acidocella* strain in response to heavy metal stress. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 742–748, 2007.

CHANDRANGSU, P.; RENSING, C.; HELMANN, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 338–350, 2017.

CHEN, H. et al. Adsorption characteristics of Pb(II) from aqueous solution onto a natural biosorbent, fallen *Cinnamomum camphora* leaves. **Desalination**, v. 262, p. 174–182, 2010.

CHEN, Y. et al. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp . Strain EG16 under cadmium stress. **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 82, n. 6, p. 1734–1744, 2016a.

CHEN, Y. et al. Metal-tolerant *Enterobacter* sp. strain EG16 enhanced phytoremediation using Hibiscus cannabinus via siderophore-mediated plant growth promotion under metal contamination. **Plant and Soil**, v. 413, n. 1–2, p. 203–216, 2016b.

CHRISTOPHI, C. A.; AXE, L. Competition of Cd, Cu, and Pb adsorption on goethite. **Journal of Environmental Engineering**, v. 126, n. 1, p. 66–74, 2000.

COCOZZA, C. et al. Enhancing phytoextraction of Cd by combining poplar (clone " I-214 ") with *Pseudomonas fluorescens* and microbial consortia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 1796–1808, 2014.

CORAL, M. N. Ü. et al. Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* spp. isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 175–179, 2005.

CORNELIS, P.; ANDREWS, S. C. **Iron uptake and homeostasis in microorganisms. Caister Academic Press, 2010.** Caister Ac ed. Norfolk: [s.n.].

DALCORSO, G. et al. Heavy metal pollutions : state of the art and innovation in phytoremediation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3412, 2019.

DAS, S.; DASH, H. R.; CHAKRABORTY, J. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2967–2984, 2016.

DAS, S.; GOSWAMI, S. Copper phytoextraction by *Salvinia cucullata*: biochemical and morphological study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1363–1371, 2016.

DASH, B. et al. Arsenic efflux in *Enterobacter cloacae* RSN3 isolated from arsenic-rich soil. **Folia Microbiologica**, p. 1–8, 2020.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J.; PAGÈS, J.-M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

DOS SANTOS, S. L. et al. Evaluation of the water quality in a conservation unit in Central-West Brazil: Metals concentrations and genotoxicity *in situ* . **Chemosphere**, v. 251, 2020.

DU, H. et al. Competitive adsorption of Pb and Cd on bacteria-montmorillonite composite. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 168–175, 2016.

DUTTA, P. et al. *Klebsiella pneumoniae* (HR1) assisted alleviation of Cd (II) toxicity in Vigna mungo : a case study of biosorption of heavy metal by an endophytic bacterium coupled with plant growth promotion. **Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration**, v. 3, n. 27, 2018.

EGEA-CORBACHO, A.; GUTIÉRREZ, S.; QUIROGA, J. M. Removal of

emerging contaminants from wastewater through pilot plants using intermittent sand / coke fi lters for its subsequent reuse. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 1232–1240, 2019.

EL-SHANSHOURY, A. E. R.; ELSILK, S. E.; ATEYA, P. S. Uptake of some heavy metals by metal resistant *Enterobacter* sp . isolate from Egypt. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 23, p. 2875–2884, 2013.

ELSHKAKI, A. et al. Copper demand, supply, and associated energy use to 2050. **Global Environmental Change**, v. 39, p. 305–315, 2016.

EMENIKE, C. U. et al. Biotransformation and removal of heavy metals: a review of phytoremediation and microbial remediation assessment on contaminated soil. **Environmental Reviews**, v. 26, n. 2, p. 156–168, 2018.

FATNASSI, I. C. et al. Phytostabilization of moderate copper contaminated soils using co-inoculation of Vicia faba with plant growth promoting bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, p. 1–9, 2013.

FAVAS, P. J. C. et al. Phytofiltration of metal(loid) -contaminated water : the potential of native aquatic plants. Em: ANSARI, A. et al. (Eds.). . **Phytoremediation**. Springer ed. Cham: [s.n.]. p. 305–343.

FERRIS, F. G. et al. Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1249–1257, 1989.

FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper: an essential metal in biology. **Current Biology**, v. 21, n. 21, p. R877–R883, 2011.

FLÖRKE, M. et al. Domestic and industrial water uses of the past 60 years as a mirror of socio-economic development : a global simulation study. **Global Environmental Change**, v. 23, p. 144–156, 2013.

GALL, J. E.; BOYD, R. S.; RAJAKARUNA, N. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs : a review. **Environmental Monitoring and Assessment volume**, v. 187, n. 201, 2015.

GIOVANELLA, P. et al. Metal resistance mechanisms in gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 162–169, 2017.

GIRI, S.; SINGH, A. K.; MAHATO, M. K. Monte Carlo simulation-based probabilistic health risk assessment of metals in groundwater via ingestion pathway in the mining areas of Singhbhum copper belt, India. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 5, p. 1–14, 2019.

GLICK, B. R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 367–374, 2010.

GRANT, C. A. Influence of phosphate fertilizer on cadmium in agricultural soils and crops. **Pedologist**, v. 54, n. 3, p. 143–155, 2011.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The genus *Enterobacter*. **The**

Prokaryotes, v. 6, p. 197–214, 2006.

GRUJIĆ, S. et al. Heavy metal tolerance and removal potential in mixed-species biofil. **Water Science and Technology,** v. 76, n. 4, p. 806–812, 2017.

GUGALA, N.; LEMIRE, J. A.; TURNER, R. J. The efficacy of different anti-microbial metals at preventing the formation of, and eradicating bacterial bio fi lms of pathogenic indicator strains. **The Journal of antibiotics**, v. 70, n. 6, p. 775–780, 2017.

HAN, H. et al. Copper (II) binding of NAD (P) H-flavin oxidoreductase (NfoR) enhances its Cr (VI)-reducing ability. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

HAQ, R.; ZAIDI, S. K.; SHAKOORI, A. R. Cadmium resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella* sp . isolated from industrial effuents and their possible role in cadmium detoxication. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 283–290, 1999.

HARRISON, J. J. et al. Biofilm susceptibility to metal toxicity. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1220–1227, 2004.

HARRISON, J. J.; CERI, H.; TURNER, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 928–938, 2007.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells , the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* . **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 981–994, 2005.

HASSAN, Z. UL et al. Role of bioremediation agents (bacteria, fungi, and algae) in alleviating heavy metal toxicity. **Probiotics in Agroecosystem**, p. 517–537, 2017.

HATJE, V. et al. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

HOLMES, A. et al. Comparison of Two Multimetal Resistant Bacterial Strains : *Enterobacter* sp . YSU and Stenotrophomonas maltophilia ORO2. **Current Microbiology**, v. 59, p. 526–531, 2009.

HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A. The proposed genus *Enterobacter* . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 71–74, 1960.

HULLEBUSCH, E. D. VAN; ZANDVOORT, M. H.; LENS, P. N. L. Metal immobilisation by biofilms: mechanisms and analytical tools. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 9–33, 2003.

IBRAM, I. B. DE M. Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira. v. 7, 2012.

IRAWATI, W. et al. Characterization of heavy metals resistant yeast isolated from activated sludge in Rungkut , Surabaya , Indonesia as biosorbent of mercury , copper , and lead. **AIP Conference Proceedings**, v. 1744, n. 1, 2016.

ISMAEL, M. A. et al. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. **Metallomics**, v. 11, p. 255–277, 2019.

IWA. **Nature-based Solutions: the advantage of being a developing country**. Disponível em: <https://iwa-network.org/nature-based-solutions-the-advantage-of-being-a-developing-country/>.

JAIN, D. et al. Zinc tolerant plant growth promoting bacteria alleviates phytotoxic effects of zinc on maize through zinc immobilization. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

JÄRUP, L.; ÅKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 201–208, 2009.

JIANG, Z. et al. Contrasting the Pb (II) and Cd (II) tolerance of *Enterobacter* sp. via its cellular stress responses. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1507–1516, 2019.

JOBBY, R. et al. Biotransformation of chromium by root nodule bacteria *Sinorhizobium* sp . SAR1. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, 2019.

JOSEPH, L. et al. Removal of heavy metals from water sources in the developing world using low-cost materials: a review. **Chemosphere**, v. 229, p. 142–159, 2019.

KABUTEY, F. T. et al. Enhanced bioremediation of heavy metals and bioelectricity generation in a macrophyte-integrated cathode sediment microbial fuel cell (mSMFC). **Environmental Science and Pollution Research**, 2019.

KAJITVICHYANUKUL, P.; MUSIKAVONG, C.; PHENRAT, T. Editorial: Frontier technology for water treatment and pollutant removal is key for securing the present, correcting the past, and sustaining the future. **Water Science & Technology |**, v. 70, n. 5, 2019.

KAMAR, F. H.; NECHIFOR, A. C. Removal of copper ions from industrial wastewater using walnut shells as a natural adsorbent material. **Scientific Bulletin**, v. 77, n. 3, p. 141–150, 2015.

KHAN, A. et al. Siderophore-assisted cadmium hyperaccumulation in *Bacillus subtilis*. **International Microbiology**, 2019.

KHAN, M. A. et al. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 1591–1605, 2017.

KUIPERS, K. J. J. et al. Assessing environmental implications associated with global copper demand and supply scenarios from 2010 to 2050. **Global Environmental Change**, v. 49, p. 106–115, 2018.

LI, W.; YU, H. Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 15–23, 2014.

LI, X. et al. Biosorption and bioaccumulation characteristics of cadmium by

plant growth-promoting rhizobacteria. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, n. 54, p. 30902–30911, 2018a.

LI, X. et al. Adsorption characteristics of Copper (Ⅱ), Zinc (Ⅱ) and Mercury (Ⅱ) by four kinds of immobilized fungi residues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 357–366, 2018b.

LI, X. et al. Status of copper accumulation in agricultural soils across China (1985–2016). **Chemosphere**, v. 244, 2019.

LI, Y. et al. Improvement of cadmium phytoremediation by *Centella asiatica* L. after soil inoculation with cadmium-resistant *Enterobacter* sp. FM-1. **Chemosphere**, v. 202, p. 280–288, 2018c.

LIU, J. et al. Water scarcity assessments in the past, present and future. **Earth's Future**, v. 5, n. 6, p. 545–559, 2017.

LIU, W. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance the growth and Cd uptake of *Sedum plumbizincicola* in a Cd-contaminated soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 15, n. 5, p. 1191–1199, 2015.

LOURIE, E.; GJENGEDAL, E. Metal sorption by peat and algae treated peat: kinetics and factors affecting the process. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 759–764, 2011.

LU, W.-B. et al. Exploring multi-metal biosorption by indigenous metal-hyperresistant Enterobacter sp. J1 using experimental design methodologies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 372–381, 2008.

LU, W. et al. 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. 1–3, p. 80–86, 2006.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 2, p. 831–837, 2009.

MANGAIYARKARASI, M. S. M. et al. Bioreduction of Cr (VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 157–167, 2011.

MATOVIĆ, V. et al. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 65–76, 2011.

MERGEAY, M.; HOUDT, R. VAN. *Cupriavidus metallidurans* CH34, a historical perspective on its discovery, characterization and metal resistance. **FEMS Microbiology Ecology**, 2020.

MISHRA, S. et al. Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. Em: **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**. Springer ed. Singapura: [s.n.]. p. 103–125.

MOHAN, D.; PITTMAN JR, C. U.; STEELE, P. H. Single, binary and multi-component adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin — a biosorbent. **Journal of colloid and interface science**, v. 297, n. 2, p. 489–504, 2006.

MOSHARAF, M. K. et al. Metal-adapted bacteria isolated from wastewaters produce biofilms by expressing proteinaceous curli fimbriae and cellulose nanofibers. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

MUSHTAQ, N. et al. Freshwater contamination: sources and hazards to aquatic biota. Em: QADRI, H. et al. (Eds.). . **Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation**. Springer ed. Singapura: [s.n.]. p. 27–50.

NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. **Biodegradation**, v. 23, p. 775–783, 2012.

NAKAJIMA, A.; SAKAGUCHI, T. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 59–64, 1986.

NEILANDS, J. B. Iron absorption and transport in microorganisms. **Annual review of nutrition**, v. 1, n. 1, p. 27–46, 1981.

OECD. **OECD environmental outlook to 2050: the consequences of inaction**. OECD Publi ed. Paris: [s.n.].

ORAL, H. V. et al. A review of nature-based solutions for urban water management in European circular cities: a critical assessment based on case studies and literature. **Blue-Green Systems**, v. 2, n. 1, p. 111–135, 2020.

OSMAN, G. E. H. et al. Recent progress in metal-microbe interactions : prospects in bioremediation. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 13–26, 2019.

PANFILI, I. et al. Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 1263–1270, 2017.

PATEL, P. R.; SHAIKH, S. S.; SAYYED, R. Z. Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. **Environmental Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 81–87, 2018.

PATTNAIK, S. et al. Improvement of rice plant productivity by native Cr(VI) reducing and plant growth promoting soil bacteria *Enterobacter cloacae* . **Chemosphere**, v. 240, p. 124895, 2020.

PINTO, O. H. B. et al. Soil *Acidobacteria* Strain AB23 resistance to oxidative stress through production of carotenoids. **Microbial Ecology**, v. 81, n. 1, p. 169–179, 2021.

PŁOCINICZAK, T. et al. Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants. **Chemosphere**, v. 219, p. 250–260, 2019.

QIN, F. et al. Mechanisms of competitive adsorption of Pb, Cu, and Cd on peat. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 669–680, 2006.

QIU, Z. et al. Enhanced phytoremediation of toxic metals by inoculating endophytic *Enterobacter* sp . CBSB1 expressing bifunctional glutathione synthase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 267, p. 17–20, 2014.

QUEIROZ, H. M. et al. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? **Science of the Total Environment**, v. 637–638, p. 498–506, 2018.

RAHIMZADEH, M. R. et al. Cadmium toxicity and treatment: an update. **Caspian journal of internal medicine**, v. 8, n. 3, p. 135–145, 2017.

RAHMAN, A. et al. Bioremediation of hexavalent chromium (VI) by a soil-borne bacterium, *Enterobacter cloacae* B2-DHA. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 11, p. 1136–1147, 2015.

RASHEED, T. et al. Environmentally-related contaminants of high concern : potential sources and analytical modalities for detection , quantification , and treatment. **Environment International journal**, v. 122, p. 52–66, 2019.

RATHOURE, A. K. Heavy metal pollution and its management : bioremediation of heavy metal. Em: KHOSROW-POUR, M. (Ed.). . **Waste Management: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications**. Engineerin ed. India: [s.n.]. p. 1013–1015.

REGINA, D. et al. Metal and metalloid distribution in different environmental compartments of the middle Xingu River in the Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 605, p. 66–74, 2017.

REMANS, T. et al. Understanding the development of roots exposed to contaminants and the potential of plant-associated bacteria for optimization of growth. **Annals of Botany**, v. 110, n. 2, p. 1–14, 2012.

RISTUCCIA, P. A.; CUNHA, B. A. *Enterobacter*. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 6, n. 3, p. 124–128, 1985.

ROJAS-TAPIAS, D. F.; BONILLA, R. R.; DUSSÁN, J. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria on growth and copper uptake by sunflowers. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 2, p. 643–654, 2012.

SABIR, A. et al. Cadmium mediated phytotoxic impacts in *Brassica napus* : managing growth , physiological and oxidative disturbances through combined use of biochar and *Enterobacter* sp . MN17. **Journal of Environmental Management**, v. 265, p. 110522, 2020.

SAEED, Z. et al. Combined use of *Enterobacter* sp . MN17 and zeolite reverts the adverse effects of cadmium on growth , physiology and antioxidant activity of *Brassica napus* . **PLoS Genetics**, v. 14, n. 3, 2019.

SAHMOUNE, M. N. Performance of *Streptomyces rimosus* biomass in biosorption of heavy metals from aqueous solutions. **Microchemical Journal**, v. 141,

p. 87–95, 2018.

SANDERS, W. E.; SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp .: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 220–241, 1997.

SANTOS, C. B. D. L. et al. Interaction of short-term copper pollution and ocean acidi fi cation in seagrass ecosystems : toxicity , bioconcentration and dietary transfer. **Marine Pollution Bulletin**, v. 142, p. 155–163, 2019.

SARANYA, K. et al. Biosorption of multi-heavy metals by coral associated phosphate solubilising bacteria *Cronobacter muytjensii* KSCAS2. **Journal of Environmental Management**, v. 222, p. 396–401, 2018.

SATARUG, S. et al. Cadmium , Environmental Exposure , and Health Outcomes. **Environmental Health Perspectives**, v. 182, n. 2, p. 182–190, 2010.

SAXENA, G. et al. Phytoremediation of heavy metal-contaminated sites : eco-environmental concerns , field studies , sustainability issues , and future prospects. 2019.

SCHWABE, R. et al. Cultivation dependent formation of siderophores by *Gordonia rubripertincta* CWB2. **Microbiological Research**, v. 31, 2020.

SELIM, H. M. **Transport and retention of heavy metal in soils: competitive sorption**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 119

SHAFEEQ, S. et al. Draft genome sequence of the urinary catheter isolate *Enterobacter ludwigii* CEB04 with high biofilm forming capacity. **Microorganisms**, v. 8, n. 522, 2020.

SHARMA, B.; SHUKLA, P. Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, 2021.

SHARMA, R. K.; BAROT, K.; ARCHANA, G. Root colonization by heavy metal resistant *Enterobacter* and its influence on metal induced oxidative stress on *Cajanus cajan* . **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 4, p. 1532–1540, 2020.

SILVA, A. A. DE L. E et al. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1620–1631, 2012.

SILVA, F. J. G. DA; GOUVEIA, R. M. Global population growth and industrial impact on the environment. Em: **Cleaner Production**. [s.l.] Springer, Cham, 2020. p. 33–75.

SILVA, J. T. DE S. **Promoção do crescimento de *Salvinia auriculata* Aublet mediada por *Enterobacter* sp. sob estresse por cobre**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2019.

SINGH, R. P.; NALWAYA, S.; JHA, P. N. The draft genome sequence of the

plant growth promoting rhizospheric bacterium *Enterobacter cloacae* SBP-8. **Genomics Data**, v. 12, p. 81–83, 2017.

SOUSA, A. M. et al. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. **Journal ofMicrobiological Methods**, v. 95, n. 3, p. 327–335, 2013.

SOUZA, A. M. et al. Seasonal study of concentration of heavy metals in waters from lower São Francisco River basin , Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 967–974, 2016.

STEUNOU, A. S. et al. Additive effects of metal excess and superoxide , a highly toxic mixture in bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1515–1529, 2020.

SUBRAHMANYAM, G. et al. *Vigna radiata* var. GM4 plant growth enhancement and root colonization by a multi-metal-resistant plant growth-promoting bacterium *Enterobacter* sp. C1D in Cr (VI)-amended soils. **Pedosphere**, v. 28, n. 1, p. 144–156, 2018.

SUN, R. et al. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp . DNB-S2 , isolated from black soil in Northeast China. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114612, 2020a.

SUN, Y. et al. Efficient removal of heavy metals by synergistic actions of microorganisms and waste molasses. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122797, 2020b.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metal toxicity and the environment. Em: LUCH, A. (Ed.). . **Molecular, clinical and environmental toxicology**. Springer ed. Basel: [s.n.]. p. 133–164.

TEITZEL, G. M.; PARSEK, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2313–2320, 2003.

THOMPSON, F. et al. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of the Total Environment**, 2019.

TORRE, A. LA; IOVINO, V.; CARADONIA, F. Copper in plant protection : current situation and prospects. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 57, n. 2, p. 201–236, 2018.

TSEKOVA, K.; KAIMAKTCHIEV, A.; TZEKOVA, A. Bioaccumulation of heavy metals by microorganisms. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 12, n. 2, p. 94–96, 1998.

ULLAH, A. et al. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28–40, 2015.

UNESCO. **The united nations world water development report 2020:**

water and climate change. UNESCO ed. Paris: [s.n.].

USEPA. **National primary drinking water regulationsUnited States Environmental Protection Agency**Washington, 2009.

VALENTA, R. K. et al. Re-thinking complex orebodies: consequences for the future world supply of copper. **Journal of Cleaner Production journal**, v. 220, p. 816–826, 2019.

VASCONCELOS, H. L. et al. Competitive adsorption of Cu (II) and Cd (II) ions on spray-dried chitosan loaded with Reactive Orange 16. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 613–618, 2009.

VASCONCELOS, M. et al. Gravity signature and physical properties of copper deposit in the Curaçá Valley , northern Bahia / Brazil-Case study. **Geophysical Prospecting**, v. 66, p. 1784–1795, 2018.

VERGILIO, C. DOS S. et al. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Nature**, v. 10, n. 5936, p. 1–12, 2020.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, p. 555–561, 2010.

WADA, Y. et al. Modeling global water use for the 21st century : the Water Futures and Solutions (WFaS) initiative and its approaches. **Geoscientific Model Development**, v. 9, p. 175–222, 2016.

WANG, B. et al. Cadmium and its epigenetic effects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2611–2620, 2012.

WANG, Q. F. et al. Biochemical and genetic basis of cadmium biosorption by *Enterobacter ludwigii* LY6, isolated from industrial contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 264, p. 114637, 2020.

WHEATER, H. S. **Proporcionar segurança hídrica em um mundo em transformação**. Disponível em: <https://pt.unesco.org/courier/2019-1/proporcionar-seguranca-hidrica-em-um-mundo-em-transformacao>. Acesso em: 10 fev. 2021.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum**Geneva, 2017.

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.

XU, C. et al. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU. **Chemosphere**, v. 173, p. 622–629, 2017.

ZHANG, H.; REYNOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms : a short review. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 761–767, 2019.

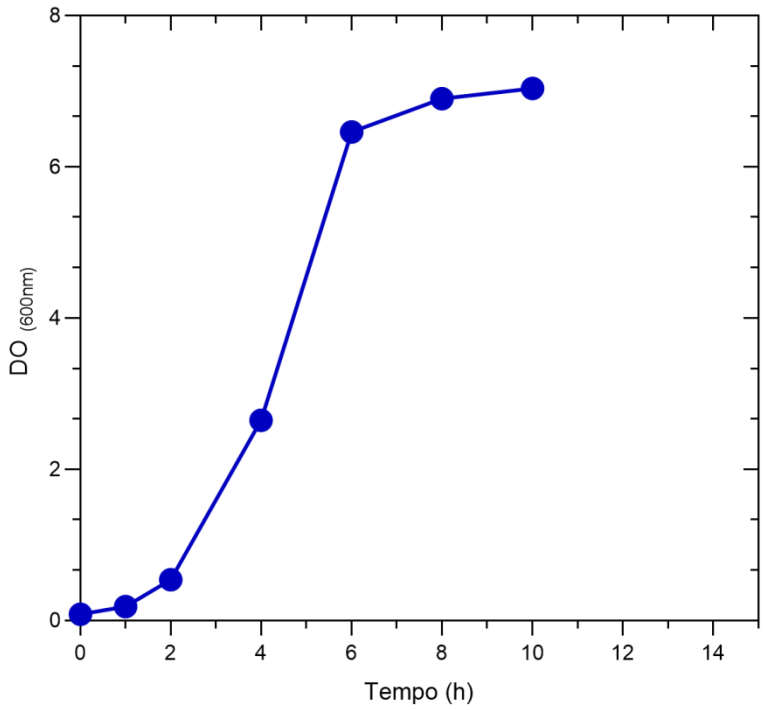
ZHANG, M. et al. Alleviation of Cd phytotoxicity and enhancement of rape seedling growth by plant growth – promoting bacterium *Enterobacter*.

Environmental Science and Pollution Research, v. 27, p. 33192–33203, 2020.

ZHENG, J. et al. Competitive sorption of heavy metals by water hyacinth roots. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 837–845, 2016.

ZORODDU, M. A. et al. The essential metals for humans : a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 120–129, 2019.

8. APÊNDICE A – Curva de crescimento do inóculo



No gráfico acima é apresentada a curva de crescimento para obtenção do inóculo de *Enterobacter* sp. UENF18. Esta cultura foi produzida a partir da alçada de uma placa fresca da cepa e foi utilizada como inóculo nos diferentes experimentos. Como pode ser observado no gráfico, a mid log ocorreu em torno 5 h de cultivo. Este momento da curva, no meio da fase logarítmica, corresponde ao crescimento ótimo das células. Por isso, foi adotado como tempo de cultivo do inóculo.

9. APÊNDICE B – Dados brutos do ensaio de Cinética de Crescimento sem ajuste e com ajuste de pH

Tempo (h)	Controle				$CuCl_2$ (mg L^{-1}) Sem ajuste											
					600				750				900			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
0	0,29	0,29	0,27	0,27	0,23	0,22	0,23	0,21	0,22	0,23	0,19	0,19	0,23	0,22	0,23	0,24
2	1,72	1,54	1,63	1,52	1,06	1,08	1,02	0,93	0,72	0,67	0,54	0,57	0,22	0,22	0,24	0,34
4	5,00	4,85	5,24	5,08	2,10	3,28	3,26	2,50	1,99	1,81	1,46	2,32	0,81	0,69	0,40	0,40
6	5,48	6,00	5,15	6,30	8,80	7,55	6,60	5,30	3,80	3,70	2,58	2,45	1,56	1,28	0,74	0,74
8	6,63	7,90	7,70	6,40	5,25	4,80	4,35	5,90	4,00	5,13	4,33	4,70	2,20	1,78	1,32	1,18
10	8,58	8,65	7,70	7,10	9,55	8,00	8,60	7,96	6,62	5,58	5,04	6,38	3,80	2,98	2,28	2,76
12	10,00	9,90	9,75	9,20	7,75	7,50	7,35	8,00	8,15	8,35	7,33	7,90	5,98	6,28	6,35	6,00
14	6,90	7,95	7,85	8,15	9,80	9,15	7,35	7,30	9,40	9,30	5,45	7,60	5,20	5,40	5,20	5,40

Tempo (h)	Controle				$CuCl_2$ (mg L^{-1}) Com ajuste											
					600				750				900			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
0	0,29	0,29	0,27	0,27	0,20	0,20	0,20	0,21	0,19	0,20	0,21	0,22	0,26	0,21	0,25	0,24
2	1,72	1,54	1,63	1,52	1,85	1,81	1,81	1,77	1,60	1,80	1,62	1,82	1,73	1,70	1,78	1,71
4	5,00	4,85	5,24	5,08	4,63	6,20	6,20	5,54	5,02	4,54	3,56	3,92	5,43	5,50	5,88	4,96
6	5,48	6,00	5,15	6,30	6,73	5,55	5,55	5,03	6,60	6,10	5,25	4,05	7,58	6,55	7,95	5,75
8	6,63	7,90	7,70	6,40	6,55	6,35	6,35	6,35	7,05	7,15	6,50	8,00	6,18	6,13	6,80	6,50
10	8,58	8,65	7,70	7,10	8,70	8,40	8,40	7,35	9,30	6,45	4,40	4,82	7,10	7,70	6,60	6,75
12	10,00	9,90	9,75	9,20	8,00	8,55	8,55	9,40	6,10	8,55	6,40	8,20	7,40	9,20	7,55	7,10
14	6,90	7,95	7,85	8,15	9,75	9,25	9,25	9,75	5,00	8,30	6,30	7,05	9,75	8,70	9,75	8,70

10. APÊNDICE C – Dados brutos do ensaio de Cinética de Crescimento com Cu e Cd

Tempo (h)	Controle									600 mg L^{-1} de Cu								
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Rep9	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Rep9
0	0,32	0,30	0,33	0,23	0,248	0,25	0,31	0,32	0,31	0,262	0,26	0,254	0,18	0,182	0,18	0,25	0,26	0,24
4	5,975	6,35	6,25	4,78	5,425	5,58	5,05	4,85	5,28	2,32	2,19	2,4	1,99	1,8	1,99	2,35	2,58	2,43
8	8	7,83	9,9	8,23	7,8	7,25	7,25	7,70	7,88	6,825	7,40	4,8	9,03	8,425	8,43	7,80	7,50	7,90
12	9,375	9,28	10,325	10,88	11,525	11,05	9,43	8,78	8,78	7,35	8,28	6,75	6,80	7,275	6,95	7,80	7,93	7,60
16	6,325	9,60	8,35	9,90	7,45	9,10	9,20	8,15	7,85	8,325	12,40	6,7	8,15	8,25	8,55	6,50	7,93	8,25
20	6,425	8,13	7,6	8,80	8,325	8,95	7,13	7,05	6,88	6,575	7,90	5,2	8,93	10,8	11,15	6,83	6,58	7,53
24	10,75	7,58	7,675	8,10	9,875	8,58	6,15	6,15	6,38	8,25	7,58	8,625	8,73	8,15	7,98	5,05	4,40	6,63
28	8,175	7,70	7,225	6,98	7,6	7,25	6,10	6,25	5,80	**6,55**	8,48	7,025	8,05	9,2	8,83	5,68	6,75	4,90

Tempo (h)	500 mg L^{-1} de Cd									600 mg L^{-1} de Cu + 500 mg L^{-1} de Cd								
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Rep9	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Rep9
0	0,202	0,21	0,204	0,19	0,352	0,20	0,22	0,23	0,24	0,234	0,23	0,234	0,18	0,168	0,17	0,22	0,23	0,21
4	0,182	0,20	0,18	0,16	0,326	0,17	0,22	0,23	0,24	0,258	0,32	0,242	0,25	0,254	0,27	0,25	0,23	0,25
8	0,188	0,20	0,194	0,19	0,316	0,19	0,22	0,23	0,22	0,362	0,40	0,33	0,32	0,342	0,32	0,33	0,33	0,35
12	0,154	0,17	0,156	0,17	0,308	0,16	0,20	0,21	0,20	0,69	0,65	0,486	0,52	0,532	0,50	0,50	0,48	0,53
16	0,148	0,15	0,15	0,14	0,272	0,14	0,17	0,20	0,19	3,22	3,05	2,09	1,80	1,75	1,70	2,03	1,81	2,25
20	0,154	0,15	0,146	0,14	0,306	0,14	0,19	0,19	0,19	4,175	4,93	4,05	5,70	5,6	6,00	4,90	4,78	5,45
24	0,134	0,14	0,152	0,13	0,29	0,14	0,20	0,18	0,18	6,55	6,40	6,675	8,23	7,425	7,98	7,18	6,98	6,98
28	0,146	0,16	0,152	0,14	0,314	0,13	0,20	0,18	0,19	7,525	8,40	7,45	7,58	8,025	7,50	7,03	7,28	7,00

11. APÊNDICE D – Dados brutos do ensaio de Cinética de Crescimento de Cd

Tempo (h)	$CdCl_2$ (mg L^{-1})					
	500 (controle)			500 (cultivo prévio em Cu)		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
0	0,111	0,104	0,111	0,084	0,087	0,083
2	0,111	0,102	0,110	0,073	0,082	0,083
4	0,100	0,088	0,100	0,067	0,078	0,077
6	0,092	0,084	0,087	0,072	0,077	0,077
8	0,091	0,083	0,089	0,070	0,076	0,077
12	0,120	0,110	0,120	0,062	0,070	0,077
16	0,104	0,100	0,117	0,069	0,070	0,071
20	0,131	0,096	0,065	0,062	0,065	0,070

12. APÊNDICE E – Dados brutos do ensaio de biofilme

Tempo (h)	Controle			600 mg L^{-1} de Cu			500 mg L^{-1} de Cd			Cu-Cd		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
28	0,461	0,3	0,248	2,358	2,193	2,033	0,174	0,18	0,083	3,167	3,18	3,191