

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS BACTERIANOS AOS
METAIS TÓXICOS CROMO E ZINCO**

MÁRCIA CAETANO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2022

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS BACTERIANOS AOS
METAIS TÓXICOS CROMO E ZINCO**

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

MÁRCIA CAETANO

Orientador: Dr. Fabio Lopes Olivares

Co-orientador: Dr^a. Letícia Oliveira da Rocha

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

Caetano, Márcia.

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS BACTERIANOS AOS METAIS TÓXICOS CROMO E ZINCO. Márcia Caetano. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

65 f. : il.

Bibliografia: 56 - 65.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Biorremediação. 2. Resistência microbiana. 3. Poluição ambiental. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CCD - 660.6

MÁRCIA CAETANO

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS BACTERIANOS AOS METAIS
TÓXICOS CROMO E ZINCO**

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 11 de março de 2022.

Banca Avaliadora:



PhD. Fabio Lopes Olivares (orientador)
Doutorado em Agronomia - UFRRJ
Universidade Estadual do Norte Fluminense



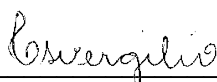
DSc. Letícia Oliveira da Rocha (co-orientadora)
Doutorado em Biociências e Biotecnologia - UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense



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



DSc. Antônio Jesus Dorighetto Cogo
Doutorado em Biociências e Biotecnologia - UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense



DSc. Cristiane dos Santos Vergílio
Doutorado em Biociências e Biotecnologia - UENF
Universidade Federal do Espírito Santo

*Esta Dissertação é dedicada às pessoas
mais importantes da minha vida, minha
querida família. Em especial, aos meus
amados avós Celso Caetano da Silva e
Marise Pereira Caetano, que sempre
acreditaram em mim.*

Saudades eternas

AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar e me dar forças para seguir em diante mesmo nas horas mais difíceis;

A todos os professores que tive em minha vida. Em especial, a professora Lídia (Ensino Fundamental), aos professores Dith, Joaci, Ralph, Renato e Sílvia (Ensino Médio) e as professoras Ana Paula, Maria Amélia e Natália (Ensino Superior), cujos reflexos utilizo na minha conduta como professora hoje.

Aos meus leais amigos Ana Lúvia, Caroline e Rafael, por estarem na torcida por mim e por tornarem meus dias mais alegres e completos. Em especial a Rafael por embarcar comigo nesse sonho e não medir esforços para me ajudar a sair do marco zero.

Ao meu marido Marcus Vinícius, por todo amor, parceria, por me motivar incansavelmente nos momentos de desânimo e por tornar minha vida mais bela.

Ao meu orientador Fábio, pela paciência, suporte intelectual, por não medir esforços para ajudar em nenhum momento e pela dedicação em fazer pesquisa de qualidade, você é uma inspiração para mim.

A minha maravilhosa e indescritível co-orientadora Letícia, por todo ensinamento, disponibilidade, tamanho comprometimento, risadas de todos os dias e principalmente pela amizade, que em tantos momentos serviu de motivação para meu crescimento pessoal, profissional e intelectual.

A todos colegas de equipe do LBCT, em especial a Gilberto, Jaqueline e Lidiane por todo apoio, acolhimento, troca de experiências e por tornarem meus dias mais leves.

Aos membros da banca, DSc. Aline Chaves Intorne, DSc. Antônio Jesus Dorighetto Cogo e DSc. Cristiane dos Santos Vergílio, por terem aceitado o convite e pelas ricas contribuições ao trabalho.

Aos professores, técnicos e colegas do LBCT que, de algum modo, contribuíram para eu chegar aqui.

Ao CNPq e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

A UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pelo apoio científico e pela oportunidade de realização do Mestrado.

RESUMO

O aumento da contaminação por metais tóxicos em diferentes ecossistemas tem se tornando um fator de preocupação mundial. Neste contexto, bactérias de diferentes gêneros têm demonstrado a habilidade de tolerar e remediar ambientes contaminados com vários metais, tornando-se alvo de diferentes estudos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de seis isolados bacterianos aos metais tóxicos cromo e zinco. Para tanto, a pureza dos isolados foi avaliada através de ensaios morfológicos em microscopia de luz, bem como avaliação do crescimento das colônias em placas de meio NB sólido. Após confirmação da pureza, ensaios de cinética de crescimento dos isolados em meio de cultura Nutrient Broth (NB) líquido e sólido (ensaio de concentração inibitória mínima) suplementados com 5 g.L^{-1} das soluções de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram realizados em triplicata e a variação de pH no meio foi medida em todas as condições. A viabilidade das células foi avaliada através da semeadura dos isolados obtidos a partir do meio de cultura líquido suplementado com metais tóxicos em placas de meio NB sólido, a fim de avaliar a integridade da membrana plasmática através da microscopia de epifluorescência. Para cada isolado, a formação e quantificação do biofilme foi avaliada na presença ou ausência de metais tóxicos, a fim de demonstrar caracteres fenotípicos relacionados a resistência microbiana em situações de estresse. A quantificação de biofilme foi obtida através da análise de densidade óptica (D.O) em espectrofotômetro e as imagens do mesmo capturadas através da microscopia de luz. Os dados obtidos sugerem que mesmo em condições de estresse e na presença de altas concentrações (480 mg.L^{-1}) de Cr e Zn, os isolados avaliados demonstraram crescimento elevado da população bacteriana, exceto para as estirpes 7B.B e 16D.B, bem como a viabilidade em placa foi demonstrada para os diferentes isolados, a exceção de 10D.B, 16D.B e 22A que apresentaram uma característica bacteriostática para ambos os metais. Os ensaios de biofilme demonstraram que em condições de estresse, a formação do mesmo é estimulada, possivelmente como estratégia de proteção as células, aumentando a possibilidade de resistência do microrganismo aos metais tóxicos. Assim, foi possível demonstrar que os isolados bacterianos apresentaram características de resistência na presença dos metais tóxicos cromo e zinco, podendo assim colaborar para trabalhos futuros em biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-chave: Biorremediação, resistência microbiana, poluição ambiental.

ABSTRACT

The increase in contamination by toxic metals in different ecosystems has become a factor of global concern. In this context, bacteria of different species have demonstrated the ability to tolerate and alleviate environments contaminated with various metals, becoming the target of different studies. Thus, the objective of this work was to evaluate the resistance of six bacterial isolates to the toxic metals chromium and zinc. For that, the purity of the isolates was evaluated through morphological assays in light microscopy, as well as evaluation of the colony growth in plates of solid Nutrient Broth (NB) medium. After confirming the purity, growth kinetics tests of the isolates in liquid and solid NB culture medium (minimum inhibitory concentration assay) supplemented with 5 g.L⁻¹ of potassium dichromate (K₂Cr₂O₇·7H₂O) and zinc sulfate (ZnSO₄·7H₂O) solutions were performed in triplicate and the pH variation in the medium was measured under all conditions. Cell viability was evaluated by spot the bacteria suspension obtained from the liquid culture medium supplemented with toxic metals onto plates of solid NB medium, in order to assess the integrity of the plasma membrane by epifluorescence microscopy. For each isolate, biofilm formation and quantification were evaluated in the presence or absence of toxic metals, in order to demonstrate phenotypic characters related to microbial resistance in stress situations. Biofilm quantifications was obtained through optical density analysis (O.D.) in a spectrophotometer and its images captured through light microscopy. The data obtained suggest that even under stress conditions and in the presence of high concentrations (480 mg.L⁻¹) of Cr and Zn, the evaluated isolates showed a high growth of the bacterial population, except for strains 7B.B and 16D.B, as well as the viability on plaque was demonstrated for the different isolates, with the exception of 10D.B, 16D.B and 22A that showed a bacteriostatic characteristic for both metals. Biofilm assays showed that under stress conditions, its formation is stimulated, possibly as a cell protection strategy, increasing the possibility of microorganism resistance to toxic metals. Thus, it was possible to demonstrate that the bacterial isolates presented resistance characteristics in the presence of the toxic metals chromium and zinc, thus being able to collaborate for future works in bioremediation of contaminated environments.

Keywords: Bioremediation, microbial resistance, environmental pollution.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL	13
2.2 METAIS TÓXICOS: CROMO E ZINCO.....	14
2.3 CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS ENVOLVIDAS NA RESISTÊNCIA A METAIS TÓXICOS	16
2.4 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DE CAPTAÇÃO DE METAIS	18
2.5 PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO	21
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1 CEPAS BACTERIANAS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	27
4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES DOS METAIS	27
4.4 CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO	28
4.5 TESTE DE RESISTÊNCIA.....	28
4.5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO	28
4.5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	28
4.6 DETERMINAÇÃO DE pH.....	29
4.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	29
4.7.1 VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DE <i>KIT LIVE/DEAD</i>	29
4.7.2 VIABILIDADE CELULAR EM PLACA DE PETRI	30
4.8 FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO	30
4.8.1 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO NA PRESENÇA DE METAIS TÓXICOS	31

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5. RESULTADOS	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS	33
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO	34
5.3 DETERMINAÇÃO DE pH.....	35
5.4 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	38
5.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	43
5.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	45
5.6.1 Viabilidade celular por <i>LIVE/DEAD</i> [®]	45
5.6.2 Viabilidade celular em placa de Petri	46
5.7 FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO	48
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO.....	55
8. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

°C: Graus Celsius

CIM: Concentração Inibitória Mínima

Cr: Cromo

DO: Densidade óptica

g: Grama

h: Hora

KOH: Hidróxido de potássio

K₂Cr₂O₇: Dicromato de potássio

L: Litro

M: Molar

Min: Minutos

mg.Kg⁻¹: Miligrama por quilograma

mg.L⁻¹: Miligrama por litro

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

NaCl: Cloreto de sódio

NB: Nutrient Broth

nm: Nanômetro

ONU: Organização das Nações Unidas

pH: Potencial de hidrogênio

rpm: Rotações por minuto

Zn: Zinco

ZnSO₄: Sulfato de zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência bacteriana a metais.....	17
Figura 2: Co-ocorrência de genes de resistência a antibióticos (ARGs), genes de resistência a metais (MRGs) e genes de resistência a biocidas (BRGs)22.....	19
Figura 3: Mecanismos bacterianos de resistência ao cromato.....	20
Figura 4: Sistemas bacterianos de tolerância ao Zn.....	21
Figura 5: Mecanismos de interação metal-micróbio durante aplicações de biorremediação.....	23
Figura 6: Caracterização morfológica das células de isolados bacterianos.....	34
Figura 7: Cinética de crescimento dos isolados bacterianos.....	34
Figura 8: Valor de pH demonstrado em meio NB líquido na presença de metais tóxicos.....	35
Figura 9: Valor de pH na presença de bactérias cultivadas em meio de cultura suplementado com metais pesados.....	37
Figura 10: Curva de crescimento exponencial bacteriano na presença de cromo.....	40
Figura 11: Curva de crescimento exponencial bacteriano na presença de zinco.....	42
Figura 12: CIM de Cr para os isolados bacterianos	43
Figura 13: CIM de Zn para os isolados bacterianos.....	44
Figura 14: Viabilidade celular dos isolados bacterianos em presença de cromo.....	45
Figura 15: Viabilidade celular dos isolados bacterianos em presença de zinco.....	46
Figura 16: Viabilidade celular em placa na presença de cromo.....	47
Figura 17: Viabilidade celular em placa na presença de zinco.....	48
Figura 18: Formação e quantificação de biofilme.....	49
Figura 19: Visualização e quantificação de biofilme na ausência e presença de metal tóxico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores orientadores para solo (mg.kg^{-1} de peso fresco)	14
Tabela 2: Características gerais dos metais cromo e zinco.	16
Tabela 3: Bactérias com potencial de biorremediação dos metais tóxicos cromo e zinco.	22
Tabela 4: Características gerais dos isolados e do solo de origem das amostras.	27

1. INTRODUÇÃO

Segundo estudos da ONU (2017), a população global atual é de 7,6 bilhões de habitantes e a projeção é que até 2030 esse número atinja 8,6 bilhões. O desenvolvimento da sociedade tem contribuído grandemente para a geração de resíduos com potencial de contaminação de ambientes, como solo e água (CONCEIÇÃO et al., 2007).

A intensificação das atividades industriais e agrícolas tem aumentado o risco de poluição dos solos por metais tóxicos (ANDRADE, 2009). Alguns metais são essenciais e participam de processos biológicos, regulando a expressão gênica e a atividade de biomoléculas (BRUINS et al., 2000). No entanto, em altas concentrações, mesmo metais essenciais tornam-se tóxicos. Estes metais podem ser absorvidos pelas plantas e eventualmente se acumular no corpo humano, causando problemas (LIANG et al., 2013; ZHANG et al., 2018). Quando lançados no solo, esses metais podem ser retidos pelo solo ou sofrer lixiviação atingindo águas subterrâneas (GONÇALVES et al. 2013).

Dentre os metais tóxicos mais comuns estão chumbo (Pb), cádmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), mercúrio (Hg) e zinco (Zn) (CORRÊA et al., 2008). O cromo e o zinco são importantes componentes funcionais e estruturais dos seres vivos devido capacidade de perder elétrons facilmente, formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos (BENITE et al., 2007; BERTOLAZI et al., 2010).

Nesse sentido, grandes esforços têm sido feitos para integrar conhecimentos que facilitem a reabilitação de solos contaminados com metais tóxicos e, assim, possibilitar o retorno da funcionalidade e estabilidade do ecossistema (ANDRADE, 2009). Uma alternativa viável, econômica e ecológica é a biorremediação, que consiste no uso de seres vivos, principalmente bactérias e fungos para transformar substâncias tóxicas em compostos inertes (FRANCISCO; QUEIROZ, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de isolados bacterianos aos metais cromo e zinco. Para tanto, bactérias isoladas da Coleção de Cultura de Microrganismos do LBCT/UENF oriundas de amostras de serapilheira e solo foram coletadas da Estação Ecológica de Guaxindiba – RJ foram selecionadas para este propósito. Em seguida, a resposta dos isolados foi estudada por meio de ensaios de viabilidade celular e testes de resistências.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLUIÇÃO AMBIENTAL

O aumento da população mundial e das atividades industriais tem se tornado responsável pelo aumento da poluição ambiental (DAS; DASH, 2017). Uma das maiores preocupações ambientais é a poluição do solo, devido a influência que este sofre por contaminantes, como metais tóxicos, que ocupam um lugar de destaque e estão sendo intensamente estudados (FERNÁNDEZ, 2017). A fauna e a flora sofrem efeitos direto e indireto, bem como os ambientes aquáticos, terrestres e atmosféricos (DAS; DASH, 2017). A poluição do ambiente por metais tóxicos representa um importante problema ecológico devido ao impacto negativo desses metais, que se acumulam ao longo da cadeia alimentar e resultam em graves problemas ecológicos e de saúde (BHOJIYA et al., 2016).

Segundo a lei nº 6.938/1981 – Art. 3º, poluição trata-se da degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente: prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; afetem desfavoravelmente a biota; afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente; lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos.

Os metais tóxicos, capazes de poluir ambientes, podem ser de ocorrência natural (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017), tais como cometas, erosão, erupções vulcânicas, incêndios florestais e intemperismo de minerais (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017) ou de fontes antropogênicas, como fabricação de explosivos, resíduos sólidos industriais, curtimento de couro, mineração, pesticidas e fertilizantes, materiais fotográficos, pigmentos de impressão, fundição, siderurgia e indústrias de galvanoplastia, têxteis e tinturas (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017 apud BHAT et al., 2020).

Os metais são elementos essenciais para os seres vivos (SOUZA, 2010). Muitos deles têm grande utilidade para o homem, pois são empregados na fabricação de utensílios como canos, baterias e pilhas, no entanto, também estão entre os agentes tóxicos mais conhecidos (INTORNE, 2012). Além da toxicidade, esses elementos podem ser bioacumulados, passando de uma espécie para outra ao longo da cadeia alimentar (INTORNE, 2012). O descarte desses resíduos com elevada toxicidade fora dos padrões da legislação ambiental vigente (Tabela 1), bem como a

sua incorreta manipulação nos diversos ecossistemas naturais, ocasionam danos ao ambiente (GRAZZIOTIN, 2015).

Tabela 1: Valores de metais tóxicos orientados para solo (mg.kg^{-1} de peso fresco de solo).

Substâncias	Valores de Prevenção	Valores de Referência da Qualidade	Valores de Investigação		
			Agrícola	Residencial	Industrial
Arsênio	15	0,60	35	55	150
Bário	150	84	300	500	750
Cádmio	1,3	0,5	3	8	20
Chumbo	72	13	180	300	900
Cobalto	25	4	35	65	90
Cobre	60	5	200	400	600
Cromo	75	35	150	300	400
Mercurio	0,5	0,1	12	36	70
Níquel	30	9	70	100	130
Vanádio	-	24	-	-	1000
Zinco	300	35	450	1000	2000

Fonte: CONAMA (2009).

2.2 METAIS TÓXICOS: CROMO E ZINCO

Os metais são materiais sólidos em temperatura ambiente, brilhantes, maleáveis, com propriedades dúcteis e boa condutividade elétrica e térmica (DAS; DASH, 2017). Todos os metais, independentemente de serem essenciais ou não, podem exibir efeitos tóxicos em níveis elevados (MANI; KAMUR, 2013).

O cromo (Cr) é um metal cinza-aço, lustroso, duro e muito resistente à corrosão, que constitui $0,1\text{-}0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ da crosta terrestre (DHALL et al., 2013). Não é encontrado livre na natureza, aparecendo na maioria das vezes como óxidos (QUINÁGLIA, 2006). É um micronutriente essencial necessário para o crescimento de muitos organismos, porém, em alta concentração é tóxico e cancerígeno (THACKER et al., 2006). Entre as principais aplicações do Cr, pode-se citar a galvanoplastia, fabricação de aço e automóveis, mineração, curtimento de couro, cimento, têxtil, produção de pigmentos e tinta e preservação de madeira (DHALL et al., 2013).

O cromo pode ser encontrado em diversos estados de oxidação, variando de Cr^{2+} a Cr^{6+} , entretanto no solo as formas mais estáveis são a espécie trivalente Cr (III) e a hexavalente Cr (VI) (DHALL et al., 2013). Na forma hexavalente, o cromo é solúvel em água, enquanto na forma trivalente tende a ser adsorvido na superfície do solo ou precipitar como hidróxido de cromo em um ambiente ligeiramente ácido e alcalino (DHALL et al., 2013). O Cr (VI) é a forma mais tóxica, capaz de entrar nas células vivas

através das vias de transporte de fosfato e sulfato e dentro das células, esses íons produzem estresse oxidativo devido ao seu alto potencial de oxidação (DAS; DASH, 2017).

A ameaça desses metais à saúde humana e animal é agravado por sua persistência de longo prazo no ambiente (MANI; KAMUR, 2013), uma vez que não podem ser decompostos por processos químicos ou biológicos (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017). Os sintomas imediatos de exposição ao Cr incluem espasmos, reações asmáticas e brônquicas. Outros efeitos da exposição aguda por inalação a Cr resultam efeitos gastrointestinais e neurológicos (DAS; DASH, 2017). As manifestações tóxicas dependem de dose, via de exposição, espécies químicas, genética e estado nutricional dos indivíduos expostos (TCHOUNWOU et al., 2012).

O zinco (Zn) é um metal branco-azulado, brilhante e estável ao ar seco (QUINÁGLIA, 2006). É um elemento essencial a todos os seres em concentrações-traço (YAHAGHI et al., 2019) e na natureza, pode ser encontrado em várias formas: sulfeto de zinco (ZnS), óxido de zinco (ZnO), carbonato de zinco (ZnCO₃) e silicato (Zn₄Si₂O₇[OH]₂) (QUINÁGLIA, 2006). Sua disponibilidade no solo depende de condições físicas e químicas, como sua mobilidade, pH, salinidade, solubilidade da forma química, potencial redox, entre outros (QUINÁGLIA, 2006).

O Zn ocorre exclusivamente como cátion bivalente Zn²⁺ e quando seus orbitais estão completamente preenchidos, não é capaz de sofrer mudanças redox sob condições biológicas (CHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2001). Entre suas fontes antrópicas estão indústrias de óxido de zinco, tintas, borrachas, fungicidas, indústrias de plástico, pilhas e baterias, indústria têxtil, galvanoplastia e ligas de latão (QUINÁGLIA, 2006).

Além disso, o Zn é componente de mais de 200 enzimas de diferentes espécies, onde atua indispensavelmente como estabilizador de membranas e várias macromoléculas (CHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2001). As inúmeras funções desse metal são consideradas funções celulares básicas, como replicação de DNA, transcrição, divisão celular e ativação celular (CHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2001). Também atua ativamente no crescimento e atividades enzimáticas de bactérias (BHOJIYA; JOSHI, 2012).

O zinco apresenta também difícil degradação, migração e absorção biológica, causando danos não somente ao ambiente, como também a saúde humana (HUANG et al., 2020). Em concentrações elevadas, mostra toxicidade (BHOJIYA; JOSHI, 2012) e geralmente prejudica a atividade dos microrganismos, afetando a estrutura, as

funcionalidades das membranas biológicas e inibindo a atividade enzimática (HUANG et al., 2020).

Tabela 2: Características gerais dos metais cromo e zinco.

	Cromo (Cr)	Zinco (Zn)
Localização na tabela periódica	4º período Grupo 6	4º período Grupo 12
Número atômico	24	30
Massa atômica	52	65
Configuração de valência	3d ⁵ , 4s ¹	3d ¹⁰ , 4s ²
Densidade (g/cm³)	7,19	7,14
Ponto de fusão (°C)	1907	419,53
Ponto de ebulição (°C)	2671	907

Fonte: <https://www.tabelaperiodica.org>. Acesso em: 08/05/2021.

2.3 CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS ENVOLVIDAS NA RESISTÊNCIA A METAIS TÓXICOS

A exposição de microrganismos a concentrações excessivas de metais afeta adversamente seu crescimento, morfologia (PRAPAGDEE; WATCHARAMUSIK, 2009) e atividades microbianas, como produtividade primária, fixação de nitrogênio, respiração, ciclagem biogeoquímica de alguns elementos, decomposição da matéria orgânica e síntese enzimática (BRAVO, 2018).

Muitos microrganismos demonstram resistência a metais na água, solo e resíduos industriais (BRUINS et al., 2009). Bactérias, por exemplo, se adaptam e resistem à presença de metais tóxicos, devido à presença de genes localizados em cromossomos, transposons e plasmídeos (BRUINS et al., 2009). Para sobreviver a estas condições, estes organismos precisaram desenvolver mecanismos capazes de auxiliar para lidar com esses poluentes sem se prejudicar (KARMAKAR et al., 2019).

Mecanismos de resistência bacteriana a metais (Figura 1) são conhecidos por exclusão de metais por barreiras permeáveis, transporte ativo de metais, sequestro intracelular, sequestro extracelular e desintoxicação enzimática (OVES et al., 2016).

Além disso, também são incluídos mecanismos de síntese de peptídeos, proteínas ou substância extracelular polimérica (EPS) (PRAPAGDEE; WATCHARAMUSIK, 2009).

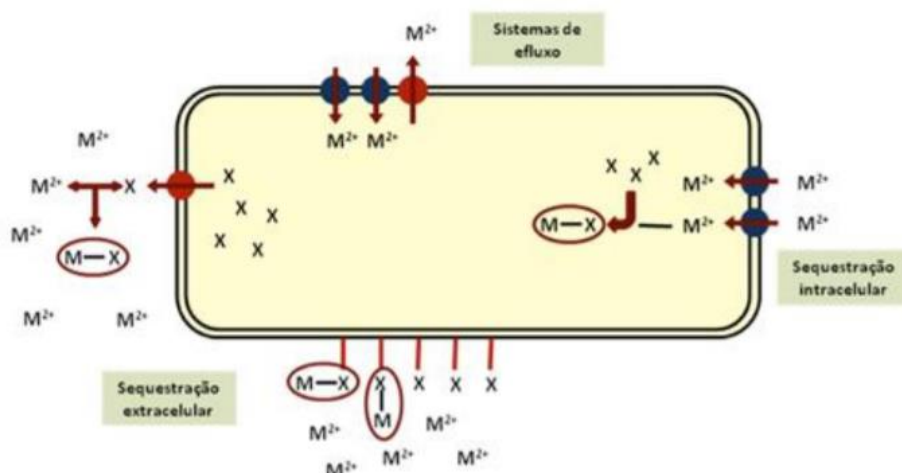


Figura 1: Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência bacteriana a metais. Onde: M^{2+} = metal tóxico; X = constituintes da célula que interagem com os metais. BRAVO (2018).

A exclusão por barreira de permeabilidade consiste num processo que visa proteger componentes celulares essenciais, sensíveis a metais (BRUINS et al., 2009), realizando alterações na parede celular, membrana celular ou envelope do microrganismo (BRUINS et al., 2009). As bactérias que formam um revestimento de polissacarídeo extracelular, por exemplo, demonstram capacidade de adsorver íons metálicos e impedi-los de interagir com componentes celulares vitais (BRUINS et al., 2009).

Outra forma de resistência bacteriana são os mecanismos de transporte ativo para exportar metais tóxicos do citoplasma, que podem ser de origem cromossômica ou codificados por plasmídeos (BRUINS et al., 2009). Neste mecanismo, ocorre a expulsão de metais não essenciais que normalmente entram na célula por meio de sistemas de transporte de nutrientes (BRUINS et al., 2009). Já o sequestro intracelular, trata-se do acúmulo de metais dentro do citoplasma para evitar a exposição a componentes celulares essenciais, e é realizado por meio da ligação de metais a proteínas (BRUINS et al., 2009).

As bombas de efluxo, por sua vez, são proteínas que transportam os metais tóxicos do meio intracelular para o meio extracelular, na tentativa de manter mínima a concentração destes no interior da célula (NIES; SILVER, 1995). Outra estratégia adotada pela comunidade microbiana é a desintoxicação enzimática, onde ocorre a conversão do íon metálico mais tóxico em espécies menos tóxicas (SILVER, 1996).

A síntese de substância extracelular polimérica realizada pela maioria das bactérias é outra alternativa encontrada por esses microrganismos para suportar a presença de metais tóxicos (MARTINS et al., 2008). Essas substâncias poliméricas extracelulares compreendem uma mistura de polissacarídeos, mucopolissacarídeos e proteínas que desempenham papel muito importante na bio sorção de metais (MARTINS et al., 2008).

2.4 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DE CAPTAÇÃO DE METAIS

As bactérias são os menores e mais abundantes organismos existentes no solo (QUEIROZ, 2015) e para sobreviver, necessitam controlar a importação de metais em seu citoplasma, a fim de adquirir esses metais essenciais em quantidades suficientes para o seu metabolismo (CHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2001). Recentemente, ferramentas modernas de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica foram aplicadas para investigar a biologia de sistemas de comunidades microbianas em ambientes (CHAKRABORTY et al., 2012).

Já é conhecido que a capacidade de tolerância de microrganismos a metais está associada a mecanismos codificados por genes (MINARE et al., 2016) e estes genes de resistência podem ser cromossômicos ou extracromossômicos, denominados plasmídeos, que por vezes também carregam resistência a vários antibióticos (ROSEN, 1996). Conforme relatado, há evidências que bactérias co-resistentes a metais tóxicos e a antibióticos, residentes em estação de tratamento de água residual, apresentam integrons classe 1 (DI CESARE et al., 2016) sendo estes constituídos por um conjunto de elementos genéticos em uma região conservada 5' e sua formação caracterizada por um gene *int1* (MENDES et al., 2006). Vários genes de resistência a metais pesados (HMRGs), genes resistentes a antibióticos (ARGs) e genes resistentes a biocidas (BRGs) ocorrem simultaneamente em bactérias (Figura 2) (DI CESARE et al., 2016). Neste contexto, foi demonstrado por Baldiris et al. (2018) que a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* exibiu resistência múltipla a antibióticos e aos metais zinco, níquel e cobre.

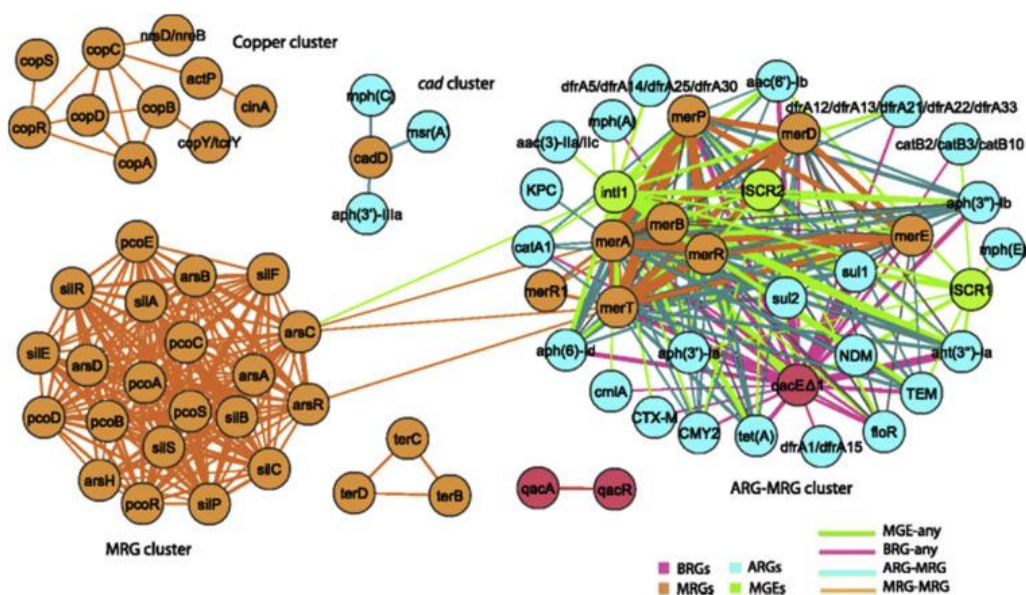


Figura 2: Co-ocorrência de genes de resistência a antibióticos (ARGs), genes de resistência a metais (MRGs) e genes de resistência a biocidas (BRGs). A espessura das linhas está relacionada à frequência das co-ocorrências. PAL et al. (2015) adaptado por YU et al. (2017).

Habitualmente, genes localizados em plasmídeos codificam transportadores de membrana, responsáveis por mediar diretamente o efluxo de íons cromato do citoplasma (Figura 2) (RAMIRES-DÍAZ et al., 2007). Por outro lado, sistemas de resistência codificados por cromossomos estão geralmente relacionados a estratégias específicas, como redução de Cr (VI), desintoxicação, reparação de danos ao DNA, entre outros (Figura 2) (RAMIRES-DÍAZ et al., 2007).

O efluxo de cromato é um mecanismo de resistência conferido pela proteína ChrA, uma bomba quimiosmótica codificada pelos plasmídeos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* e pMOL28 de *Cupriavidus metalli durans* (RAMIRES-DÍAZ et al., 2007). A redução de Cr (VI) para Cr (III) (Figura 3) pode ser considerada um mecanismo adicional de resistência ao cromato (RAMIRES-DÍAZ et al., 2007) e como é relatado em Baldiris et al. (2018), diferentes redutases de cromato, como ChrR, YieF, Nema e LpDH catalisam a redução de Cr (VI) para Cr (III) em bactérias resistentes ao cromo.

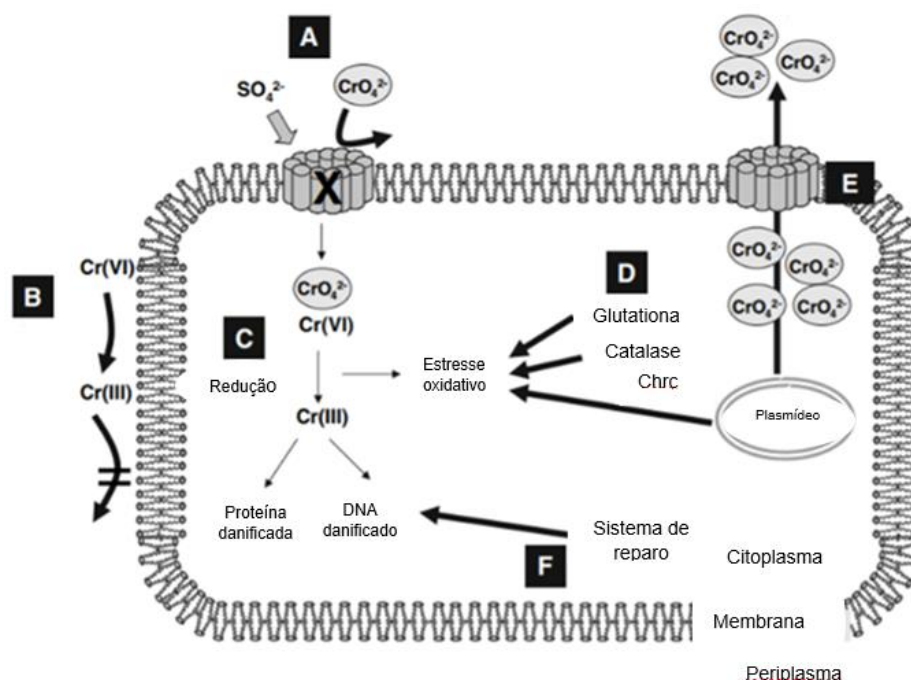
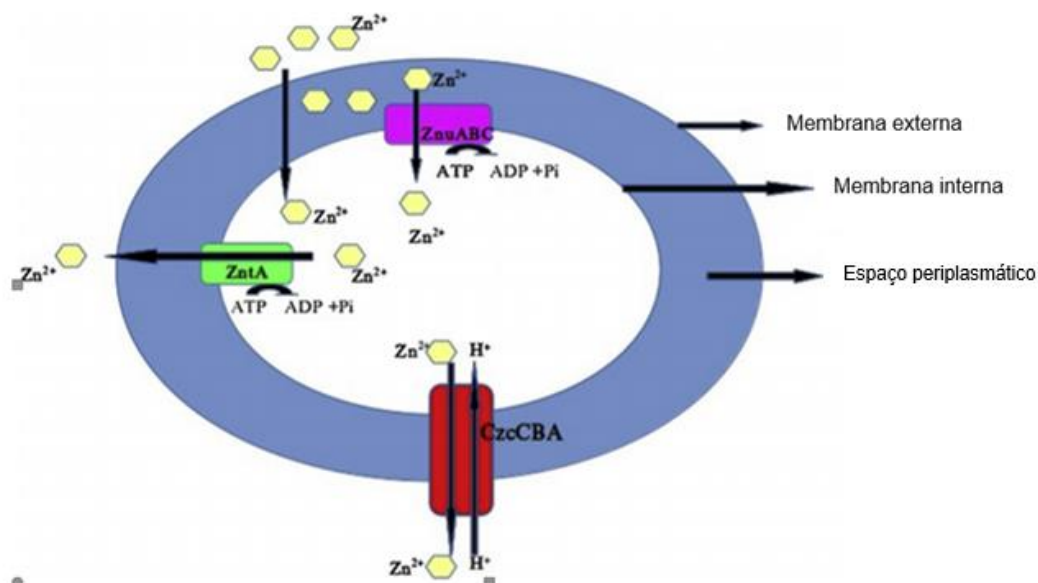


Figura 3: Mecanismos bacterianos de resistência ao cromato. Mecanismos de dano e resistência são indicados por setas finas e espessas, respectivamente. (A) Via de absorção de sulfato codificada por cromossomo, que também é usada por cromato para entrar na célula. (B) Redução extracelular de Cr (VI) para Cr (III). (C) Redução intracelular de Cr (VI) para Cr (III) podendo gerar estresse oxidativo. (D) Enzimas desintoxicantes são envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo. (E) Transportadores codificados por plasmídeos podem realizar efluxo de cromato do citoplasma. (F) Sistemas de reparo de DNA participam da proteção contra os danos gerados pelo Cr e seus derivados. Adaptado de RAMIRES-DÍAZ et al. (2007).

Neste contexto, são descritos ainda dois sistemas de efluxo relatados em bactérias para regular a resistência de zinco: a ATPase (codificada pelo gene *zntA*), que permite o efluxo por meio de transporte ativo (Figura 4) e o transportador dirigido por resistência, nodulação e divisão (RND) administrado por gradiente de prótons (NANDA et al., 2019). Enquanto ATPases do tipo P transportam zinco apenas através da membrana celular, os sistemas RND realizam este transporte através da parede celular completa de certas bactérias (CHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2001).

Figura 4: Sistema de bombas de zinco em bactérias.



ao Zn. ZntA é um tipo ATPase que permite o efluxo de zinco por meio de transporte ativo. O ZnuABC é um sistema de transporte de zinco dependente de proteína de ligação periplasmática. O sistema Czc é um sistema operon transmitido por plasmídeo que, além de zinco também confere resistência ao cádmio e cobalto que funciona como efluxo de cátions. Adaptado de NANDA et al. (2019).

Outro sistema que confere resistência bacteriana ao zinco, cádmio e cobalto é o Czc, cujo operon presente no plasmídeo pMOL30 consiste em três genes estruturais: *czcC*, *czcB* e *czcA*, e seus produtos formam bombas de efluxo de cátions (Figura 4) (CHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2001). Estudos realizados em Legatzki et al. (2003) demonstraram que o zinco e cádmio foram removidos das células de *Ralstonia metallidurans* pela bomba de efluxo CzcCBA e por duas ATPases do tipo P transportadoras: CadA e ZntA. Choudhury; Srivastava (2001) confirmaram que a proteína ZRC-1 é a responsável pela resistência a zinco em *Saccharomyces cerevisiae* e Znt-1 e Znt-2 pela resistência em mamíferos.

2.5 PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial (PEREIRA et al., 2012). A eliminação desses produtos é, atualmente, um dos mais importantes assuntos em controle de poluição, o que tem levado os pesquisadores a buscarem novas técnicas e ferramentas mais

poderosas que visem à remoção desses compostos do ambiente (PEREIRA et al., 2012). Estudos comprovam que algumas espécies de bactérias possuem papel benéfico na prática da biorremediação, como está destacado na tabela 3.

A biorremediação é uma solução ecologicamente correta que emprega produtos biológicos naturais nos processos (MANI; KAMUR, 2013). Trata-se de um processo no qual organismos vivos são utilizados para remover ou reduzir poluentes no ambiente (PEREIRA et al., 2012). A comunidade científica tem pesquisado e recomendado este processo biotecnológico, como uma alternativa viável para a descontaminação de ambientes, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos (MORAIS FILHO et al., 2016) e algumas de suas vantagens consistem na redução do custo quando comparado às técnicas convencionais e a diminuição dos riscos de exposição para limpeza pessoal (MANI; KAMUR, 2013).

Tabela 3: Bactérias com potencial de biorremediação dos metais tóxicos cromo e zinco.

Espécies bacterianas	Metais	Referência
<i>Spirogyra sp.</i> e <i>Spirulina sp.</i>	Cr, Cu, Fe, Mn, Se, Zn	MANE; BHOSLE, (2012)
<i>Pseudomonas veronii</i>	Cd, Zn, Cu	VULLO et al., (2008)
<i>Bacillus cereus</i>	Cd, Zn	HRYNKIEWICZ et al., (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	Cr	KANMANI et al., (2012)
<i>Bacillus cereus</i> cepa XMCr-6	Cr	DONG et al., (2013)
<i>Penicillium canescens</i>	Cr	SAY et al. (2003)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Cr, Ni, Cu	TASTAN et al., (2010)

Fonte: Adaptado de MANI; KAMUR (2013).

Abordagens biotecnológicas recentes para biorremediação (Figura 5) incluem bioissorção, bioacumulação, biotransformação e biomineralização (DIXIT et al, 2015).

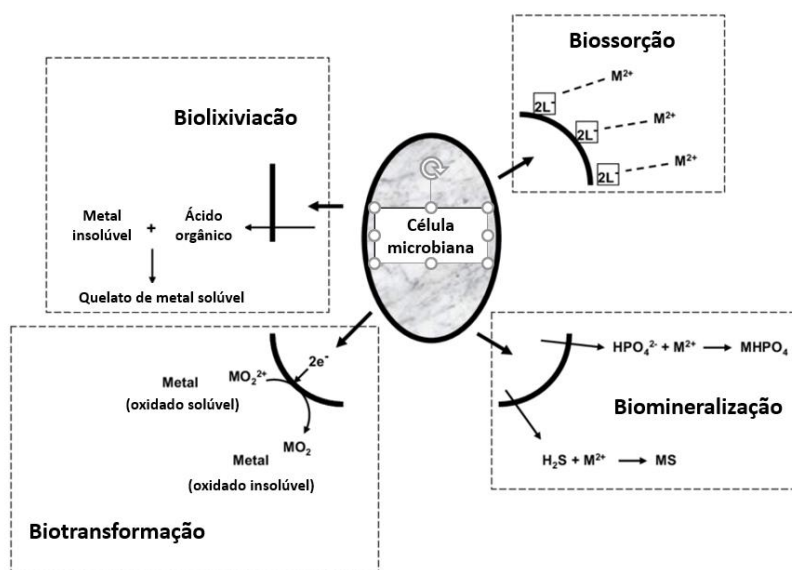


Figura 5: Mecanismos de interação metal-micróbio durante aplicações de biorremediação. Adaptado de GAVRILESCU (2010).

Na biossorção ocorre uma assimilação microbiana de espécies de metais orgânicos e inorgânicos, ambos solúvel e insolúvel, por mecanismos físico-químicos (GADD, 2004). Microrganismos também são capazes de realizar bioacumulação, isto é, são capazes de acumular íons de metais tóxicos nas formas particulada e insolúvel e seus subprodutos (OJUEDERIE; BABALOLA, 2017). O mecanismo de biotransformação por sua vez, explica a habilidade que bactérias têm de se ligar a metais para transformar de metais tóxicos em compostos de menor toxicidade (DIXIT et al, 2015). Outra tecnologia remediadora é a biomineralização, que resulta no caminho natural de produzir materiais inorgânicos estruturados que possuem funções vitais em sistemas biológicos, realizando a ligação de metais e formando minerais (MANI; KAMUR, 2013).

As tecnologias de biorremediação podem ser classificadas como *in situ* ou *ex situ*. A *in situ* é um método onde a transformação ou destruição dos contaminantes ocorre no próprio local, enquanto a *ex situ* consiste na remoção do material contaminado para tratamento em local externo ao de sua origem (MORAIS FILHO et al., 2016). As principais vantagens da biorremediação *in situ* são a rentabilidade, sem escavação, local mínimo interrupção, produção mínima de poeira e a possibilidade de tratamentos simultâneos de solo e águas subterrâneas em futuro (MANI; KAMUR, 2013).

Fatores como a natureza do poluente, as características do solo, a diversidade microbiana do local (MANI; KAMUR, 2013), além da temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, afetam a biorremediação (JUWARKAR et al., 2010). A chave para um

processo bem sucedido é aproveitar a capacidade catabólica natural dos micróbios para catalisar transformações de poluentes ambientais (CHAKRABORTY et al., 2012).

Outra alternativa que vem despertando interesse de estudiosos, devido ao potencial em remediar compostos tóxicos, chama-se fitorremediação (LAMEGO et al., 2017). Essa técnica é baseada no uso de plantas naturais ou geneticamente modificadas capazes de extrair substâncias perigosas, como metais tóxicos do meio ambiente, transformando-os em compostos seguros (MAHAR et al., 2016). Refere-se a uma tecnologia de limpeza eficiente para uma variedade de poluentes orgânicos e inorgânicos (PILON-SMITH, 2005).

Os poluentes orgânicos são lançados no ambiente via derramamentos (combustível, solventes), atividades militares (explosivos, armas químicas), agricultura (pesticidas, herbicidas), indústria (química, petroquímica), entre outros (PILON-SMITH, 2005). Poluentes inorgânicos, no entanto, ocorrem como elementos naturais na crosta terrestre ou atmosfera ou resultantes de atividades antrópicas, como mineração e industrialização. Esses compostos não podem ser degradados, mas podem ser fitorremediados por meio alguns processos (PILON-SMITH, 2005). Poluentes inorgânicos que podem ser fitorremediados incluem macronutrientes vegetais, como nitrato e fosfato; micronutrientes vegetais como Cr, Cu, Fe, Mn e Zn; e elementos não essenciais, como Cd, Co, F, Hg, Se, Pb e V (PILON-SMITH, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de resistência de isolados bacterianos depositados na coleção de microrganismos LBCT/UENF e oriundos de solo e serrapilheira da Estação Ecológica de Guaxindiba -RJ aos metais tóxicos cromo e zinco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfologia das células bacterianas com auxílio de microscopia óptica;
- Demonstrar a cinética de crescimento dos isolados bacterianos cultivados em meio NB líquido sem presença de metais tóxicos;
- Avaliar a cinética de crescimento dos isolados bacterianos cultivados em meio NB líquido suplementado com crescentes concentrações de metais tóxicos;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados bacterianos cultivados em meio NB sólido suplementado com crescentes concentrações de metais tóxicos;
- Observar e demonstrar a morfologia das colônias bacterianas expostas a concentrações crescentes de metais tóxicos com auxílio de lupa.
- Promover ensaios de viabilidade celular em placas e com auxílio do *kit LIVE/DEAD* após a exposição aos metais tóxicos;
- Analisar a formação e a quantificação de biofilme dos isolados bacterianos na ausência e na presença de metais tóxicos.

4. METODOLOGIA

4.1 CEPAS BACTERIANAS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas a partir de amostras de serrapilheira e solo (Tabela 5) coletadas em dois períodos distintos (setembro de 2011 e abril e 2012) de quatro pontos da Estação Ecológica de Guaxindiba – RJ, localizada na Fazenda São Pedro (Latitude 21 24' S e Longitude 41 04' W) no município de São Francisco de Itabapoana a partir de estudos prévios conduzidos por Bento (2013) e pertencem à Coleção Microbiológica do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - LBCT, situado no Centro de Biociências e Biotecnologia - CBB, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, onde foram realizados todos os experimentos.

Tabela 4: Características gerais dos isolados e do solo de origem das amostras.

Código do isolado bacteriano	Coloração GRAM	Origem da amostra	Tipo de solo	Período da retirada da amostra
8 D.B	Gram-negativo	S	-	Setembro de 2011
10 D.B	Gram-negativo	S	-	Setembro de 2011
16 D.B	Gram-negativo	P2	Argissolo amarelo	Setembro de 2011
7 B.B	Gram-negativo	P2	Argissolo amarelo	Setembro de 2011
22 A	Gram-negativo	P2	Argissolo amarelo	Setembro de 2011
37 A	Gram-negativo	P3	Argissolo amarelo	Setembro de 2011

Onde: S= Serrapilheira; P2= Solo com profundidade de 10-20 cm; P3= Solo com profundidade de 20-40 cm. Fonte: Adaptado de BENTO (2013).

Para realização dos ensaios, as estirpes bacterianas foram cultivadas em meio líquido DYGS modificado, cuja composição em g.L⁻¹ é de 2,0 de glicose; 2,0 de ácido málico; 1,5 de peptona bacteriológica; 2,0 de extrato de levedura; 0,5 de fosfato de

potássio (K_2HPO_4); 0,5 de sulfato de magnésio ($MgSO_4$); 1,5 de ácido glutâmico, dissolvidos em água destilada e ajuste do pH 6,0, seguido de esterilização em autoclave a 121°C por 20min (BALDANI, 1996). As estirpes foram cultivadas por 48 horas em agitador orbital a 32°C e 180 rpm para obtenção do pré-inóculo.

Em seguida, para confirmar a pureza, cada isolado foi semeado em placa de Petri contendo meio *Nutrient Broth* (NB) sólido, cuja composição em $g.L^{-1}$ é de 1,5 de extrato de levedura; 1,5 de extrato de carne; 5 de peptona; 5 de cloreto de sódio (NaCl) e 15 de ágar bacteriológico, dissolvidos em água destilada e esterilizado em autoclave a 121°C por 20min. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 48h. Após confirmada a pureza, o inóculo foi cultivado para os ensaios subsequentes.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A morfologia colonial tem sido utilizada há décadas como um critério inicial importante na identificação e caracterização bacteriológica (HASMAN et al., 2000). Para a caracterização da morfologia celular dos isolados, cada estirpe foi cultivada em meio líquido DYGS. Após o cultivo, 10 μL da estirpe foi transferida para uma lâmina, coberta com lamínula e observada em microscopia óptica de contraste de fase, *Zeiss Axioplan* com câmera fotográfica digital *Mortcam Pro 282 B* acoplada e fotodocumentada com uma lente objetiva de 40X em combinação com uma lente ocular de 10X.

4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES DOS METAIS

As soluções-estoque contendo dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e sulfato de zinco ($ZnSO_4$) na concentração de 5 $g.L^{-1}$ foram preparadas a partir da dissolução destes compostos em água destilada. Tais soluções foram esterilizadas por filtração em membrana milipore de 0,22 μm , utilizando um filtro K18-230 KASVI, sendo armazenadas em tubos Falcon de 50 mL a 4°C e usadas nos ensaios para avaliação da resistência dos isolados bacterianos. As soluções foram adicionadas ao meio de cultura NB líquido, previamente autoclavado, nas concentrações 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240 e 480 $mg.L^{-1}$ ou sólido nas concentrações 20, 60, 120, 240 e 480 $mg.L^{-1}$ para ambos os metais.

4.4. CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO

Para realizar o ensaio da curva de crescimento padrão em meio NB líquido, uma alíquota de 20 µL (D.O: 0,782 (8 D.B); 0,776 (10 D.B); 0,288 (16 D.B); 0,853 (7 B.B); 0,698 (22 A); 0,777 (37 A)) da suspensão bacteriana cultivada previamente em meio líquido DYGS modificado por 48h foi transferida para tubos de ensaio de 5 mL com meio NB líquido. O inóculo foi incubado em agitador orbital por 72h a 32°C e 180 rpm. Nos intervalos 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h, alíquotas de 200 µL foram transferidas para a placa de 96 poços e o número de células bacterianas foi demonstrado por meio da DO_{600nm} realizada através da leitura em espectrofotômetro *Versa Max Microplate Reader* pelo programa *SoftMAXPro*. O controle negativo foi realizado em meio NB líquido e todo o ensaio foi realizado em triplicata.

4.5 TESTE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS

4.5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM METAL

Para realizar o ensaio de cinética de crescimento em meio NB líquido, uma alíquota de 20 µL (DO: 0,782 (8 D.B); 0,776 (10 D.B); 0,288 (16 D.B); 0,853 (7 B.B); 0,698 (22 A); 0,777 (37 A)) da suspensão bacteriana cultivada previamente em meio líquido DYGS modificado por 48h foi transferida para o meio NB suplementado com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e sulfato de zinco ($ZnSO_4$), nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240 e 480 mg.L⁻¹. O inóculo foi incubado em agitador orbital por 48h a 32°C e 180 rpm. A cada 12h, alíquotas de 200 µL foram transferidas para a placa de 96 poços e o número de células bacterianas foi demonstrado por meio da DO_{600nm} realizada através da leitura em espectrofotômetro *Versa Max Microplate Reader* pelo programa *SoftMAXPro*. O controle foi realizado em meio NB líquido e todo o ensaio foi realizado em triplicata.

4.5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração capaz de impedir o crescimento microbiano. Esta metodologia foi utilizada para avaliar a resistência das cepas bacterianas na presença de metais (WIEGAND et al., 2008). Para esse ensaio, uma alíquota de 10 µL da suspensão foi transferida para placas de

Petri com meio NB sólido suplementado com os metais tóxicos ($K_2Cr_2O_7$ e $ZnSO_4$) nas concentrações de 20, 60, 120, 240 e 480 $mg.L^{-1}$. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, onde ficaram a 30°C por 48h, e após esse período as imagens das colônias foram obtidas com auxílio de lupa e programa *Remote capture* DC. O controle se constituiu no crescimento bacteriano sem a adição de metais tóxicos. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6 DETERMINAÇÃO DE pH

A determinação do pH em meio de cultura líquido suplementado ou não com metais tóxicos foi também avaliada. Para o meio de cultura contendo somente os metais tóxicos, a determinação do pH foi obtida para todas as concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240 e 480 $mg.L^{-1}$), a fim de verificar a mudança estabelecida por este no meio. Em seguida o pH foi também verificado na presença das estirpes bacterianas, sendo estas inoculadas no meio NB suplementado com metais tóxicos e incubadas em agitador orbital a 32°C e 180 rpm por 48h. Ambos os ensaios foram realizados em triplicata e o valor de pH obtido com o auxílio do pHmetro *Digimed DM-22*.

4.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

4.7.1 VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DE KIT LIVE/DEAD

O *kit LIVE/DEAD* foi utilizado para a avaliação da integridade da membrana plasmática e sua coloração consiste na combinação de dois marcadores: SYTO 9 (que cora todas as células viáveis) e iodeto de propídio (o qual penetra apenas em bactérias com danos na membrana). Com a combinação dos marcadores, bactérias com membranas intactas emitem fluorescência verde e bactérias que apresentam danos na membrana, emitem fluorescência vermelha (SILVA, 2012).

Para realização do teste de viabilidade das células bacterianas com o *kit*, inicialmente uma alíquota de 20 μL da suspensão contendo a bactéria cultivada em meio líquido DYGS modificado foi transferida para o meio NB líquido suplementado com $K_2Cr_2O_7$ e $ZnSO_4$ nas concentrações de 20, 60 e 120 $mg.L^{-1}$, permanecendo em incubadora sob agitação orbital a 32°C e 180 rpm por 48h. Após esse período, 2 mL das amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 5000 rpm por 6min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 1 mL de solução salina (NaCl) a 0,85%, sendo esse processo repetido duas vezes. Após este

procedimento, o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de solução salina 0,85% e adicionado 0,5 µL de cada reagente do kit *LIVE/DEAD BacLight™* (SYTO 9 e iodeto de propídio). A amostra foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por 15min.

Após este período, uma alíquota de 3 µL da solução foi colocada sobre a lâmina de vidro, recoberta com uma lamínula e a fluorescência observada em microscopia de epifluorescência *Zeiss Axioplan* com lente objetiva de 40X e lente ocular de 10X. O ensaio foi realizado em duplicata. Para cada corante, foram utilizados filtros de excitação e emissão em 480/500nm para SYTO 9 e 490/635nm para o iodeto de propídio. O controle foi realizado em meio NB líquido.

4.7.2 VIABILIDADE CELULAR EM PLACA DE PETRI

Para a realização do ensaio de viabilidade celular em placa contendo meio NB sólido, primeiramente foi realizado o cultivo dos isolados bacterianos em meio líquido DYGS modificado e após 48h no agitador orbital a 32°C e 180 rpm, uma alíquota de 20 µL da suspensão bacteriana foi transferida para tubos de ensaio com 5 mL de meio NB líquido suplementado com os metais nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240 e 480 mg.L⁻¹. Após 48h em incubadora orbital a 32°C por 180 rpm, as amostras foram transferidas para placa de Petri com meio NB sólido com auxílio de uma alça de alumínio e levadas a estufa, onde permaneceram por 48h a 30°C. Posteriormente, as placas foram fotografadas com câmera digital *Canon EOS REBEL T3*. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8 FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO

Para demonstrar a formação de biofilme, uma alíquota de 20 µL do pré-inóculo foi transferido para meio líquido NB contendo 0,1 g de lã de vidro (*sigma Aldrich*) e incubado em agitador rotativo por 48h a 32°C e 180 rpm. Após este período, a lã de vidro foi transferida para uma placa de Petri e corada com solução de safranina 1% por 30min, lavada em água destilada e transferida para uma lâmina de vidro. As imagens do biofilme foram obtidas com o auxílio do microscópio óptico *Zeiss Axioplan* com uma câmera fotográfica digital acoplada *AxioCam* e lente objetiva de 10X.

Após confirmação da presença de biofilme bacteriano, foi realizada então a sua quantificação. Para isso, os isolados foram cultivados conforme mencionado acima, e após 48h de cultivo, a lã de vidro foi corada com cristal violeta 1%, após 30min a amostra foi lavada três vezes em solução tampão fosfato (PO₄) 0,05 M. A extração

total do corante presente na lâ de vidro foi realizada com 4 mL de etanol 100% e após sua obtenção, uma alíquota de 200 µL foi transferida para placa de 96 poços. Todo ensaio ocorreu em triplicata e um controle negativo contendo somente a lâ de vidro foi obtido. A quantificação foi realizada através do comprimento de onda de 560nm em espectrofotômetro modelo *Versa Max Microplate Reader* utilizando o programa *SoftMaxPro*.

4.8.1 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO NA PRESENÇA DE METAIS TÓXICOS

Foram realizados ensaios de formação e quantificação de biofilme na presença e na ausência de metais tóxicos para a concentração de 120 mg.L⁻¹. As estirpes selecionadas, 7 B.B e 16 D.B (as quais apresentaram melhor resposta para a formação do biofilme) foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido NB e após 12h em agitador orbital a 32°C e 180 rpm, foram acrescentados os metais tóxicos na concentração citada acima. Os tratamentos seguiram da seguinte forma: 1) tubo com lâ de vidro e com metal; 2) tubo com lâ de vidro e sem metal; 3) tubo sem lâ de vidro e com metal; 4) tubo sem lâ de vidro e sem metal. Após 48h de cultivo, foi realizada a primeira avaliação, onde 200 µL das amostras foram distribuídas em placa de 96 poços e a D.O_{600nm} foi verificada em espectrofotômetro modelo *Versa Max Microplate Reader* utilizando o programa *SoftMaxPro*, para os tempos 0, 24 e 48h.

As análises de formação e quantificação de biofilme bacteriano, foram realizadas como descrito acima, no item 4.8. Após as análises citadas, foi realizada ainda a contagem de UFC/mL, a fim de confirmar o número de colônias viáveis. Para isso, foram realizadas diluições seriadas das amostras em solução salina 0,85%, a qual foi retirada 1 mL da amostra e transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução. As diluições foram seguidas em tubos de 10⁻¹ a 10⁻⁹ e posterior foi realizada a semeadura das amostras em placas de Petri contendo meio NB sólido para as diluições 10⁻⁶ a 10⁻⁹. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por sete dias e após este período o número de UFC/mL foi quantificado. Todos os ensaios citados acima foram realizados em triplicata.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi apresentada como média e desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) a fim de determinar as diferenças entre os tratamentos. Os testes foram realizados com o auxílio do programa *Graph Prism*, versão 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS

De acordo com os aspectos da morfologia celular de cada isolado, os mesmos apresentaram suas formas variadas entre bastões curtos e longos quando cultivados em meio cultura líquido NB (Figura 7). Neste contexto, estirpes como 7B.B, 8D.B, 10D.B, 22A e 37A apresentaram sua forma em bastão curto (Figura 5, A; B; C; E e F), enquanto 16D.B apresentou sua forma em bastão longo e a presença de agregados celulares. (Figura 7, D)

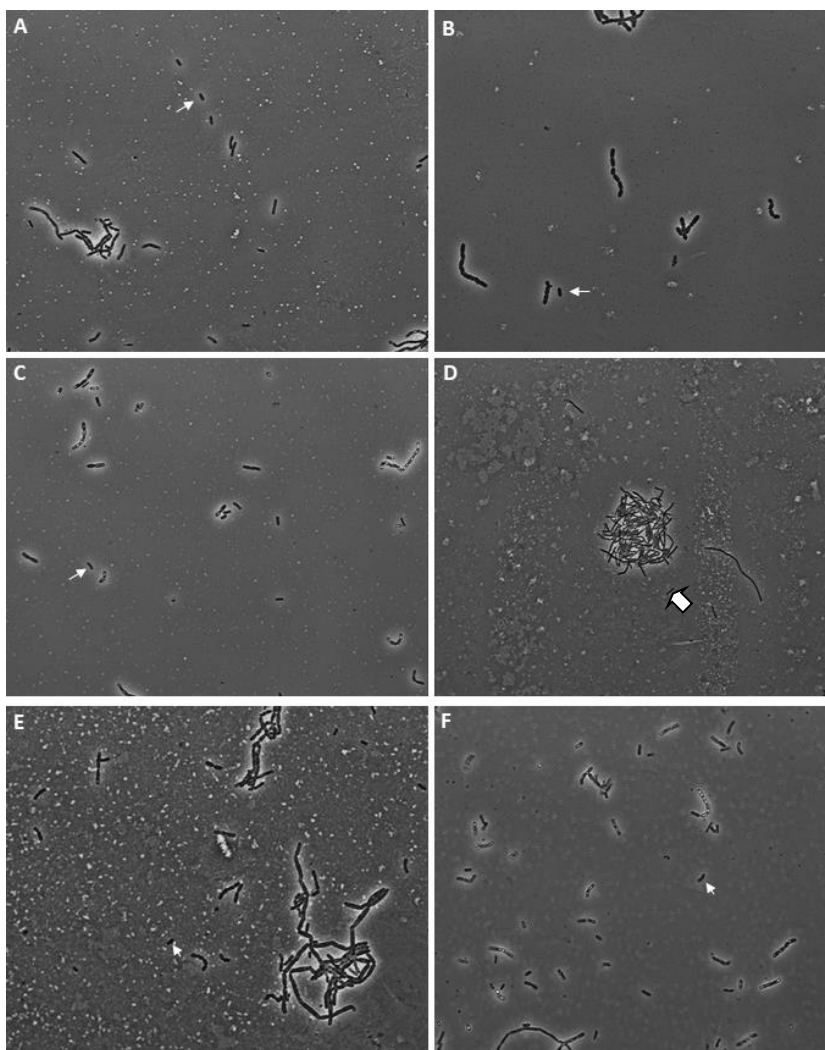


Figura 6: Caracterização morfológica das células de isolados bacterianos. Os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura líquido NB, sendo 7B.B (A), 8D.B (B), 10D.B (C), 16D.B (D), 22A (E) e 37A (F). A morfologia celular de cada estirpe variou entre as formas de bastão curto (seta pequena) e bastão longo (seta larga). As imagens foram obtidas em microscopia óptica e em aumento de 400X.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO

A curva de crescimento permitiu observar que os isolados 8D.B, 10D.B, 7B.B, 22A e 37A (Figura 8), apresentaram fase de latência 4h após a inoculação. Sendo a fase exponencial 4h-12h após o cultivo. Após esse período, pequenas variações foram observadas, caracterizando sua fase estacionária. Em contrapartida, o isolado 16D.B, demonstrou um crescimento lento quando comparado aos demais isolados, demonstrando sua fase de latência até 12h após a inoculação em meio NB. A fase exponencial foi observada entre 12h e 24h, atingindo sua fase estacionária até 60h. Para todos os isolados foi demonstrado um crescimento após 60h e até 72h, onde foi observado um aumento nos valores de D.O.

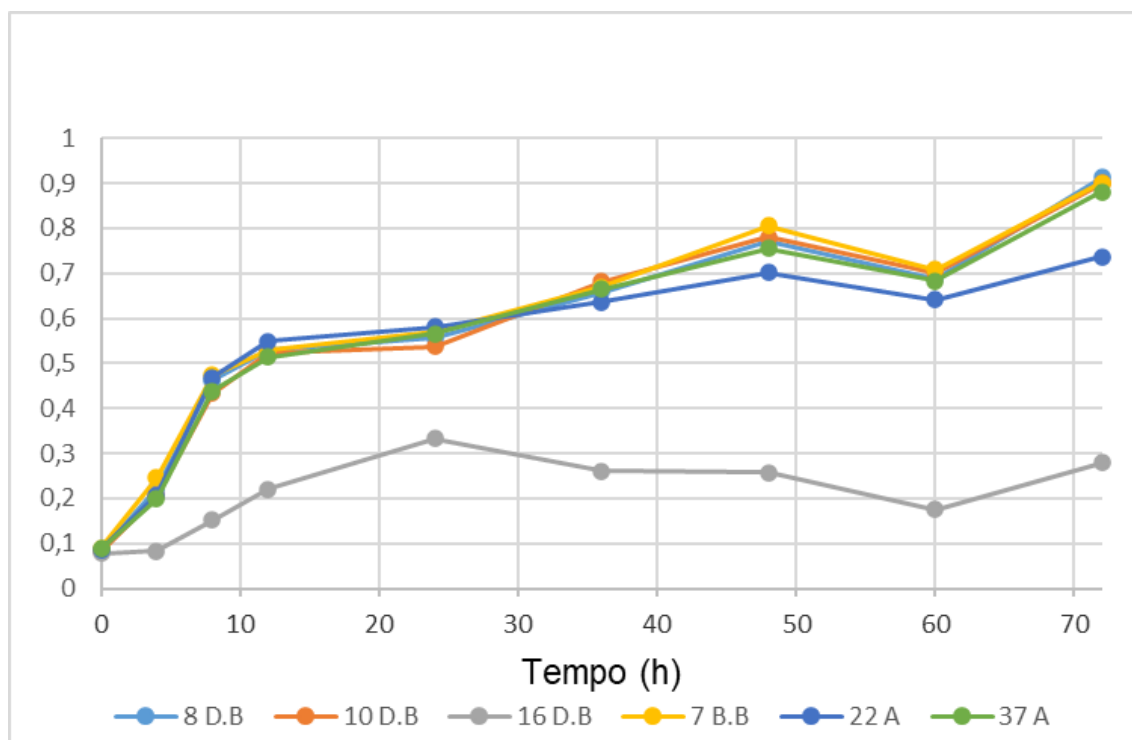


Figura 7: Cinética do crescimento dos isolados bacterianos. Todas as estirpes foram cultivadas em meio de cultura NB líquido e a densidade óptica (D.O) foi obtida com o auxílio de um espectrofotômetro em comprimento de onda 600nm nos intervalos 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h.

5.3 DETERMINAÇÃO DE pH

A curva de pH foi confirmada antes e após a inoculação das estirpes bacterianas em meio de cultura NB. O meio de cultura comercial NB apresenta seu pH 7.4, quando na presença do metal esse pH pode sofrer alterações leves ou discrepantes. Porém, quando, antes da inoculação bacteriana, foi possível perceber que na presença de dicromato de potássio e sulfato de zinco em diferentes concentrações foi demonstrado uma leve alteração para ambos os metais. No entanto, quando comparados, o valor do pH foi 6,36 ($K_2Cr_2O_7$) e 6,60 ($ZnSO_4$) para o meio de cultura antes da inoculação (Figura 8).

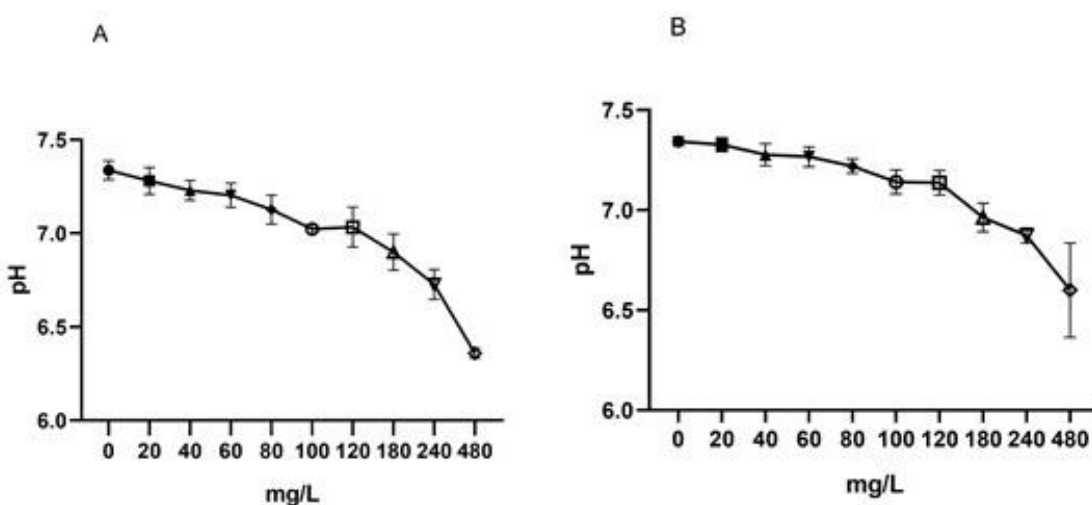


Figura 8. Valor de pH demonstrado em meio NB líquido na presença de metais tóxicos. Para o meio de cultura NB líquido, foi demonstrado a alteração dos valores de pH quando este se encontra suplementado com as soluções de $K_2Cr_2O_7$ (A) ou $ZnSO_4$ (B). Assim, através da análise dos gráficos é possível observar uma leve acidificação do meio de cultura quando em concentrações elevadas (180, 240 e 480 $mg.L^{-1}$) para ambos os metais tóxicos ($p < 0,0001$).

Após demonstrar os valores de pH em meio NB suplementado com metais tóxicos, as estirpes microbianas foram inoculadas e a variação de pH foi verificada na presença destes organismos após 48h. Para as estirpes 16D.B e 7B.B apresentaram pH 8.0 em meio NB líquido, porém na presença de cromo o mesmo se manteve neutro para todas as concentrações sendo, porém, levemente acidificado (pH 6.8 e 6.9) para as maiores concentrações 240 e 480 $mg.L^{-1}$ para 16D.B e somente 480 $mg.L^{-1}$ para 7B.B. As estirpes 22A e 37A no controle ou na presença de metal apresentaram seu pH neutro para todas as concentrações, porém para a estirpe 22A o pH apresentou uma leve acidificação (pH 6.2) em 480 $mg.L^{-1}$ de cromo. A estirpe 8D.B apresentou o pH 6.6 e 6.4 para o controle e 480 $mg.L^{-1}$, respectivamente e demonstrou pH neutro

para as demais concentrações (20-240 mg.L⁻¹). Neste contexto, a estirpe 10D.B apresentou seu pH neutro somente para em 20 mg.L⁻¹, sendo as demais concentrações e controle encontradas com pH levemente acidificado, ambos resultados na presença de cromo (Figura 9).

Em meio de cultura suplementado com zinco, com exceção da estirpe 16D.B (Figura 9A), todas as cepas acidificaram levemente o meio, sendo para a maior concentração 480 mg.L⁻¹ o pH se manteve acidificado 5,91 (estirpe 22A) e 5,9 (37A e 10D.B) (Figura 10 B-D-F). Para a estirpe 16D.B o meio de cultura apresentou uma leve acidificação para as concentrações 280 e 480 mg.L⁻¹ (pH 6.7 e 6.3, respectivamente), sendo para as demais concentrações o pH permaneceu neutro. Para todas as demais estirpes o pH apresentou leve acidificação sendo sua variação entre 6.7 e 6.8 (estirpe 7B.B e 8D.B) (Figura C-E). Porém, ainda para estirpe 8D.B para a concentração de 120 mg.L⁻¹ o pH foi 7,1, apresentando-se neutro. (Figura 9)

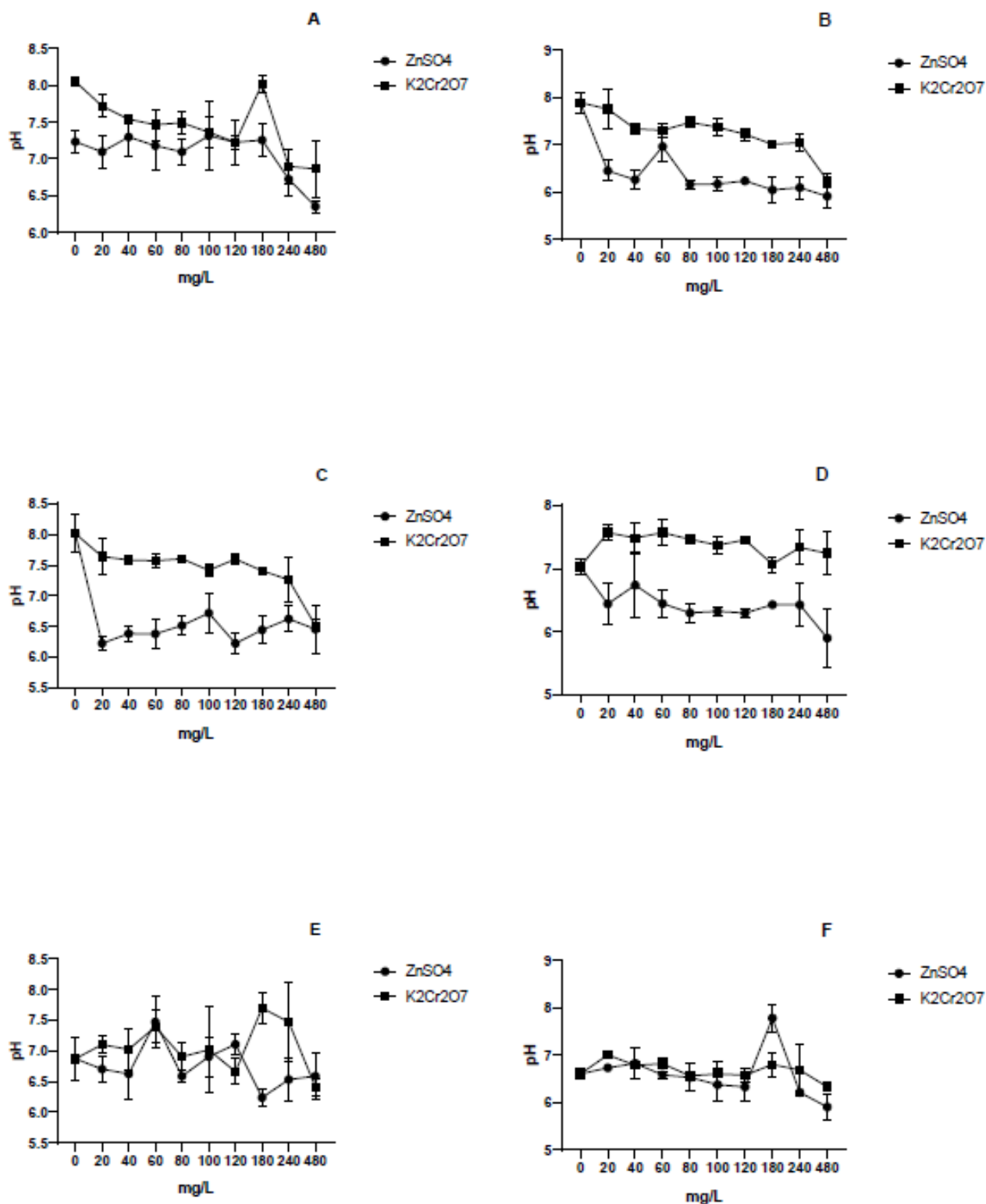


Figura 9. Valor de pH na presença de bactérias cultivadas em meio de cultura suplementado com metais pesados. Os valores de pH foram verificados na ausência e presença de bactérias. Todas as bactérias foram cultivadas em meio NB, suplementados com ZnSO_4 e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em diferentes concentrações e após 48h o pH foi verificado sendo 16D.B (A), 22A (B), 7B.B (C), 37A (D), 8D.B (E) e 10D.B (F). O pH apresentou uma variação para todas as concentrações, e permanece levemente acidificado para ambos os metais, especialmente em suas concentrações mais elevadas.

5.4 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

Após obter a curva de crescimento celular dos isolados bacterianos (Figura 7), foi realizado ensaio de resistência a Cr e Zn em meio de cultura NB líquido com concentrações crescentes de $K_2Cr_2O_7$ e $ZnSO_4$ para seis isolados bacterianos (Figura 11). Considerando inicialmente a cinética de crescimento sob influência de doses crescentes de cromo. Para todas as concentrações avaliadas (de 20 a 480 $mg.L^{-1}$ de $K_2Cr_2O_7$), os isolados exibiram crescimento no intervalo de 48 h, com a tendência das taxas de crescimento inversamente proporcionais a concentração do metal.

A curva de crescimento de cada isolado evidência diferentes estratégias para adaptação a concentrações crescentes de cromo. As taxas de crescimento para o isolado 37A (Figura 10 A) na presença de até 40 $mg.L^{-1}$ da fonte de cromo foram similares ao controle. Observa-se um segundo padrão de cinética entre 60 e 120 $mg.L^{-1}$, com taxas iniciais de crescimento mais baixas, um período de 12 a 24h de baixo crescimento, seguido de taxas de crescimento maiores, o que sugere uma reprogramação celular para tolerância ao cromo, seguido de retomada de crescimento. Comportamento similar foi observado nas doses 180 e 240 $mg.L^{-1}$, como menor acúmulo de biomassa e baixíssimas taxas de crescimento na dose mais elevada (480 $mg.L^{-1}$) no curso de período experimental.

O padrão de crescimento do isolado 22A (Figura 10 B) na presença de concentrações crescentes de cromo é similar ao isolado 37 A. As taxas iniciais de crescimento (até 12 horas) foram inversamente proporcionais ao aumento das doses de cromo. Este isolado apresentou cinética de crescimento similar ao controle até a dose de 20 $mg.L^{-1}$. Os valores máximos de D.O foram atingidos com 24 horas de crescimento para as doses entre 40 e 240 $mg.L^{-1}$ sugerindo tolerância sem crescimento celular. Na dose mais elevada, 22A cresceu muito pouco durante todo o período experimental.

O isolado 16D.B (Figura 10 C) apresentou taxas de crescimento inicial e final mais baixos entre os isolados testados. Similarmente, as taxas iniciais de crescimento foram inversamente proporcionais as doses, acomodando um período de baixo crescimento (12-36h) em relação ao controle e retomada do crescimento com taxas crescentes em função das menores concentrações de cromo no meio. Com exceção para dose de 180 $mg.L^{-1}$ com padrão de crescimento similar ao controle, com menor acúmulo de biomassa.

O isolado 8D.B (Figura 10 D) apresentou cinética de crescimento similar ao controle para as doses 20 a 60 $mg.L^{-1}$ exibindo taxas elevadas de crescimento até 36h de incubação. Acima da dose de 80 $mg.L^{-1}$, as taxas de crescimento foram mais

modestas com estabilização do crescimento com 36h, indicando tolerância de parte da população sem crescimento. Na dose de 180 mg.L⁻¹, após o período de estabilização do crescimento (12-24h), o isolado exibiu taxas de crescimento populacional comparáveis ao controle.

O isolado 10D.B (Figura 10 E) apresentou taxas de crescimento iniciais bastante elevadas para todas as concentrações de cromo, exceto a dose mais elevado (480 mg.L⁻¹). No período de 12-36 horas, as taxas de crescimento foram mais baixas na presença do cromo em relação ao controle. As taxas decrescimento finais (36-48 h) foram similares ao controle e superiores a 480 mg.L⁻¹.

O isolado 7B.B (Figura 10 F) apresentou taxas de crescimento iniciais bastante elevadas para todas as concentrações de cromo, exceto para as doses mais elevadas (240 e 480 mg.L⁻¹). No período de 12-36 horas, as taxas de crescimento permaneceram elevadas, sendo na concentração de 20 mg.L⁻¹ apresentou a fase estacionária no período de 24-36h, voltando a aumentar sua taxa de crescimento após este período na presença do cromo em relação ao controle. Quando na presença da concentração de 240 mg.L⁻¹, a estirpe apresentou uma taxa estacionária longa (12-36h), voltando ao seu crescimento exponencial após este período e até 48h, caracterizando uma possível fase de adaptação. As taxas decrescimento finais (36-48 h) foram similares ao controle e superiores a 480 mg.L⁻¹.

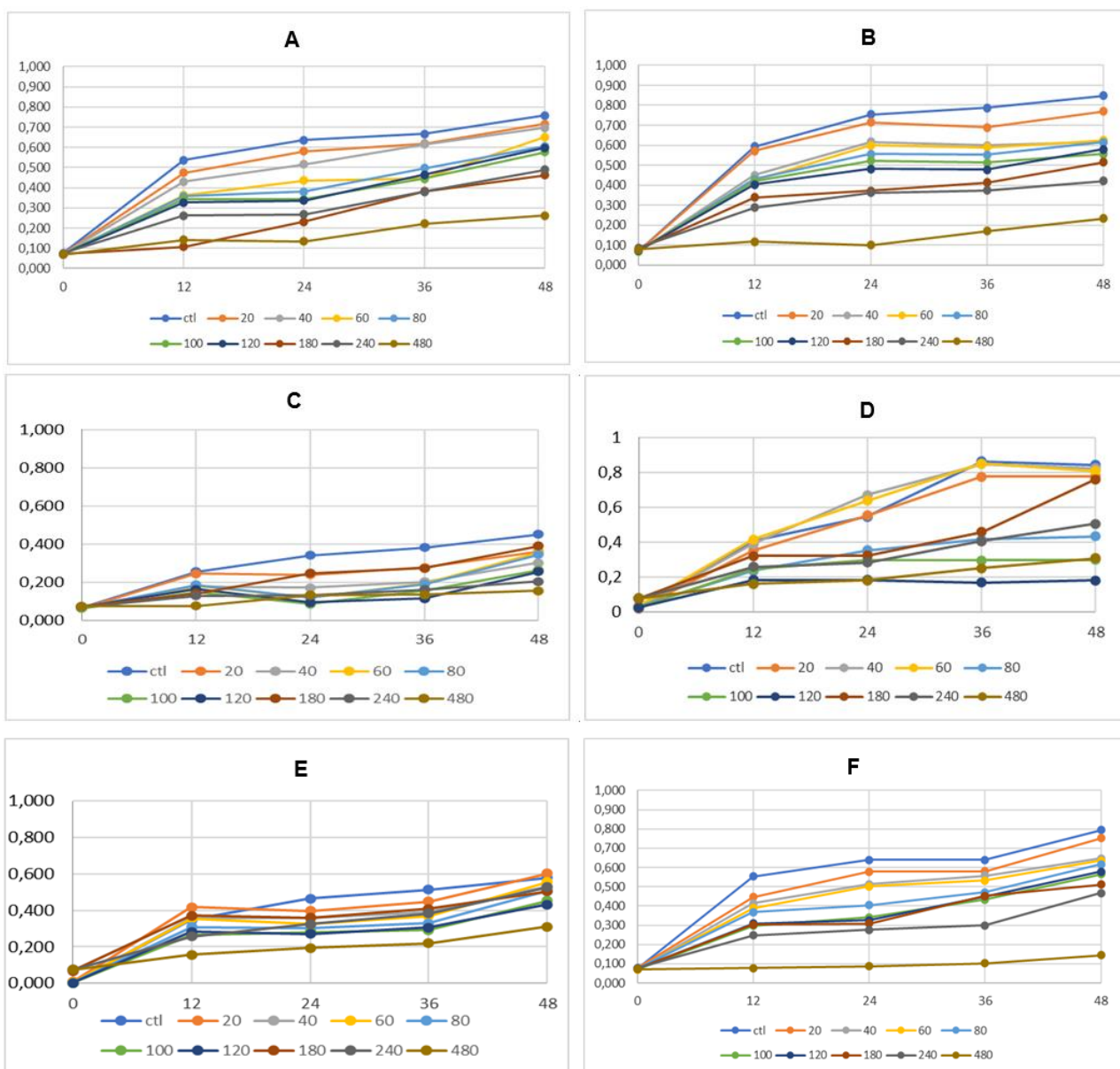


Figura 10. Curva de crescimento exponencial bacteriano na presença de cromo. A taxa de crescimento exponencial foi demonstrada para as estirpes 37A (A), 22A (B), 16D.B (C), 8D.B (D), 10D.B (E) e 7B.B (F) durante seu cultivo em meio de cultura NB líquido suplementado com solução de $K_2Cr_2O_7$ em concentrações crescentes (20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240 e 480 $mg.L^{-1}$). Os valores para a taxa de crescimento foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro em comprimento de onda 600nm.

A curva de crescimento de cada isolado evidencia estratégias mais similares para adaptação a concentrações crescentes de zinco. O isolado 37A (Figura 11 A) apresentou taxas iniciais de crescimento similares ao tratamento controle para as concentrações de zinco entre 20 e 240 mg.L⁻¹. Ao final do ensaio (48h), nas concentrações mais baixas de Zn (até 80 mg.L⁻¹), houve um incremento na densidade óptica, sugerindo incremento no tamanho da população bacteriana. A concentração de 480 mg.L⁻¹ inibiu completamente o crescimento no período inicial (12h), mantendo níveis populacionais menores que o controle nas concentrações de 240 e 480 mg.L⁻¹.

A cinética de crescimento do isolado 22A (Figura 11 B) na presença de concentrações crescentes de Zn é similar ao isolado 37A exibindo taxas de crescimento inicial elevada (20 a 240 mg.L⁻¹) nas primeiras 12 horas e taxas de crescimento menores até o final do ensaio (48 h) e similares ao controle para as doses 20 a 180 mg.L⁻¹. Na concentração mais elevada.

O isolado 16D.B (Figura 11 C) apresentou taxas de crescimento inicial e final mais baixos entre os isolados testados. As taxas iniciais de crescimento foram inversamente proporcionais ao incremento da dose de zinco. Valores máximos de D.O foram obtidos para todas as doses ao tempo de 24 horas para todos os tratamentos, seguido de queda significativa dos valores de D.O para todos os tratamentos, com exceção do controle.

O isolado 8D.B (Figura 11D) apresentou taxas iniciais de crescimento (12h) superiores nas concentrações de 180 e 240 mg.L⁻¹ em relação ao controle e 20 a 180 mg.L⁻¹. Nos períodos intermediários, as taxas de crescimento entre estes tratamentos foram similares resultando em D.O elevadas para o primeiro grupo de tratamentos em relação ao segundo grupo a partir da dose mais elevada de zinco (480 mg.L⁻¹), não houve crescimento nas primeiras 12 horas, este foi seguido de taxas de crescimento constantes entre 12 e 36h, indicando capacidade de crescimento populacional nesta condição.

O isolado 10D.B (Figura 11 E) na presença de concentrações crescentes de zinco, apresentou taxas de crescimento similares a controle durante o todo período experimental, indicando sua resistência ao metal.

As taxas de crescimento inicial (até 12h) do isolado 7B.B (Figura 11 F) na presença de Zn foram similares ao controle para todas as concentrações, exceto para 480 mg.L⁻¹. A cinética populacional no período de 12 a 36 horas foi marcado por taxas de crescimento menores e similares ao controle. Ao final do ensaio, os níveis populacionais nas doses 240 mg.L⁻¹ e principalmente 480 mg.L⁻¹ foram inferiores aos demais tratamento.

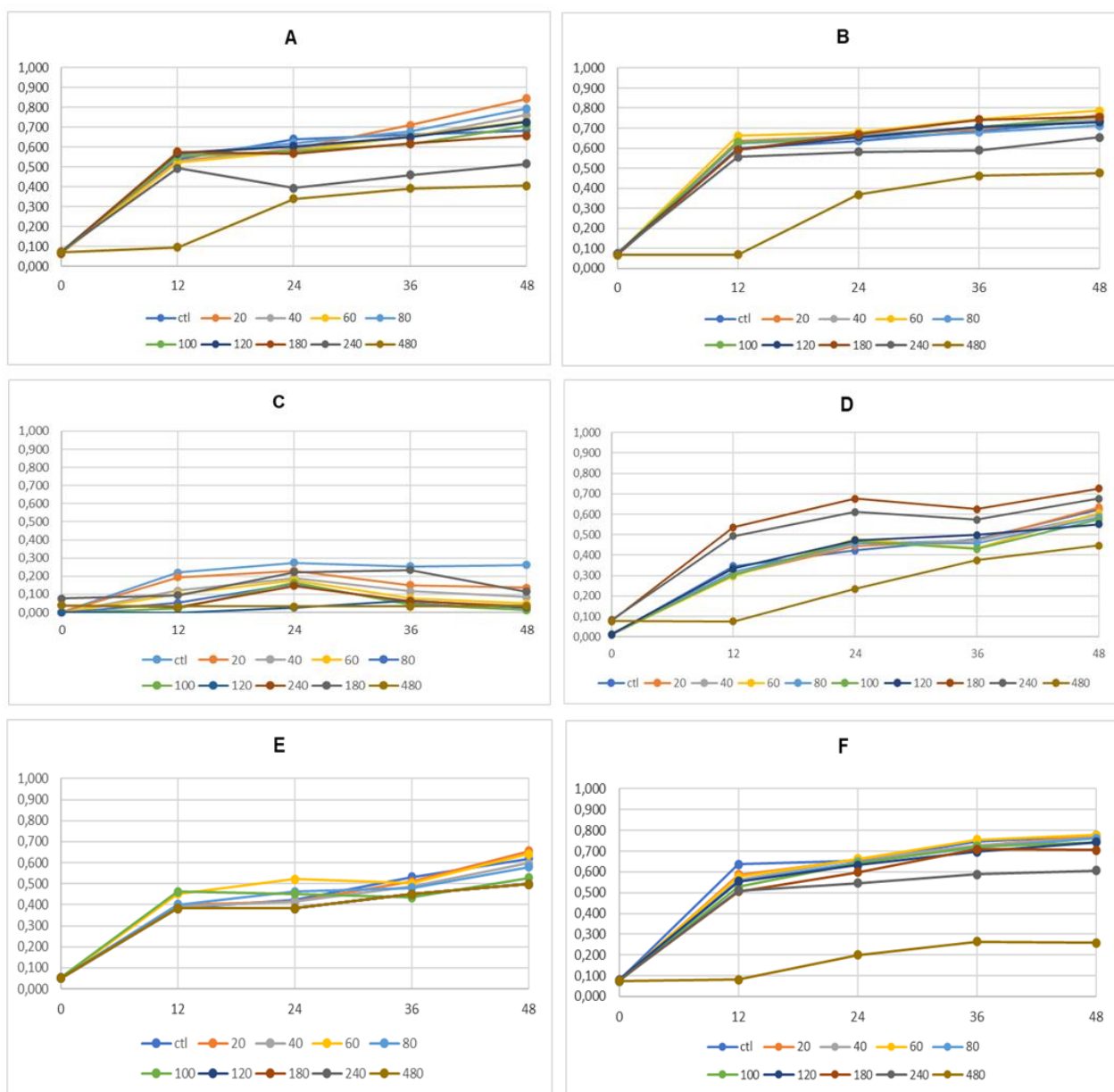


Figura 11. Curva de crescimento exponencial bacteriano na presença de zinco. A taxa de crescimento exponencial foi demonstrada para as estirpes 37A (A), 22A (B), 16D.B (C), 8D.B (D), 10D.B (E) e 7B.B (F) durante seu cultivo em meio de cultura NB líquido suplementado com solução de ZnSO₄ em concentrações crescentes (20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240 e 480 mg.L⁻¹). Os valores para a taxa de crescimento foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro em comprimento de onda 600nm.

5.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Durante o ensaio de CIM com $K_2Cr_2O_7$ e $ZnSO_4$ (Figuras 12 e 13) foi possível observar que as seis estirpes avaliadas, apresentaram crescimento nas concentrações avaliadas, porém em concentrações elevadas (480 mg.L^{-1}) foi visualizada uma alteração na morfologia colonial das estirpes para ambos os metais. Em meio de cultura NB suplementado com $K_2Cr_2O_7$ as estirpes 8D.B e 16D.B demonstraram alteração radial para as concentrações de 240 e 480 mg.L^{-1} . Enquanto, as estirpes 10D.B, 22A e 37A apresentaram uma alteração radial em 480 mg.L^{-1} . Em contrapartida, a estirpe 7B.B apresentou alteração do crescimento radial em 20 e 480 mg.L^{-1} (Figura 12).

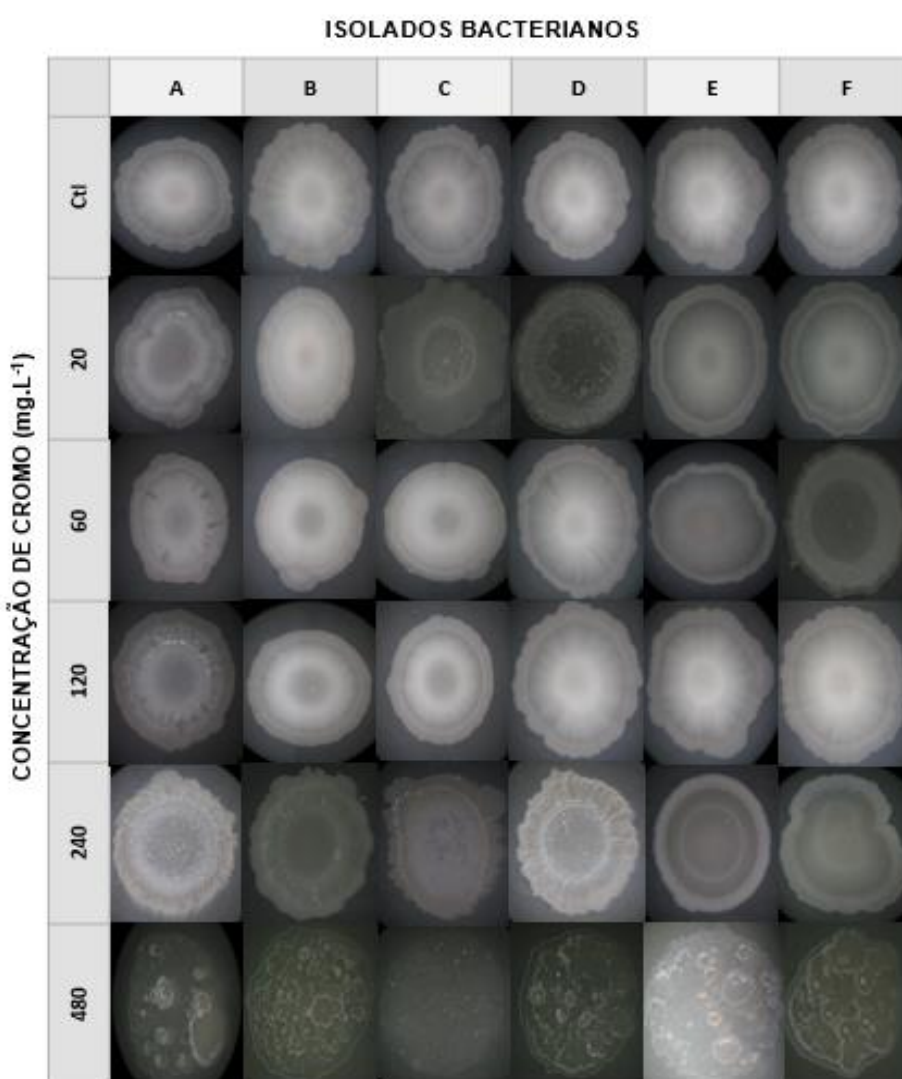
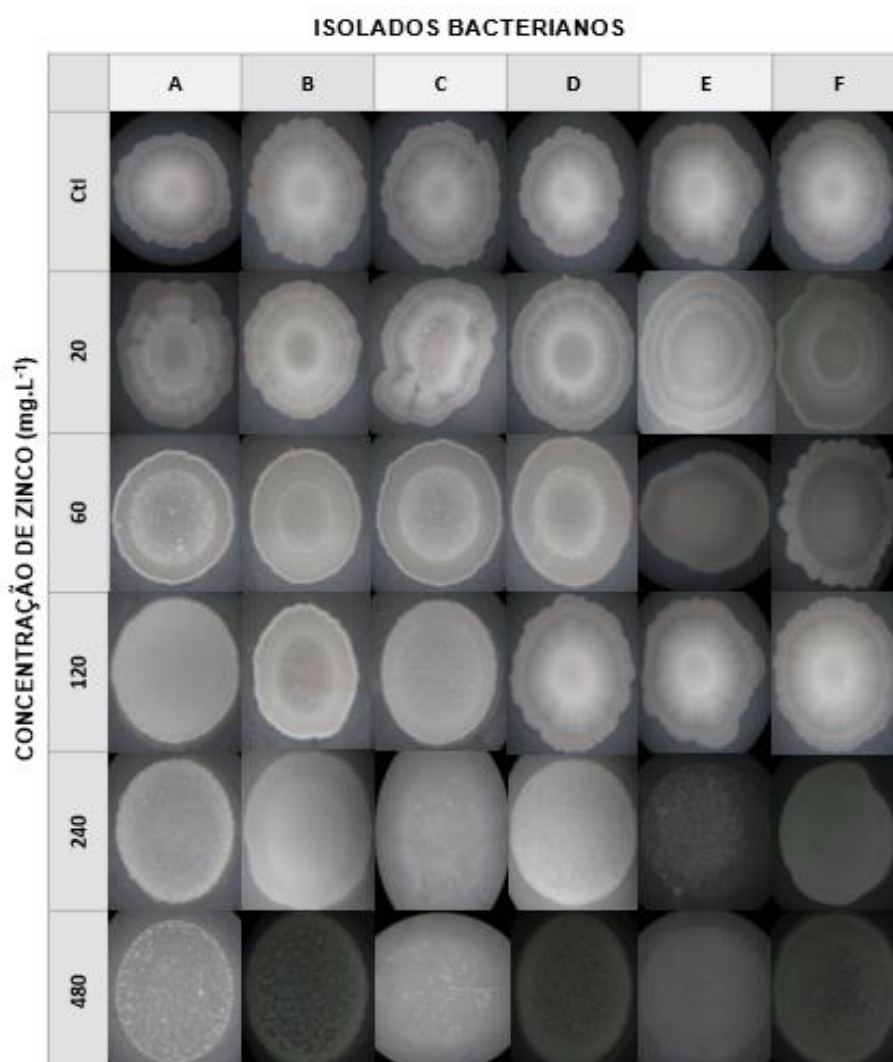


Figura 12: CIM de Cr para os isolados bacterianos. A morfologia das colônias bacterianas 8D.B (A), 10D.B (B), 16D.B (C), 7B.B (D), 22A (E) e 37A (F) foram feitas na concentração controle e com níveis crescentes de $K_2Cr_2O_7$ e observadas com auxílio de lupa *Stemi SV11 Zeiss*.

Na presença de meio de cultura suplementado com ZnSO_4 , foi visualizada a mudança na morfologia radial das estirpes, a partir das concentrações mais elevadas. Para as estirpes 8D.B e 16D.B (Figura 12 A-B) foram visualizadas mudanças na forma nas concentrações de 120, 240 e 480 mg.L^{-1} . No entanto, para as estirpes 10D.B, 7B.B, 22A e 37A (Figura 12 B-D-E-F), as alterações morfológicas foram visualizadas nas concentrações de 240 e 480 mg.L^{-1} . Em geral, as principais alterações foram a redução do tamanho da colônia, a mudança de coloração (variando entre amarela, creme e branca) e da borda da colônia (que variou entre inteira, ondulada e lobada). Além destas mudanças, a presença de micro-colônias foi visualizada para as estirpes 8D.B e 16D.B em 480 mg.L^{-1} , bem como para 22A na concentração de 240 mg.L^{-1} .



Figura

13: CIM de Zn para os isolados bacterianos. A morfologia das colônias bacterianas 8D.B (A), 10D.B (B), 16D.B (C), 7B.B (D), 22A (E) e 37A (F) foram feitas na concentração controle e com níveis crescentes de ZnSO_4 e observadas com auxílio de lupa *Stemi SV11 Zeiss*.

5.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

5.6.1 VIABILIDADE CELULAR POR *LIVE/DEAD*®

O ensaio de viabilidade permitiu demonstrar a sobrevivência de células bacterianas na presença de metais tóxicos cromo e zinco. Assim, para ambas as estirpes 16D.B (Figura 14 A-D) e 7B.B (Figura 14 E-H), quando comparado ao controle, foi possível demonstrar que nas concentrações maiores 60 e 120 mg.L⁻¹, 16D.B apresentou uma diminuição de sua viabilidade celular, em contrapartida o mesmo foi visualizado somente na concentração de 120 mg.L⁻¹ para a estirpe 7B.B.

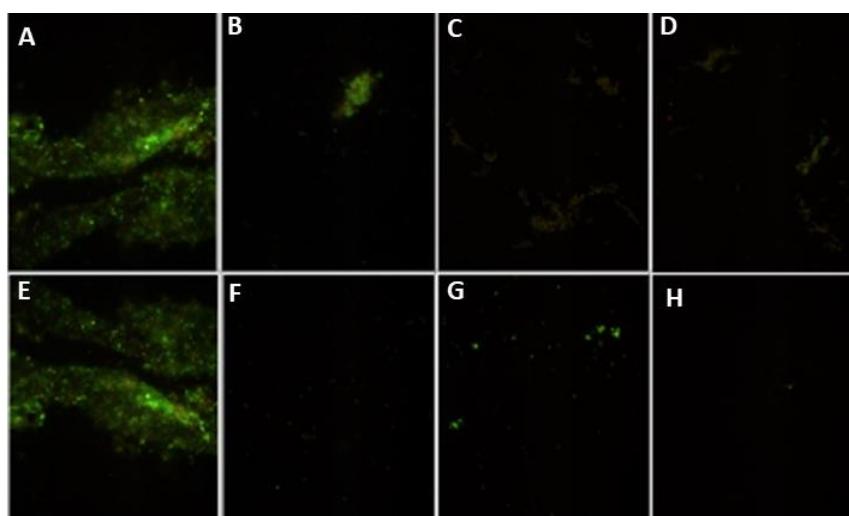


Figura 14. Viabilidade celular dos isolados bacterianos em presença de cromo. As estirpes 16D.B (A-D) e 7B.B (E-H) foram avaliadas quanto a sua viabilidade de membrana, através do ensaio em kit Live/Dead, para as concentrações 20, 60 e 120 mg.L⁻¹, bem como o controle negativo contendo somente meio de cultura NB líquido. Após 48h de incubação foi demonstrado que em concentrações elevadas (120 mg.L⁻¹) o número de células presente na cultura apresentou uma diminuição bem como sua viabilidade foi alterada. O ensaio foi realizado com o auxílio de um microscópio de epifluorescência, no qual imagens em verde demonstram a célula viável e imagens em vermelho demonstram células não viáveis.

Para ambas as estirpes 16D.B (Figura 14 A-D) e 7B.B (Figura 14 E-H), quando comparado ao controle e na presença de zinco, foi possível demonstrar que somente a concentração de 120 mg.L⁻¹ foi capaz de alterar a viabilidade das estirpes, sendo esta resposta diferente do comportamento de 16D.B na presença de cromo.

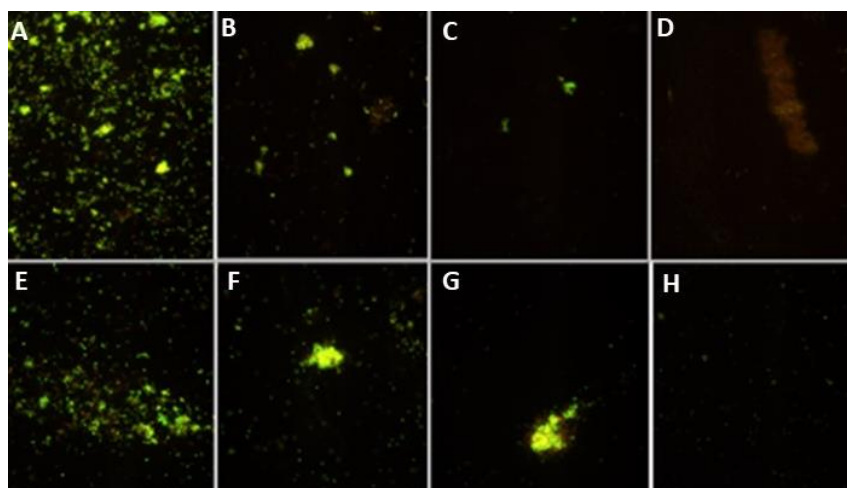


Figura 15. Viabilidade celular dos isolados bacterianos em presença de zinco. As estirpes 16D.B (A-D e 7B.B (E-H) foram avaliadas quanto a sua viabilidade de membrana, através do ensaio em kit Live/Dead, para as concentrações 20, 60 e 120 mg.L⁻¹, bem como o controle negativo contendo somente meio de cultura NB líquido. Após 48h de incubação foi demonstrado que em concentrações elevadas (120 mg.L⁻¹) o número de células presente na cultura apresentou uma diminuição bem como sua viabilidade foi alterada. O ensaio foi realizado com o auxílio de um microscópio de epifluorescência, no qual imagens em verde demonstram a célula com membrana viável e imagens em vermelho demonstram células com membrana não viável.

5.6.2 VIABILIDADE CELULAR EM PLACA DE PETRI

O ensaio de viabilidade em placa foi realizado, para confirmar a capacidade de sobrevivência das células microbianas após exposição em meio de cultura líquido suplementado com os metais tóxicos cromo e zinco (Figura 14 e 15). Assim quando na presença de cromo, as estirpes 8D.B, 10D.B e 37A (Figura 14 A-B-F) não apresentaram alteração em sua viabilidade, demonstrando seu crescimento normal após semeadura em placa contendo meio NB sólido. No entanto, as estirpes 16D.B, 7B.B e 22A (Figura 14 C-D- E) apresentaram seu desenvolvimento alterado para as maiores concentrações (240 e 480 mg.L⁻¹) quando semeadas em meio de cultura NB sólido.

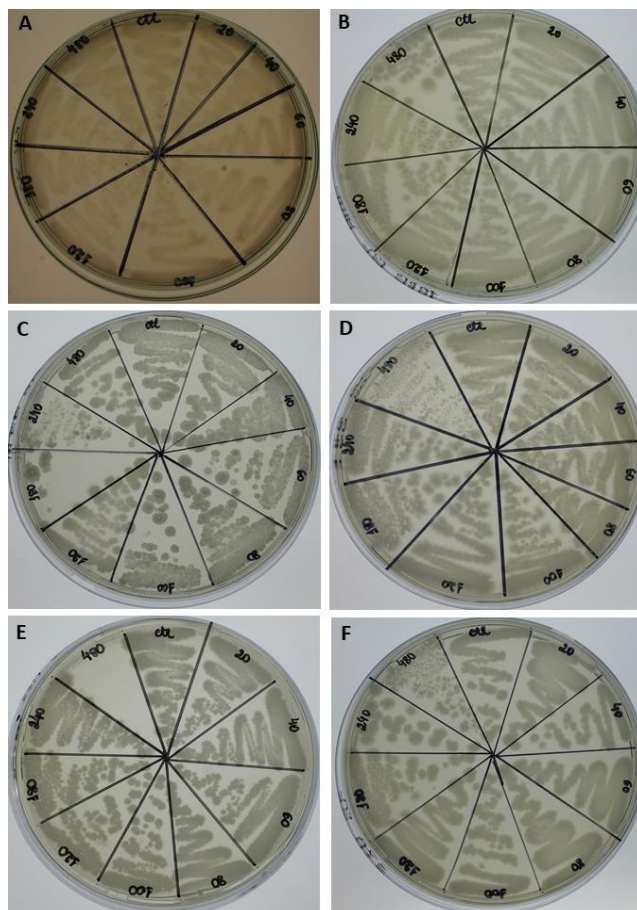
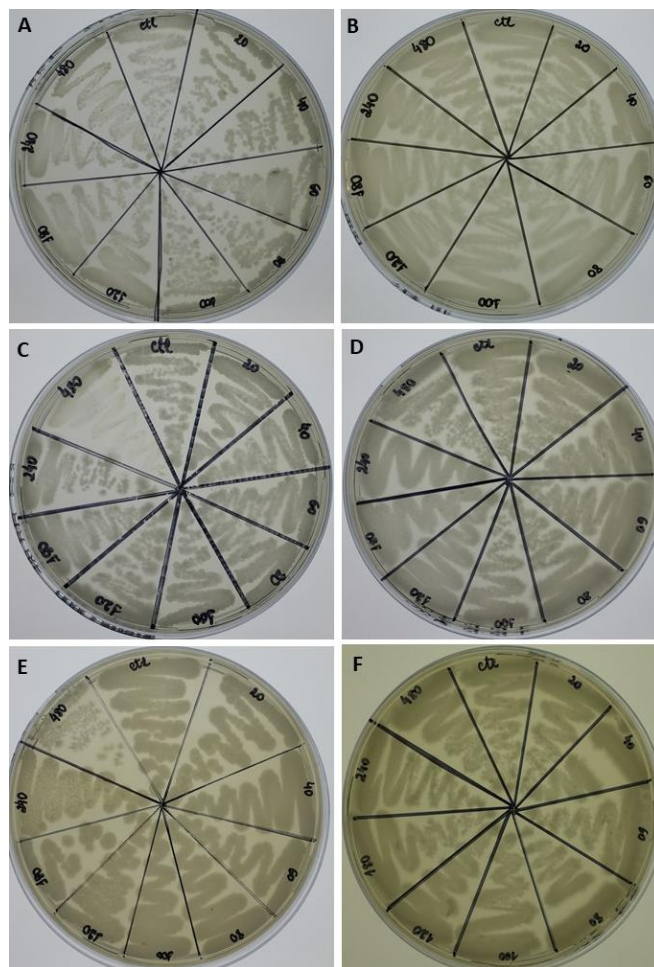


Figura 16. Viabilidade celular em placa na presença de cromo. As estirpes 8D.B (A), 10D.B (B), 16D.B (C), 7B.B (D), 22A (E) e 37A (F), foram semeadas em placa de meio de cultura sólido NB para confirmação de sua viabilidade colonial após exposição a meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de $K_2Cr_2O_7$. A semeadura ocorreu após 48h de cultivo das estirpes em presença do metal tóxico.

Quando comparado ao metal cromo, na presença de zinco, com exceção da estirpe 16D.B (Figura 16 C), todas as estirpes 8D.B, 10D.B, 7B.B, 22A e 37A (Figura 16 A-B-D-E-F) não apresentaram alteração em sua viabilidade, demonstrando seu crescimento normal após semeadura em placa contendo meio NB sólido. Para a estirpe 16 D.B, seu desenvolvimento foi alterado quando na presença da concentração de 480 mg.L^{-1} , após semeada em meio de cultura NB sólido.



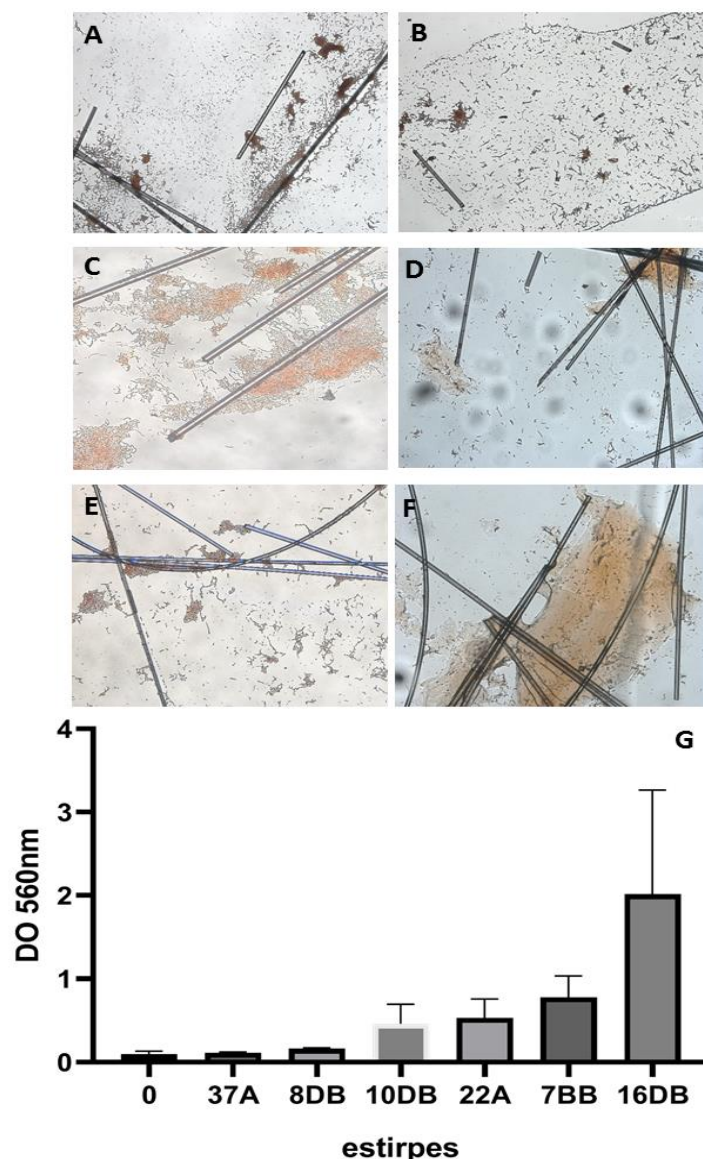


Figura 18. Formação e quantificação de biofilme. A formação de biofilme foi avaliada para todas as estirpes: 8D.B (A), 10D.B (B), 16D.B (C), 7B.B (D), 22A (E) e 37A (F), bem como a quantificação de biofilme (G). Para ambos os ensaios, todas as estirpes foram cultivadas em meio NB, complementado com lã de vidro por 48h e corada com safranina e cristal violeta, respectivamente. Para a quantificação de biofilme, foi obtido o valor da absorbância com o auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda em 560nm. As imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico e lente objetiva de 10X. O ensaio foi feito em triplicata e o controle negativo foi obtido nas mesmas condições. Dentre as estirpes avaliadas, a 16D.B foi que apresentou maior formação de biofilme ($p < 0,05$).

A produção de biofilme bacteriano foi visualizada na presença e ausência de metal para as estirpes 7B.B (Figura 18 A) e 16D.B (Figura 18 B). Porém, foi demonstrado que na presença dos metais tóxicos, ambas as estirpes bacterianas

aumentaram a produção de biofilme de acordo com o gráfico apresentado (Figura 18 E-F). Neste contexto destaca-se ainda que a produção de biofilme foi diferenciada para cada estirpe avaliada, quando na presença de zinco a estirpe 7B.B (D.O. 2,6) demonstrou maior produção de biofilme, sendo contrária a estirpe 16D.B (D.O 2,5) que apresentou sua produção de biofilme aumentada quando cultivada em meio NB líquido suplementado com cromo.

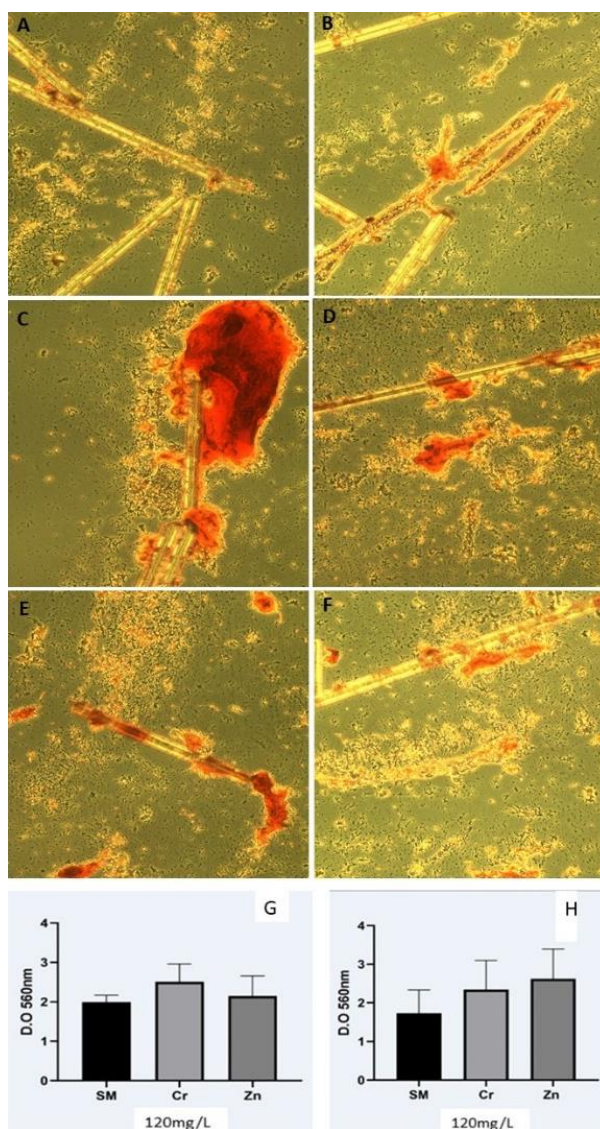


Figura 19. Visualização e quantificação de biofilme na ausência e presença de metal tóxico. A formação de biofilme foi avaliada para todas as estirpes 16D.B e 7B.B sem metal (A e B), na presença de cromo (C e D) e na presença de zinco (E e F) bem como a quantificação de biofilme 16D.B (G) e 7B.B (H). A visualização de biofilme foi obtida com o auxílio de Safranina e microscopia de luz. Para a quantificação de biofilme, foi obtido o valor da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda em 560nm. As imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico e lente objetiva de 10X. O ensaio foi realizado em triplicata e o controle negativo foi obtido nas mesmas condições.

6. DISCUSSÃO

Com o aumento populacional, crescimento da indústria e do uso de agrotóxico, sabe-se que cada vez mais poluentes são lançados no solo, contaminando não somente este, mas também os lençóis freáticos. Os dejetos lançados no ambiente se tornaram responsáveis pelo aumento do número de metais presentes no solo, que quando em concentrações mais elevadas se tornam tóxicos e afetam a sobrevivência de diferentes organismos. Nesse contexto, o estudo de bactérias resistentes a metais tóxicos tem sido largamente pesquisado por diferentes pesquisadores, a fim de buscar uma solução para a problemática desta contaminação ambiental por metais tóxicos.

Estudos de caracterização morfológica ainda são necessários, para identificar alterações celulares em micro-organismos expostos a situações de estresse, o que torna importante o conhecimento da morfologia de micro-organismos isolados em meios de cultura. Assim, as estirpes bacterianas aqui avaliadas apresentaram formas que variam entre bastões curtos a longos, juntamente usados para avaliar pureza dos mesmos acompanhado do crescimento em placa de meio de cultura NB sólido. Da Silva et al., (2005) demonstraram a presença de enterobactérias e bacilos gram-negativos, avaliando também sua morfologia em estudos para resistência de microrganismos a diferentes antibióticos. Neste contexto, Singh et al., (2020) através da microscopia eletrônica apresentaram mudanças morfológicas como quebra da parede, extravasamento de conteúdo celular, perda de turgidez e contorno da célula para *Bacillus subtilis* após tratamento com nano-emulsão lipídica. Através do estudo da morfologia é ainda possível apresentar a diversidade microbiana presente em uma comunidade isolada de diferentes nichos (Fonseca et al., 2000). Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, Matilda et al. (2020) demonstrou que na presença de cromo, a morfologia de isolados bacterianos com forma de bastonetes, apresentaram sua morfologia alterada com células longas e alongadas na forma de correntes. Assim, o estudo sobre a morfologia de diferentes organismos, é necessário a fim de identificar processos ocorridos em ambientes favoráveis ou não a sobrevivência do mesmo.

Fatores abióticos são conhecidos por desencadear respostas de estresses em micro-organismos, sendo a variação de pH conhecido por influenciar no crescimento e morfologia e ainda na função de algumas enzimas. O presente estudo demonstrou que em concentrações elevadas dos metais tóxicos cromo e zinco, o pH do meio se encontra levemente acidificado, sendo este fator permanente na presença dos isolados avaliados. Natarajan e Ting (2015) demonstraram que a modificação do pH

pode influenciar de forma positiva para solubilização e recuperação de metal presente no ambiente. Foi demonstrado que baixos valores de pH correspondem a maior concentração de íons H^+ livres em solução o que acarreta aumento da competição entre estes íons e os de metais de transição para serem adsorvidos (JIMENEZ et al., 2004). As condições ótimas de pH permitem que as enzimas fiquem em suas formas químicas adequadas o que permite sua ótima atividade (BASTOS, 2016) e funcionamento do metabolismo celular. Em diferentes estudos foi possível confirmar que valores de $pH < 4$ podem influenciar na adsorção de metais, sendo essa eficácia aumentada quando o pH se encontra entre valores de 5 e 7 (Chen et al., 2010; Joseph et al., 2019). Assim, os fatores externos podem apresentar grande influência sobre a biodisponibilidade e afetando a biorremediação de forma positiva ou negativa para os micro-organismos na presença de metais tóxicos.

Assim como o pH, a influência da presença de metal em meio de cultura também foi avaliada para as diferentes concentrações dos metais cromo e zinco. Neste contexto, foi demonstrado que mesmo em concentrações elevadas (240 e 480 $mg.L^{-1}$) as estirpes mantiveram seu crescimento, porém apresentaram um decréscimo quando comparado ao controle, bem como visualizado no ensaio de viabilidade celular e membrana. Shakoory et al., (2000) após isolamento de uma cepa de bactéria gram positiva CMB-Cr1 (ATCC700729), comprovaram sua resistência em meio de cultura LB suplementado com dicromato de potássio em 80 $mg.L^{-1}$, demonstrando ainda sua viabilidade da colônia e CIM para esta concentração. Neste contexto, Pandi et al., (2009), demonstraram que a bactéria *Spirulina fusiformis* foi capaz de acumular cromo em concentração de 300 $mg.L^{-1}$, sendo capaz de remover um total de 93 – 99% deste composto tóxico do licor de cromo.

Shreya et al., (2020) demonstraram a resistência de *Stenotrophomonas maltophilia*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *Bacillus subtilis* em solos contaminados com cromo e sua capacidade de biorremediar, auxiliando ainda no crescimento de *Cicer arietinum*. A resistência para cádmio também foi demonstrada para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações elevadas de 1000 ppm (Chakraborty e Das, 2014). Becerra-Castro et al., (2015) determinaram a resistência de *Escherichia coli* na presença de meios de cultura suplementados com cobre e zinco, porém foi confirmado que na presença de 1mM de zinco esta cultura teve seu crescimento inibido. Em ensaios de desenvolvimento para *Candida albicans* em presença de citrato de ferro, Duval et al. (2019), demonstrou que o aumento exponencial deste organismo foi visualizado para presença e ausência deste metal, bem como sua capacidade de desenvolver crescimento colonial em toda fase experimental através do ensaio de

CIM. Desta forma, ensaios em meios de cultura, acompanhados de ensaios de CIM e viabilidade de colônia e membrana do microrganismo, nos permite resposta para a possibilidade destes apresentarem capacidade de remediar compostos tóxicos do ambiente.

O biofilme é caracterizado pela formação de uma matriz exopolissacarídica formada por bactérias, a fim de promover maior resistência a estes microrganismos na presença de estresses abióticos. A presença de biofilme foi caracterizada para todas as estirpes avaliadas, sendo 16D.B, 7B.B, 22A e 10D.B as que apresentaram maior potencial formador evidenciado, respectivamente. De acordo com Rabin et al. (2015) os biofilmes são um conjunto de micro-organismos, que quando aderidos a uma superfície formam uma matriz capaz de aumentar a resistência destes organismos a condições abióticas. A investigação para a formação de biofilme vem demonstrando que o fenômeno está relacionado com um mecanismo de comunicação “quorum sensing”, onde uma vez formado e ativado o biofilme, este sistema torna-se estabelecido (Solano et al., 2014). Em conjunto ao “quorum sensing”, estudos demonstram que outras moléculas estão envolvidas a formação de biofilme bacteriano, como o diguanilato cíclico (c-di-GMP), um sistema de dois componentes (TCS) e ainda pequenos RNA (sRNA) como apresentado na revisão de Yi et al. (2019). Sendo assim, a arquitetura do biofilme se torna importante para manutenção e estabelecimento de um conjunto de células bacterianas sobre uma superfície presente em ambientes hostis.

Neste contexto, o cultivo das estirpes 16D.B e 7B.B em meio de cultura suplementado com metais cromo e zinco, demonstraram o aumento na síntese de biofilme bacteriano, o que auxiliou em sua sobrevivência na presença destes metais. Diferentes pesquisas demonstraram a capacidade de biofilmes microbianos sequestrar, imobilizar e mineralizar metais (Harrison et al., 2007), bem como sua capacidade de promover resistência a múltiplos metais de acordo com a diversidade microbiana (Koechler et al., 2015). Nocelli et al. (2016), demonstrou que quando na presença de metais como mercúrio (Hg) e Arsênio (As), cepas mutantes para a produção deficiente do EPS foram mais sensíveis e tiveram sua sobrevivência diminuída quando comparadas a cepas selvagens de *Sinorhizobium meliloti*. Domingues et al., (2020) avaliaram a presença de bactérias, capazes de produzir EPS e sua capacidade de resistência a metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco na presença do qual a densidade bacteriana foi aumentada em minas de cobre na Amazônia. Sendo assim, o biofilme microbiano além de apresentar a função de

proteger bactérias na presença de estresses abióticos, também possui a capacidade de imobilizar íons metálicos e auxiliar na biorremediação de compostos.

7. CONCLUSÃO

As análises obtidas demonstraram que as estirpes avaliadas foram capazes de apresentar características de resistência, visto seu crescimento em meio de cultura líquido suplementados com soluções de dicromato de potássio e sulfato de zinco em diferentes concentrações, especialmente em concentrações elevadas. Com exceção da estirpe 16D.B, as bactérias avaliadas apresentaram formas adaptativas aos metais tóxicos, demonstrando alterações na sua curva de crescimento, alternando entre período de desenvolvimento exponencial e latência. Ainda sobre os mecanismos de adaptação, através do ensaio de viabilidade em placa foi possível demonstrar que os metais apresentaram uma variação entre as características bacteriostático e bactericida sobre as estirpes avaliadas.

O ensaio de CIM demonstrou que as concentrações avaliadas não foram capazes de interferir no desenvolvimento de colônias nas diferentes concentrações avaliadas para ambos os metais. De acordo com ensaios fenotípicos, foi possível demonstrar que em condições de estresse as estirpes 16D.B e 7B.B foi capaz de aumentar sua produção de biofilme, apresentando a característica de resistência a diferentes condições ambientais. No entanto, em altas concentrações as mesmas estirpes demonstraram uma diminuição na sua viabilidade de membrana em altas concentrações para os metais avaliados.

Assim, através dos ensaios apresentados, podemos concluir que as estirpes avaliadas foram capazes de demonstrar seu desenvolvimento e produção de biofilme na presença de ambientes hostis. Sendo assim, caracterizam seu potencial de resistência a metais tóxicos e sua possibilidade para uso biorremediador, necessitando para este último maiores estudos.

8. REFERÊNCIAS

ABOU-SHANAB, R. A. I.; ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2882-2889, 2006.

ANDRADE, M. G. DE; MELO, V. DE F.; GABARDO, J.; SOUZA, L. C. DE P.; REISSMANN, C. B. Metais pesados em solos de área de contaminação e metalurgia de chumbo: I - Fitoextração. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, 2009.

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**. Intech Open ed. [s.l: s.n.].

BALDIRIS, R.; ACOSTA-TAPIA, N.; MONTES, A.; HERNÁNDEZ, J.; VIVAS-REYES, R. Reduction of Hexavalent Chromium and Detection of Chromate Reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Molecules**, v. 23, p. 1-20, 2018.

BARAL, A.; ENGELKEN, R. D. Chromium-based regulations and greening in metal finishing industries in the USA. **Environmental Science and Policy**, v. 5, p. 121-133, 2002.

BECERRA-CASTRO, C.; MACHADO, R. A.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C. M. "Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in gram-negative bacteria." **Science of the Total Environment**, v. 530-531, p. 367-372, 2015

BENTO, M. A. de O. **Prospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias da serrapilheira e do solo em área de floresta atlântica do Norte Fluminense**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

BHOJIYA, A. A.; JOSHI, H. Heavy metal tolerance pattern of *Pseudomonas putida* isolated from heavy metal contaminated soil of Zawar, Udaipur (India). **International Journal of Innovative Knowledge Concepts**, v. 2, p. 58-64, 2016.

BOLAN, N.; KUNHIKRISHNAN, A.; THANGARAJAN, R.; KUMPIENE, J.; PARK, J.; MAKINO, T.; SCHECKEL, K. (2014). Remediação de solos contaminados por metais pesados (loid) - Para mobilizar ou imobilizar? **Journal of Hazardous Materials**, v. 266, p. 141-166, 2013.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>> Acesso em: 11 fev. 2020.

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

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 198-207, 2000.

CASTRO, B. C.; MACHADO, R. A.; MOREIRA, I. V.; MANAIA, C. M.; "Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Science of the Total Environment**. v. 530–531, p. 367–372, 2015.

CHAKRABORTY, J.; DAS, S. Characterization and cadmium-resistant gene expression of biofilm-forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 14188-14201, 2014.

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.

CHOUDHURY, R.; SRIVASTAVA, S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. **Current Science**, v. 81, p. 768-775, 2001.

DHAL, B.; THATOI, H. N.; DAS, N. N.; PANDEY, B. D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and solid mining/metallurgy waste: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250, 272-291, 2013.

DI CESARE, A.; ECKERT, E. M.; D'URSO, S.; BERTONI, R.; GILLAN, D. C.; WATTIEZ, R.; CORNO, G. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 94, p. 208-214, 2016.

DÍAZ, M. I. R.; PÉREZ, C. D.; VARGAS, E.; ROSAS, H. R.; GARCÍA, J. C.; CERVANTES, C. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. **Biomaterials**, v. 21, p. 321-332, 2008.

DIXIT, R. et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability**, v. 7, n. 2, p. 2189-2212, 2015.

FERNÁNDEZ, Z. H. **ANÁLISE DE METAIS PESADOS EM SOLOS DE PERNAMBUCO COM DIFERENTES ATIVIDADES ANTRÓPICAS**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

FILHO, M. C. M.; CORIOLANO, A. C. F. BIORREMEDIAÇÃO, UMA ALTERNATIVA NA UTILIZAÇÃO EM ÁREAS DEGRADADAS PELA INDÚSTRIA PETROLÍFERA. **Holos**, v.7, p. 136-138, 2016.

FONSECA, M. C. C. DA; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. DE B. F.; CÂMARA, A. DE F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e Caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola". **Empresa brasileira de pesquisa agropecuária**. nº 43, p. 1-4, 2000.

FRANCISCO, W. C.; QUEIROZ, T. M. de. "Biorremediação." **Nucleus**, v.15, 2018.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion Biotechnology**, v. 11, p. 271-279, 2000.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, p. 109-119, 2004.

GAVRILESCU, M. Environmental Biotechnology: Achievements, Opportunities and Challenges. **Global Science Books**, v. 4, p. 1-36, 2009.

GONÇALVES, M. S.; BETTIN, J. P.; SILVA JUNIOR, L. C. S.; SAMPAIO, S. C.; DAL BOSCO, T. C. Adequação dos modelos de Langmuir e Freundlich na adsorção de cobre em solo argiloso do sul do Brasil. **Holos**, v. 4, n. 29, p. 37-44, 2013.

GRAZZIOTIN, P. G. **Caracterização de bactérias resistentes ao mercúrio e estratégias para biorremediação de ambientes contaminados**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

HASMAN, H.; SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. Antigen 43 and Type 1 Fimbriae Determine Colony Morphology of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 1089-1095, 2000.

HE, Y.; DONGA, L.; ZHOUA, S.; JIAA, Y.; GUA, R.; BAIA, Q.; GAOA, J.; LIA, Y.; XIAO, H. Chromium resistance characteristics of Cr (VI) resistance genes ChrA and ChrB in *Serratia sp.* S2. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 417-423, 2018.

HUANG, J.; WANG, J.; JIA, L. Removal of zinc (II) from livestock and poultry sewage by a zinc (II) resistant bacteria. **Nature Research**, v. 10, p. 1-13, 2020.

INTORNE, Aline Chaves. **Mecanismos de resistência a cádmio, cobalto e zinco em *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria promotora do crescimento vegetal**. Tese (Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

JIMENEZ, R. S.; BOSCO, S. M. D.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeolita natural escolecita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Quím. Nova**, Vol. 27, No. 5, 734-738, 2004.

JING, Y. D.; HE, Z. L.; XIAO, Y. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Zhejiang University Science B.**, v. 8, p. 192-207, 2007.

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.

JUWARKAR, A. A.; SINGH, S. K.; MUDHOO, A. A comprehensive overview of elements in bioremediation. **Revista Environment Science Biotechnology**, v. 09, p. 215-288, 2010.

KARMAKAR, R.; BINDIYA, S.; HARIPRASAD, P. Convergent evolution in bacteria from multiple origins under antibiotic and heavy metal stress, and endophytic conditions of host plant. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 858-867, 2019.

KENSA, M. Bioremediation: an overview. **Jr. of Industrial Pollution Control**, v. 27, p. 161-168, 2011.

KOECHLER, S.; FARASIN, J.; CLEISS-ARNOLD, J.; ARSÈNE-PLOETZE, F. "Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their Evolution." **Research in Microbiology**. v. 166, p. 764-773, 2015.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. FITORREMEDIAÇÃO: PLANTAS COMO AGENTES DE DESPOLUIÇÃO? **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 10, 2017.

LEGATZKI, A.; GRASS, G.; ANTON, A.; RENSING, C; NIES, D. H. Interplay of the Czc System and Two P-Type ATPases in Conferring Metal Resistance to *Ralstonia metallidurans*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 4354-4361, 2003.

LIANG, X.; NING, X. A.; CHEN, G.; LIN, M.; LIU, J.; WANG, Y. Concentrations and speciation of heavy metals in sludge from nine textile dyeing plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 128-134. 2013.

MAHAR, A. et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 111-121, 2016.

MATILDA, S.; MANNULLY, S. T.; RAO, V. P.; SHANTHI, C. "Chromium Binding *Bacillus cereus* VITSH1 – A promising candidate for heavy metal clean up". **Applied Microbiology**. v. 72, p. 517-525, 2021.

MANI, D.; KUMAR, C. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: An overview with special reference to 49 phyto remediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 843-872, 2013.

MATOS, W. O.; NÓBREGA, J. DE A. Especificação de cromo em cimentos e derivados de cimentos brasileiros. **Quím. Nova**, v. 32, p. 2094-2097, 2009.

MINARI, G. D.; SACCO, L. P.; SARAN, L. M.; ALVES, L. M. C. Bactérias resistentes em meio de cultivo contendo cádmio, cromo, níquel, zinco e mercúrio. **I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental**. UNESP, 2016.

NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Alemanha, v. 8, p. 199-216, 2008.

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

NANDA, M.; KUMAR, B.; SHARMA, D. K. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. **Aquatic Toxicology**, v. 212, p. 1-10, 2019.

NATARAJAN, G.; TING, YEN-PENG. "Gold biorecovery from e-waste: An improved strategy through spent medium leaching with pH modification." **Chemosphere**. v. 136, p. 232–238, 2015.

NOCELLI, N.; BOGINO, P. C.; BANCHIO, E.; GIORDANO, W.; "Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance and biofilm." **Materials**. v. 9, p. 418, 2016.

OVES, M.; SAGHIR, K.; HUDA, Q. A.; NADEEN, F. M.; ALMEELBI, T. Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 7, p. 1-15, 2016.

PANDI, M.; SHASHIREKHA, V.; SWAMY, M. "Bioabsorption of chromium from retain chrome liquor by cyanobacteria." **Microbiological Research**. v. 164, p. 420-428, 2009.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. de. USO DE MICROORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, p. 999-1001, 2012.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 15-39, 2005.

POLÍTICA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Lei nº 6.938/1981. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938.htm> Acesso em: 11 fev. 2020.

PRAPAGDEE, B.; WATCHARAMUSIK, A. Adaptive and cross-protective responses against cadmium and zinc toxicity in cadmium-resistant bacterium isolated from a zinc mine. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 838-845, 2009.

QUEIROZ, L. L. **PADRÕES DE DIVERSIDADE MICROBIANA EM SEDIMENTOS MARINHOS PROFUNDOS INFLUENCIADOS POR EXSUDAÇÃO DE ASFALTO**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, 2015.

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

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H. O. "Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents." **Future Medicine Chemistry**. v. 7, p. 493-512, 2015.

ROSEN, B. P. Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, p. 273-277, 1996.

SHAKOORI, A; MAKHDOOM, M; HAQ, R. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 348-351, 2000.

SILVA, P. DA; CARNEIRO, A. M. M.; CARLONI, M. C.; MEDEIROS, M. I. C.; SILVA, J. O.; RECHE, S. H. C.; ERRERA, M. C.; NEME, S. N.; "Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**. v. 64, p. 245-251, 2005.

SHERYA, D.; JINAL, H. N.; KARTIK, V. P.; AMARESAN, N. "Amelioration effect of chromium-tolerant bacteria on growth, physiological properties and chromium mobilization in chickpea (*Cicer arietinum*) under chromium stress." **Archives of Microbiology**. v. 202, p. 887-894, 2020.

SILVA, T. P. **Avaliação do processo de morte celular em bactérias aquáticas em dois modelos de ecossistemas aquáticos tropicais**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2012.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. Department of Microbiology and Immunology. **Gene**, v. 179, p. 9-19, 1996.

SINGH, N.; HUSSAIN, A.; SINGH, S. K. "Morphological transitions of *Bacillus subtilis* in the presence of food-grade lipidic nanoemulsions." **Journal of Food Science**. v. 0, 2020.

SOLANO, C.; Echeverz, M.; Lasa, I. "Biofilm dispersion and quorum sensing." **Current Opinion in Microbiology**. v. 18, p. 96-104, 2014.

SOUZA, S. C. R. de. **TOLERÂNCIA AOS METAIS PESADOS CHUMBO E ZINCO E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS**. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SUZUKI, S.; KIMURA, M.; AGUSA, T.; RAHMAN, H. M.; Vanadium accelerates horizontal transfer of tet(M) gene from marine *Photobacterium* to *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 336, p. 1-5, 2012.

THACKER, U.; PARIKH, R.; SHOUCHE, Y.; MADAMWAR, D. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1332-1337, 2006.

TOOLE, G. O.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

TRENTIN, D. DA S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, p. 113-238, 2013.

VICENTIN, R. P. **Remoção e alocação de metais pesados por bactérias diazotróficas nodulíferas da espécie *Cupriavidus necatur***. Tese (Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

WHITE, G. F.; EDWARDS, M. J.; GOMEZ, P. L.; RICHARDSON, D. J.; BUTT, J. N.; CLARKE, T. A.; Mechanisms of Bacterial Extracellular Electron Exchange. **Advances in Microbial Physiology**, v. 68, p. 87-138, 2016.

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

WILLIAMS, J. W.; SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 530-537, 1984.

WU, C.; LABRIE, J.; TREMBLAY, Y. D. N.; HAINE, D.; MOUREZ, M.; JACQUES, M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 30-40, 2013.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, p. 2-13, 2003.

XIONG, J.; LI, D.; LI, H.; HE, M.; MILLER, S. J.; YU, L.; RENSING, C.; WANG, G. Genome analysis and characterization of zinc efflux systems of a highly zinc resistant

bacterium, *Comamonas testosteroni* S44. **Research Microbiology**, v. 162, p. 671-679, 2011.

YAHAGHI, Z. et al. Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 573–582, 2019.

Yi, L.; Li, J.; Liu, B.; Wang, Y.; “Advances in research on signal molecules regulating biofilms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 35, p. 130, 2019.

YU, Z.; GUNN, L.; WALL, P.; FANNING, S. Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. **Food Microbiology**, v. 64, p. 23-32, 2017.

ZHANG, H.; GAO, Z.; LIU, Y.; RAN, C.; MAO, X.; KANG, Q.; AO, W.; FU, J.; LI, J.; LIU, G.; DAI, J. Microwave-assisted pyrolysis of textile dyeing sludge, and migration and distribution of heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 355, p. 128-135. 2018.