

BÁRBARA PEREIRA DA SILVA

**Identificação de Bactérias Isoladas de Elementos Metálicos de Torres de Transmissão de Energia Elétrica e Avaliação de Resistência à Metais Pesados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2011

BÁRBARA PEREIRA DA SILVA

Identificação de Bactérias Isoladas de Elementos Metálicos de Torres de Transmissão de Energia Elétrica e Avaliação de Resistência à Metais Pesados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

São Paulo  
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Silva, Bárbara Pereira da.

Identificação de bactérias isoladas de elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica e avaliação de resistência à metais pesados / Bárbara Pereira da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Fabiana Fantinatti-Garboggini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Taxonomia molecular de bactérias.

Versão do título para o inglês: Identification of bacteria isolated from metallic elements of electric energy transmission towers and evaluation of heavy metal resistance.

Descritores: 1. *Fingerprinting* genômico 2. Gene RNA ribossomal 16S 3. Resistência à metais pesados I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0100/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Bárbara Pereira da Silva.

Título da Dissertação: Identificação de bactérias isoladas de elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica e avaliação de resistência à metais pesados.

Orientador(a): Fabiana Fantinatti-Garboggini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição:.....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição:.....



Universidade Estadual de Campinas  
Coordenadoria Geral da Universidade  
**Comissão de Ética Ambiental**

GERENCIAMENTO  
DE RESÍDUOS  
BIOLÓGICOS, QUÍMICOS  
E RADIOATIVOS

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 14 de abril de 2011.

*Of. CGU/Resíduos/ Comissão de Ética Ambiental 49/2011*

A  
Dr<sup>a</sup>. Fabiana Fantinatti Garboggini  
Divisão de Recursos Microbianos  
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas  
Universidade Estadual de Campinas

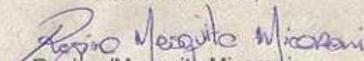
**Referência:** PARECER SOBRE ENCAMINHAMENTO DE RESÍDUO PROJETO FAPESP 2009 (Parecer CEA 08/2009) – Projeto: Caracterização da diversidade de bactérias isoladas em elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica.

Prezada Dr<sup>a</sup>. Fabiana ,

Segue, em anexo, o parecer sobre a destinação final dada aos resíduos gerados no projeto: Caracterização da diversidade de bactérias isoladas em elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica, conforme relatório de encaminhamento de resíduos enviado à Comissão de Ética Ambiental da UNICAMP.

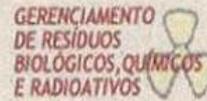
Informamos que a destinação dada ao resíduo: precipitação de metais para envio para aterro de produtos perigosos (Classe I), inativação de resíduos biológicos com hipoclorito, seguida de precipitação de metais em solução e esterilização por autoclavação de material sólido com contaminação biológica e de metais tóxicos, seguida de envio a um Aterro Classe I é adequada.

Atenciosamente,

  
Regina /Mesquita Micaroni  
**Comissão de Ética Ambiental**  
Universidade Estadual de Campinas



Universidade Estadual de Campinas  
Coordenadoria Geral da Universidade  
**Comissão de Ética Ambiental**



Número do Processo na Comissão de Ética Ambiental da UNICAMP: 02/2011

#### IDENTIFICAÇÃO

1. Unidade: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
2. Pesquisador responsável: Dr<sup>a</sup>. Fabiana Fantinatti Garboggini
3. Título do Projeto: Caracterização da diversidade de bactérias isoladas em elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica.
4. Agência de Fomento: FAPESP.

#### PARECER DO ASSESSOR

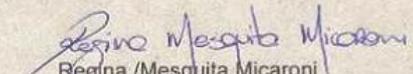
No projeto "Caracterização da diversidade de bactérias isoladas em elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica" foram gerados cerca de 40 kg de resíduo, dos quais 39 kg eram resíduos com contaminação biológica e de metais tóxicos.

Os resíduos com contaminação biológica e de metais tóxicos em solução foram inativados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % e, posteriormente, os metais foram precipitados usando hidróxido de sódio. Para os resíduos sólidos com contaminação biológica e de metais tóxicos foi realizada a esterilização em autoclave (121°C por 15 minutos), seguida do envio a um Aterro de produtos perigosos (Classe I). Para os metais em solução (aproximadamente 50g), o tratamento foi realizado por precipitação usando hidróxido de sódio e posterior envio do sólido precipitado para um aterro de produtos perigosos.

Diante do exposto recomendamos a aprovação da destinação dada aos resíduos gerados no projeto "Caracterização da diversidade de bactérias isoladas em elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica".

Local: Campinas

Data: 14/04/2011

  
Regina /Mesquita Micaroni  
Comissão de Ética Ambiental  
Universidade Estadual de Campinas

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por todo o apoio e compreensão, sem eles, nada disso seria possível.

Aos familiares sempre presentes apesar da distância.

Ao Hugo pelo carinho, apoio, companhia e incentivo.

Aos meus amigos da XXXIX, que estando perto ou longe, de alguma forma me incentivaram e torceram pela conclusão desse trabalho. Em especial, Ozark, Varvito, Lag e Maca.

À Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini pela oportunidade, orientação e amizade.

À Dra. Valéria Maia e Dra. Lara Sette pela convivência e ajuda ao longo do mestrado.

A todos da DRM, alunos e funcionários, pela convivência, ajuda, conversas, risadas, “cafés” e pelas amizades. Em especial, Cláudia, Michel, Fernando, Leandro, Bruna, Tiago, Samanta e Milena.

À Karen pela grande ajuda no laboratório de molecular e pela amizade.

À Rafa e Paula pela convivência, ajuda, conselhos e pela grande amizade.

À empresa Bandeirante de Energia do Brasil pelas amostras de elementos metálicos das torres de transmissão de energia elétrica.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

Finalmente a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

## RESUMO

Silva BP. Identificação de Bactérias Isoladas de Elementos Metálicos de Torres de Transmissão de Energia Elétrica e Avaliação de Resistência à Metais Pesados [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

A corrosão metálica é um problema que afeta a economia mundial, gerando enormes gastos para a população e mais especificamente para algumas indústrias. As reações de corrosão aumentam os custos de geração, transmissão e distribuição de energia elétrica e podem ser influenciadas por atividades microbianas, podendo levar a aceleração ou inibição do processo. As bactérias capazes de influenciar os processos de corrosão apresentam uma característica interessante do ponto de vista biotecnológico, pois sobrevivem em ambientes com altas concentrações de metais, podendo ser utilizadas na biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados. O presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar as bactérias associadas a processos de biocorrosão e/ou biotransformação em estruturas metálicas de torres de transmissão de energia em operação no campo, bem como avaliar a resistência destas bactérias a diferentes metais pesados. A identificação taxonômica dos isolados de bactérias associados a elementos metálicos foi efetuada por análise filogenética das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S após a seleção de ribotipos distintos obtidos pela análise de *fingerprinting* genômico. O isolamento de bactérias associadas a elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica resultou em 101 bactérias distribuídas em oito gêneros: *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Exiguobacterium*, *Chryseobacterium*, *Bacillus* e *Acinetobacter*, sendo os gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* os mais abundantes. Os 101 isolados foram avaliados quanto à resistência a diferentes metais pesados e no geral todos os gêneros foram resistentes a mais de um metal. Para a maioria dos isolados e dos metais, o crescimento bacteriano diminuiu conforme o aumento da concentração do metal. O metal que menos afetou o crescimento dos isolados das torres foi o cromo e o que mais afetou foi o mercúrio. Os isolados BD69, BD76, BD78 e BD79 do gênero *Acinetobacter* se destacam por sua resistência ao cobre, enquanto os isolados BD11, BD50, BD65 e BD115 do gênero *Serratia* e os isolados BD10, BD20, BD21 e BD22 do gênero *Lysinibacillus* se destacaram pela resistência ao arsenito. Os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* também se destacaram pela resistência ao arsênio, apresentando isolados que praticamente não tiveram seu crescimento alterado na concentração de 10 mM de arsenito. No gênero *Stenotrophomonas* se destacaram os isolados BD82 e BD129 que foram bem mais resistentes do que os isolados BD61 e BD96 desse mesmo gênero em vários metais. Os gêneros

*Exiguobacterium* e *Chryseobacterium* não apresentaram uma alta resistência aos metais testados, com exceção do cromo para *Exiguobacterium* e arsênio para ambos.

**Palavras-chave:** *Fingerprinting* genômico. Gene RNA ribossomal 16S. Resistência à metais pesados.

## ABSTRACT

Silva BP. Identification of Bacteria Isolated from Metallic Elements of Electric Energy Transmission Towers and Evaluation of Heavy Metal Resistance. [Master Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Metallic corrosion is a problem that affects the world economy, generating huge costs to the population and more specifically to certain industries. The corrosion reactions increases the cost of generating, transmission and distribution of electric energy and may be influenced by microbial activities which can lead to inhibition or acceleration of the process. Bacteria capable of influencing corrosion processes have an interesting feature of the biotechnological point of view, since they can survive in environments with high concentrations of metals and could be used in bioremediation of heavy metals contaminated environments. This study aimed to isolate and identify bacteria associated with biocorrosion processes and/or biotransformation in metallic structures of power transmission towers on operation in the field, as well as evaluating the resistance of these bacteria to different heavy metals. The taxonomic identification of the isolates of bacteria associated with metallic elements was performed by phylogenetic analysis of partial sequences of 16S ribosomal RNA gene after selection of distinct ribotypes obtained by the analysis of genomic fingerprinting. The isolation of bacteria associated with metallic elements of transmission towers for electric power resulted in 101 bacteria distributed in eight genera: *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Exiguobacterium*, *Chryseobacterium*, *Bacillus* and *Acinetobacter*, being the genera *Acinetobacter* and *Pseudomonas* the most abundant. The 101 isolates were evaluated for resistance to different heavy metals and in general all genera were resistant to more than one metal. For most of the isolates and metals, bacterial growth decreases with increasing concentration of the metal. The metal that least affected the growth of isolates of the towers was chromium and that most affected was mercury. The isolates BD69, BD76, BD78 and BD79 from *Acinetobacter* genus are noted for their resistance to copper, while isolates BD11, BD50, BD65 and BD115 from *Serratia* genus and isolates BD10, BD20, BD21 and BD22 from *Lysinibacillus* genus stood out for resistance to arsenite. Genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were also noted for their resistance to arsenic, showing isolates that hardly changed their growth at a concentration of 10 mM of arsenite. In the genus *Stenotrophomonas* stood out isolates BD82 and BD129, which were much more resistant than isolates BD61 and BD96, of the same genus, in several metals. The genera *Exiguobacterium* and *Chryseobacterium* do not show high resistance to metals tested, except for chrome to *Exiguobacterium* and arsenic for both.

**Keywords:** Genomic fingerprinting. 16S ribosomal RNA gene. Heavy metals resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** A. Elementos metálicos imersos em tampão PBS. B. Isolados de bactérias purificados em meio de cultivo sólido. ....39
- Figura 2.** Solução estoque dos metais pesados utilizados no estudo. ....41
- Figura 3.** Teste de resistência a metais pesados em microplaca de 96 poços. Linha 1: diferentes concentrações de metais (0,5 a 10 mM, exceto para  $\text{HgCl}_2$  que foi de 0,1 mM – 2 mM); Coluna 1: inóculo bacteriano; Poço A1: controle negativo: meio de cultivo sem o metal pesado e sem bactéria. ....42
- Figura 4.** Distribuição do número de bactérias isoladas por meio de cultivo para cada elemento metálico. ....43
- Figura 5.** Quantificação de DNA genômico de alguns isolados em gel de agarose 0,8%. ....44
- Figura 6.** Dendograma de similaridade construído pelo *software* GelCompar (version 4.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium) a partir de uma análise do perfil de bandas do gene ribossomal 16S, após digestão com as enzimas *Hae* III, *Msp* I, *Hha* I. ....45
- Figura 7.** Árvore filogenética baseada em análises das sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias do filo *Proteobacteria* associadas a elementos metálicos (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 re-amostragens). ....46
- Figura 8.** Árvore filogenética baseada em análises das sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* associadas a elementos metálicos (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 re-amostragens). ....47
- Figura 9.** Distribuição da diversidade microbiana encontrada nas amostras derivadas de torres de transmissão de energia elétrica. ....48
- Figura 10.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....50
- Figura 11.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....51
- Figura 12.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....52
- Figura 13.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....53

<b>Figura 14.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....	54
<b>Figura 15.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03....	55
<b>Figura 16.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $Na_2AsO_2$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....	56
<b>Figura 17.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $HgCl_2$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03. ....	57
<b>Figura 18.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	60
<b>Figura 19.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	60
<b>Figura 20.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	61
<b>Figura 21.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	61
<b>Figura 22.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	62
<b>Figura 23.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	62
<b>Figura 24.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $Na_2AsO_2$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	63
<b>Figura 25.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Lysinibacillus</i> frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $HgCl_2$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63. ....	63
<b>Figura 26.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47. ....	65

<b>Figura 27.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47. ....	65
<b>Figura 28.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.....	66
<b>Figura 29.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47....	66
<b>Figura 30.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.....	67
<b>Figura 31.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.....	67
<b>Figura 32.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.	68
<b>Figura 33.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47. ....	68
<b>Figura 34.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Serratia</i> frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	71
<b>Figura 35.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Serratia</i> frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	71
<b>Figura 36.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Serratia</i> frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	72
<b>Figura 37.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i> frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	72
<b>Figura 38.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Serratia</i> frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	73
<b>Figura 39.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Serratia</i> frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	73
<b>Figura 40.</b> Crescimento celular dos isolados do gênero <i>Serratia</i> frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ) A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....	74

- Figura 41.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.....74
- Figura 42.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....75
- Figura 43.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....76
- Figura 44.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....76
- Figura 45.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....77
- Figura 46.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....77
- Figura 47.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....78
- Figura 48.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....78
- Figura 49.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.....79
- Figura 50.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.....81
- Figura 51.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104. ....81
- Figura 52.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104. ....82
- Figura 53.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104. ....82

**Figura 54.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.....83

**Figura 55.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.83

**Figura 56.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $Na_2AsO_2$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104. ....84

**Figura 57.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $HgCl_2$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.....84

**Figura 58.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....87

**Figura 59.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....88

**Figura 60.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....89

**Figura 61.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....90

**Figura 62.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28,

BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....91

**Figura 63.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....92

**Figura 64.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....93

**Figura 65.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94. ....94

**Figura 66.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). ....96

**Figura 67.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). ....96

**Figura 68.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). ....97

**Figura 69.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). ....97

**Figura 70.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). ....98

**Figura 71.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). ....98

**Figura 72.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). ....98

**Figura 73.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). .....99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Composição de ligas metálicas utilizadas em estruturas metálicas. ....	22
<b>Tabela 2-</b> Amostras coletadas em torres de transmissão de energia elétrica na região da grande São Paulo.....	38

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Torres de transmissão de energia elétrica .....	21
2.2 MIC ou Biocorrosão .....	22
2.3 Metais pesados e sua relação com a célula.....	26
2.4 Bactérias resistentes a metais pesados.....	29
2.5 Biorremediação.....	35
3 OBJETIVO .....	37
3.1 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Coleta, isolamento e condições de cultivo.....	38
4.2 Identificação dos isolados .....	39
4.2.1 <i>Extração e quantificação de DNA genômico</i> .....	39
4.2.2 <i>Análises de fingerprinting genômico</i> .....	39
4.2.3 <i>Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S</i> .....	40
4.2 Avaliação da resistência a metais pesados .....	40
4.3 Manutenção e preservação dos isolados na CBMAI .....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1 Isolamento de bactérias associadas a elementos metálicos .....	43
5.2 Identificação dos isolados .....	43
5.2.1 <i>Extração e quantificação de DNA genômico</i> .....	44
5.2.2 <i>Análises de fingerprinting genômico</i> .....	44
5.2.3 <i>Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S</i> .....	45
5.3 Avaliação da resistência a metais pesados .....	49
5.3.1 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Bacillus</i> .....	50
5.3.2 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Lysinibacillus</i> .....	59
5.3.3 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Exiguobacterium</i> .....	64
5.3.4 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Serratia</i> .....	70
5.3.5 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Stenotrophomonas</i> .....	75
5.3.6 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Pseudomonas</i> .....	80
5.3.7 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Acinetobacter</i> .....	86
5.3.8 <i>Avaliação da resistência a metais pesados: gênero Chryseobacterium</i> .....	95
6 CONCLUSÕES .....	104
REFERÊNCIAS .....	105
ANEXO A - Bactérias associadas a elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica isoladas neste estudo.....	114
ANEXO B - Bactérias resistentes a metais pesados, isoladas a partir de elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica.....	115
ANEXO C - Valores de média e desvio padrão calculados para os isolados nos quais os testes de resistência a metais pesados foram feitos em triplicatas. ....	116

## 1 INTRODUÇÃO

A corrosão metálica é um problema que afeta a economia mundial, gerando enormes gastos para a população e mais especificamente para algumas indústrias. As principais estruturas afetadas são as tubulações de transporte de petróleo e de água e esgoto. Em 2002, um estudo sobre o custo da corrosão em 26 setores da indústria nos Estados Unidos estimou um custo total direto de 276 bilhões de dólares devido à corrosão metálica por ano, aproximadamente 3% do produto interno bruto. Além disso, a corrosão é responsável pelo aumento dos custos de geração, transmissão e distribuição de energia elétrica, sendo, em 1998, responsável por aproximadamente 8% do custo total de eletricidade para os consumidores dos Estados Unidos (Koch et al., 2001). Não há informações sobre o prejuízo causado pela corrosão em estruturas de transmissão e distribuição de energia elétrica no Brasil, entretanto, sabe-se que a corrosão compromete estruturas metálicas em vários setores da indústria brasileira. A corrosão ocorre quando materiais feitos de metais sofrem alterações químicas, onde acontece uma transferência de elétrons que leva esses metais para um estado ionizado. Esse processo consiste em uma reação aniônica que envolve a ionização (oxidação) do metal, que é a reação de corrosão propriamente dita, e uma reação catiônica baseada na redução de uma espécie química (Gentil, 1996). Essas reações podem ser influenciadas por atividades microbianas, especialmente quando os organismos estão em contato com a superfície do metal, formando um biofilme que pode levar a aceleração ou inibição da corrosão (Beech e Gaylard, 1999; Jayaraman et al., 1999; Rajasekar et al., 2007). Esse tipo de deterioração do metal é conhecido por biocorrosão ou corrosão influenciada por micro-organismos (MIC). Os biofilmes afetam as interações entre a superfície do metal e seu ambiente, não só em processos de deterioração, como o MIC, mas também em alguns processos biotecnológicos ligados, principalmente, a recuperação de materiais. Portanto, o biofilme é considerado a chave para as alterações ocorridas na superfície do metal, que causam o aumento ou a inibição da corrosão. Os micro-organismos influenciam a corrosão na medida em que modificam as condições eletroquímicas da superfície do metal em contato com o biofilme. Este induz alterações no tipo e concentração de íons, valores de pH e de potencial de oxiredução, alterando desta forma o comportamento do substrato metálico (Beech e Gaylard, 1999).

Os micro-organismos envolvidos na biocorrosão de metais como ferro, cobre e alumínio apresentam uma grande diversidade fisiológica. Sua capacidade de influenciar na corrosão de vários metais normalmente considerados resistentes a corrosão, em diversos ambientes, resulta numa ameaça real a estabilidade destes metais. Esses micro-organismos podem coexistir naturalmente sob a forma de biofilmes, frequentemente formando

consórcios que são capazes de afetar processos eletroquímicos através do metabolismo cooperativo, não observado em espécies individuais (Gayosso et al., 2004). A alteração desses processos eletroquímicos pode influenciar tanto na formação da corrosão metálica, quanto na inibição da mesma. A inibição da corrosão pela formação de um biofilme tem sido observada em diferentes materiais expostos a ambientes corrosivos na presença de diferentes bactérias (Nagiub e Mansfeld, 2002; Juzeliunas et al., 2005). Assim como as bactérias que influenciam o processo da corrosão metálica, as bactérias que inibem esse processo apresentam uma característica interessante do ponto de vista biotecnológico: ambos os grupos sobrevivem em ambientes com altas concentrações de metais.

Com o aumento da poluição nas áreas industriais, o interesse por micro-organismos resistentes a metais pesados tem aumentado e vários estudos relacionando micro-organismos e metais pesados têm sido realizados. Como os poluentes metálicos não são degradados, alternativas para transformar esses metais pesados em metais menos tóxicos, assim como, alternativas para remoção desses poluentes têm sido alvo de interesse de pesquisas. A remoção dos metais pesados no ambiente pode ser feita através de tratamentos físico-químicos ou com a utilização de micro-organismos, através da biorremediação (Costa e Duta, 2001; Sar et al., 2001). Os principais processos pelos quais os micro-organismos realizam a biorremediação são a bioissorção e a biotransformação de metais.

O termo “bioissorção” é definido como um processo onde sólidos de origem natural ou seus derivados são usados na retenção de metais pesados de um ambiente aquoso. A bioissorção compreende a ligação de metais à biomassa por um processo que não envolva energia metabólica ou transporte (Vieira e Volesky, 2000). Já o principal foco nos estudos de biotransformação é a conversão de íons metálicos para formas menos tóxicas através de reações de redução (De et al., 2008).

A biorremediação é interessante se comparada com métodos físico-químicos de remoção de metais, pois pode apresentar baixo custo e alta eficiência quando as concentrações de metais são baixas (Volesky e Holan, 1995; Sivaprakash et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a identificação de bactérias associadas a torres de transmissão de energia elétrica e a avaliação de possíveis bactérias resistentes a metais pesados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Torres de transmissão de energia elétrica

As torres das linhas de transmissão de energia elétrica são projetadas para atender a longos períodos de operação. Dentre os materiais mais utilizados na fabricação das torres destacam-se os metais, devido sua resistência mecânica, facilidade para montagem e manutenção da estrutura em campo. Porém, os metais estão sujeitos a um fenômeno comum na natureza conhecido por corrosão. No caso das torres, elas estão sujeitas a agressividade de dois ambientes totalmente diferentes: a atmosfera e o solo. Na atmosfera, a corrosão dependerá da temperatura, umidade relativa, partículas em suspensão e gases. Já no solo, a corrosão deverá ocorrer em função da porosidade, condutividade elétrica, umidade, sais dissolvidos, pH e micro-organismos. Dentre os metais mais comuns utilizados em torres de energia, o aço inoxidável sofre a corrosão com a presença do íon cloreto. Por sua vez, o alumínio é corroído com facilidade na presença de ácido clorídrico e soluções de bases fortes, como hidróxido de sódio e sais de mercúrio e o cobre sofre a corrosão acentuada quando submetido às soluções amoniacais (Gentil, 1996). O produto da corrosão, seja ela qual for, danifica as estruturas metálicas das torres, aumentando os custos de geração, transmissão e distribuição de energia elétrica. O prejuízo causado pela corrosão na indústria de energia elétrica nos Estados Unidos em 1998 foi estimado em torno de 17 bilhões de dólares (Koch et al., 2001).

Devido à agressividade da corrosão, as estruturas e os equipamentos de aço-carbono devem ser protegidos, sendo usual o emprego de revestimentos com tintas a base de resinas poliuretana, vinílica, epóxi, acrílica ou a base de silicato inorgânico ou orgânico de zinco. De todas as diferentes intervenções que podem ser utilizadas para prevenir a corrosão das torres, a que tem se mostrado mais eficaz é a galvanização de todas as peças de sua estrutura. Esse processo consiste na imersão das peças da estrutura em um banho de zinco e alumínio fundido. O termo galvanização é atribuído à interação entre o aço e o zinco, uma vez em contato com um meio úmido, é criada uma diferença de potencial elétrico entre os metais e ocorre o fluxo de elétrons. Essa corrente recebe o nome de corrente galvânica e esse tipo de proteção é chamado de proteção catódica com ânodos de sacrifício ou galvânicos. Nesse processo, o metal protegido funciona como um cátodo e não tem a sua massa oxidada no processo de corrosão. Para as torres, o zinco é o ânodo de sacrifício, ou seja, o elemento que será corroído na superfície da torre, em sua camada de revestimento, protegendo dessa forma o material base da estrutura. O alumínio não exerce uma função marcante na galvanização, pois aparece em quantidades abaixo de 0,006% e serve para dar brilho a superfície da liga (Gentil, 1996; Amaral et al., 2008).

Outra forma de tentar prevenir a corrosão é com a utilização de ligas de aços especiais na montagem das estruturas das torres. Um tipo de aço que vem sendo utilizado em diversas estruturas e que não necessita de pintura de revestimento é o aço aclimável. Os chamados aços patináveis ou aclimáveis (*weathering steel*), conhecidos pelos nomes de COR – TEM, SAC, COS – ARCOR e classificados como ASTM – A 242 são aqueles que dentro de certas circunstâncias se recobrem de uma ferrugem protetora, evitando assim a aplicação de tintas ou revestimentos. Esses aços, embora não apresentem resistência à corrosão como do aço inoxidável, apresentam resistência maior à corrosão atmosférica do que o aço-carbono. Essa maior resistência se deve ao fato de que no período inicial da corrosão atmosférica há formação de ferrugem, e ao contrário do aço-carbono, essa ferrugem tende, após algum tempo, a se estabilizar: o filme de óxido é muito denso, e nem a água nem o oxigênio podem atravessá-lo, cessando, portanto, a corrosão do aço. No entanto, os aços patináveis ou aclimáveis quando usados imersos ou sujeitos à ação direta da névoa salina necessitam também de proteção com revestimento de tintas (Gentil, 1996). As principais ligas desses aços estão apresentadas na tabela abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1-** Composição de ligas metálicas utilizadas em estruturas metálicas.

Aço	Composição (%)*										
	C	Mn	P	S (Máx)	Si	Cu	Cr	Ni	V	Ti	Nb
<b>COR-TEN A</b>	0,12 (Máx)	0,20- 0,50	0,07- 0,15	0,05	0,25- 0,75	0,25- 0,55	0,30- 1,35	0,65 (Máx)	-	-	-
<b>COR-TEN B</b>	0,10-0,19	0,90- 1,25	0,04 (Máx)	0,05	0,15- 0,30	0,25- 0,40	0,40- 0,65	-	0,02- 0,10	-	-
<b>COR-TEN C</b>	0,12-0,19	0,90- 1,35	0,04 (Máx)	0,05	0,15- 0,30	0,25- 0,40	0,40- 0,70	-	0,04- 0,10	-	-
<b>SAC-50-1</b>	0,12 (Máx)	≤ 0,90	0,06- 0,12	0,035	0,15- 0,35	0,25- 0,50	-	-	-	0,15 (Máx)	-
<b>COS-AR- COR</b>	0,11	0,93	0,01	0,007	0,30	0,25	0,50	0,06	-	-	0,01
<b>NIOCOR</b>	0,12	0,36	0,07	0,02	0,52	0,30	0,77	0,03	-	-	0,02
<b>AÇO- CARBONO</b>	0,16	0,63	0,012	0,031	0,012	0,01	0,03	0,01	-	-	-

\* Porcentagem do metal que compõe o aço. Fonte Gentil, 1996.

## 2.2 MIC ou Biocorrosão

Corrosão é um processo de ocorrência natural, comumente definido como a deterioração de um material, geralmente metálico, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente aliada ou não a esforços mecânicos. A corrosão química corresponde ao ataque de um agente químico diretamente sobre o material, sem transferência de elétrons

de uma área para outra. Na corrosão eletroquímica ocorrem reações que envolvem transferência de carga ou elétrons através de uma interface ou eletrólito. Esse processo consiste em uma reação aniônica que envolve a ionização (oxidação) do metal, que é a reação de corrosão propriamente dita, e uma reação catiônica baseada na redução de uma espécie química (Gentil, 1996). Essas reações podem ser influenciadas por atividades microbianas, especialmente quando os organismos estão em contato com a superfície do metal, formando um biofilme que pode levar a aceleração ou inibição da corrosão (Beech e Gaylard, 1999; Jayaraman et al., 1999; Rajasekar et al., 2007). Esse tipo de deterioração do metal é conhecido por biocorrosão ou corrosão influenciada por micro-organismos (MIC).

A biocorrosão é o resultado de interações entre a superfície metálica, produtos da corrosão abiótica, células bacterianas e seus metabólitos, incluindo ácidos orgânicos e inorgânicos e compostos voláteis como amônia e sulfeto de hidrogênio (Beech e Sunner, 2004). Os micro-organismos e seus metabólitos influenciam a corrosão na medida em que modificam os processos eletroquímicos na superfície do metal em contato com o biofilme. Este induz alterações no tipo e concentração de íons, valores de pH e de potencial de oxiredução, alterando desta forma o comportamento do substrato metálico. O biofilme é composto aproximadamente por 95% de água, bactérias e uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que facilita a ligação das células com a superfície. O EPS secretado pela célula bacteriana é composto por polissacarídeos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas, dependendo da espécie bacteriana produtora e das condições nutricionais e ambientais do cultivo. O material polimérico, além de favorecer a fixação dos micro-organismos também serve como fonte nutricional no caso de baixa disponibilidade de nutrientes. As proteínas e carboidratos que compõem os exopolímeros podem ainda se ligar a íons metálicos através de seus grupos funcionais o que pode intensificar o processo corrosivo (Beech e Gaylard, 1999; Beech e Sunner, 2004; Fang et al., 2002).

Os principais tipos de micro-organismos associados com os problemas de corrosão em estruturas de ferro fundido, aço mole e inoxidável são as bactérias redutoras de sulfato, as bactérias que oxidam enxofre e manganês, as bactérias que oxidam/reduzem ferro e as bactérias produtoras de ácidos orgânicos e exopolissacarídeos. Esses micro-organismos podem coexistir naturalmente sob a forma de biofilmes, frequentemente formando consórcios que são capazes de afetar processos eletroquímicos através do metabolismo cooperativo, não observado em espécies individuais (Beech e Gaylard, 1999).

Entre os micro-organismos que influenciam a corrosão, os mais notáveis são as bactérias redutoras de sulfato (SRB) e as bactérias redutoras de tiosulfato (TRB). Acredita-se que essas bactérias agem principalmente pela produção de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), um agente corrosivo, que reage com a superfície metálica. O sulfeto de hidrogênio é resultante do metabolismo desses micro-organismos, que utilizam sulfato ou tiosulfato

como aceptores de elétrons na respiração anaeróbica (Boudaud et al., 2010). A redução de tiosulfato para sulfeto também é realizada por alguns membros da família *Enterobacteriaceae*, mas a relação dessa produção de sulfetos com a biocorrosão ainda não foi claramente demonstrada nesse grupo (Barret e Clark, 1987). Membros dessa família tendem a dominar os primeiros estágios de desenvolvimento do biofilme, sugerindo uma contribuição no processo de colonização do metal. Durante a formação do biofilme, os membros da família *Enterobacteriaceae* sintetizam a matriz de polissacarídeos, gerando condições anóxicas, propícias para o crescimento de SRB, através do consumo de oxigênio e fornecem ácidos orgânicos, que podem ser utilizados pelas SRB como substrato oxidável no processo de corrosão direta do metal (Bermont-Bouis et al., 2007; Jan-Roblero et al., 2008).

Além de membros da família *Enterobacteriaceae*, outras bactérias apresentam a capacidade de produzir ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como os ácidos fórmico, acético e lático, como produtos do seu metabolismo. Há ainda espécies bacterianas que geram ácidos inorgânicos como resultado de suas atividades metabólicas, como os ácidos nítrico, nitroso, sulfúrico, sulfuroso e carbônico. As bactérias produtoras de ácido estão diretamente relacionadas à biocorrosão pela produção de substâncias corrosivas.

As bactérias que oxidam e/ou reduzem manganês e ferro também estão associadas ao processo de corrosão influenciada por micro-organismos. Dentre essas, as bactérias que oxidam ferro estão entre as mais frequentemente associadas ao MIC, tendo destaque para os gêneros *Gallionella* e *Leptothrix*. Esses micro-organismos são aeróbios e obtêm a energia necessária ao seu metabolismo a partir da oxidação do íon ferroso a férrico. Em decorrência desse processo de oxidação, há a formação de óxidos e hidróxidos de ferro que precipitam sobre as superfícies do metal, possibilitando a corrosão por aeração diferencial. As áreas com menos oxigênio se tornam anódicas, ocorrendo a dissolução do metal (Beech e Gaylarde, 1999; Starosvetsky et al., 2007). O processo de corrosão por aeração diferencial ocorre quando um material é exposto a regiões diferentemente aeradas, levando ao estabelecimento de regiões anódicas e catódicas na superfície do metal, promovendo o fluxo de elétrons entre essas áreas e facilitando a corrosão. Assim, um biofilme que não seja capaz de promover o recobrimento total e uniforme de uma dada superfície (metal ou liga) também poderá gerar células de aeração diferencial e favorecer a corrosão. Acredita-se ainda que a formação de células corrosivas aconteça como uma consequência da respiração aeróbica dos micro-organismos presentes no biofilme (Gentil, 1996).

Bactérias que oxidam manganês podem favorecer a corrosão através do aumento do potencial de circuito aberto de alguns metais, um fenômeno chamado enobrecimento. O aço inoxidável normalmente não corrói, pois seu potencial de circuito aberto se mantém abaixo do potencial de corrosão. No entanto, a presença de bactérias que oxidam manganês

aumenta esse potencial, permitindo que a corrosão ocorra. Aparentemente só a presença da bactéria já é necessária para que isso aconteça, diferentemente do que se pensava antes, quando se achava que o enobrecimento do metal acontecia devido ao depósito de óxido de manganês na superfície do metal por essas bactérias (Geiser et al., 2002).

As bactérias que depositam metal, como as que oxidam ferro e manganês, também estão associadas à formação de tubérculos (depósitos macroscópicos contendo micro-organismos, matéria orgânica e inorgânica) que além de possibilitar a corrosão por aeração diferencial, também criam condições anaeróbicas (embaixo dos tubérculos), que permitem o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, e conseqüentemente o aumento na corrosão (Beech e Gaylarde, 1999; Rao et al., 2000).

Outros micro-organismos influenciam na corrosão através da degradação de camadas protetoras da superfície do metal, como as bactérias redutoras de ferro que promovem a corrosão através da dissolução da camada protetora de óxido férrico, formada naturalmente em aços inoxidáveis, pela redução desse material (Videla, 1996<sup>1</sup> apud Herrera e Videla, 2009).

A corrosão influenciada por micro-organismos é um processo complexo, onde raramente uma única espécie e um único mecanismo estão envolvidos. Os micro-organismos envolvidos na biocorrosão de metais como ferro, cobre e alumínio apresentam uma grande diversidade fisiológica e sua capacidade de influenciar na corrosão de vários metais normalmente considerados resistentes a corrosão, em diversos ambientes, torna esses micro-organismos uma ameaça real a estabilidade destes metais.

No entanto, assim como os micro-organismos podem influenciar na corrosão metálica, também podem inibir a corrosão. Os micro-organismos podem contribuir com a inibição da corrosão pela formação de um filme protetor na superfície do metal. Esse filme pode ser constituído por óxidos presos na matriz do biofilme ou pela própria matriz em si, formando uma barreira que pode impedir a penetração de agentes corrosivos como oxigênio e cloretos. Além disso, alguns biofilmes podem conter substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de bactérias causadoras do MIC, como as bactérias sulfato redutoras (Zuo, 2007). A inibição da corrosão pela formação de um biofilme tem sido observada em diferentes materiais expostos a ambientes corrosivos na presença de diferentes bactérias (Nagiub e Mansfeld, 2002; Juzeliunas et al., 2005). Os micro-organismos também podem contribuir para inibição da corrosão através da remoção de oxigênio, pela respiração aeróbica (Jayaraman et al., 1999). Em conclusão, tanto as bactérias que influenciam o processo da corrosão metálica, como as bactérias que inibem o processo de corrosão

---

<sup>1</sup> Videla, HA. Corrosion inhibition by bacteria. In: Videla HA, editor. Manual of Biocorrosion. Boca Raton: CRC Lewis Publishers; 1996a. p. 121–135.

podem apresentar características interessantes do ponto de vista biotecnológico, pois ambos os grupos sobrevivem em ambientes com altas concentrações de metais.

### 2.3 Metais pesados e sua relação com a célula

Metais pesados são metais com densidade acima de  $5 \text{ g/cm}^3$ , portanto, são considerados metais pesados o Gálio, Índio, Estanho, Tálho, Chumbo e Bismuto, os metais de transição, exceto Escândio, Titânio e Ítrio, os semi-metais Germânio, Arsênio, Antimônio, Telúrio e Polônio, os Lantanídeos e os Actinídeos (Weast et al, 1984<sup>2</sup> apud Nies,1999). Muitos metais pesados formam compostos complexos importantes para as reações bioquímicas da célula e por isso são chamados de elementos traços. No entanto, em altas concentrações os íons de metais pesados formam compostos inespecíficos, levando a efeitos tóxicos na célula. Mesmo elementos traços, como o zinco, o níquel e especialmente o cobre, são tóxicos em altas concentrações e, portanto, mecanismos capazes de manter um sistema de homeostase na célula são necessários (Nies, 1999).

A permeabilidade dos metais na célula, sejam eles tóxicos ou não, ocorre por meio de dois sistemas de captação de metais: um inespecífico, mais rápido, que utiliza uma variedade de substratos e, portanto é constantemente expressado e outro específico, mais lento e que utiliza ATP como fonte de energia.

Quando uma célula se depara com uma alta concentração de algum metal pesado que esteja sendo captado pelo sistema inespecífico, este metal continuará sendo transportado para a célula, apesar da alta concentração deste no citoplasma, pois o sistema inespecífico é constantemente expressado, sendo esse um dos motivos pelo qual os metais pesados são tóxicos (Nies,1999). Uma vez dentro da célula, os cátions desses metais tendem a se ligarem aos grupos sulfatos ou a interagirem com outros cátions, inibindo desta forma a atividade fisiológica de algumas enzimas e de alguns cátions, respectivamente. Além disso, nas bactérias, os cátions de metais podem se ligar a glutatona, causando estresse oxidativo na célula devido ao peróxido de hidrogênio formado por essa reação. Por último, os ânions de metais pesados interferem no metabolismo de compostos não metálicos estruturalmente relacionados (exemplo: cromato e sulfato), além da reação de redução desses ânions levarem a formação de radicais livres (Nies, 1999).

O potencial de toxicidade dos íons de metais pesados adicionado ao sistema de captação inespecífico forçou as células a desenvolverem mecanismos de homeostase e resistência a metais ao longo de sua evolução. No entanto, nem todos os metais pesados

---

<sup>2</sup> Weast RC, Astle MJ, Beyer WH. CRC handbook of chemistry and physics. 64<sup>th</sup> ed. BocaRaton: CRC Press; 1984.

apresentam uma função biológica, seja ela boa ou ruim. Isso porque nem todos os metais estão presentes em ecossistemas comuns ou estão em baixas concentrações, além do fato de alguns íons não se apresentarem em formas solúveis. Os elementos presentes em concentrações menores do que 1 nM não devem ser considerados importantes nem tóxicos para a célula (Nies, 1999).

Os metais pesados Ferro (Fe), Molibidênio (Mo) e Manganês (Mn) apresentam baixa toxicidade e são importantes como elementos traço. Já o Zinco (Zn), o Níquel (Ni), o Cobre (Cu), o Vanádio (V), o Cobalto (Co), o Tungstênio (W) e o Cromo (Cr) também são importantes como elementos traço, porém são tóxicos. Os elementos Arsênio (As), Prata (Ag), Estanho (Sb), Cádmio (Cd), Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb) e Urânio (U) apresentam limitada ou nenhuma função biológica e são considerados tóxicos (Nies, 1999).

Dentre os metais pesados considerados importantes seja por sua função biológica, seja por sua toxicidade, os elementos Zinco, Níquel, Cobre, Cobalto, Cromo, Arsênio e Mercúrio serão discutidos a seguir.

- **Zinco**

O zinco ocorre exclusivamente como o cátion divalente  $Zn^{2+}$ , podendo estar presente tanto na água como no solo devido sua mobilidade (Park et al., 2008). Embora não possa sofrer alterações redox em condições biológicas, o zinco é um componente importante de muitas enzimas e proteínas de ligação, sendo essencial para o funcionamento da célula. No entanto, em altas concentrações, o zinco se torna tóxico, formando complexos com diversos componentes celulares (Dopson et al., 2003).

- **Níquel**

O metal pesado níquel ocorre mais comumente em sua forma divalente,  $Ni^{2+}$ , sendo a forma trivalente,  $Ni^{3+}$ , muito instável. As bactérias necessitam de níquel para algumas reações na célula. É usado como elemento traço em enzimas como urease, CO-desidrogenase, hidrogenase, etc (Mulrooney e Hausinger, 2003). Assim como outros metais, em altas concentrações, o níquel é tóxico para a célula, uma vez que se liga a proteínas e ácidos nucleicos, inibindo dessa forma, a atividade de algumas enzimas, a replicação, transcrição e tradução de DNA (Kawanishi et al., 2002).

- **Cobre**

O cobre na sua forma iônica é um metal requerido pela maioria dos organismos. Sua função mais importante é na enzima citocromo c oxidase e em outros aceptores de oxigênio da cadeia respiratória. No entanto, em altas concentrações, o cobre pode se tornar muito tóxico para a célula, devido sua facilidade para reagir com radicais, especialmente com

moléculas de oxigênio (Nies, 1999). Os íons de cobre livre, constantemente sofrem reações redox que alteram seu estado iônico entre  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . Essas reações resultam também na transferência de elétrons para o peróxido de hidrogênio e na concomitante formação de radicais hidroxilas, que atacam e danificam as moléculas da célula (Santo et al., 2010).

- **Cobalto**

Cobalto é encontrado naturalmente em dois estados de oxidação ( $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Co}^{3+}$ ), sendo mais comumente encontrado na sua forma divalente. O cobalto é o componente central da vitamina  $\text{B}_{12}$  e, portanto, desempenha uma série de papéis cruciais em várias funções biológicas. O cobalto também está presente em outras classes de enzimas como nitrila hidratase, glicose isomerase, entre outras (Kobayashi e Shimizu, 1999). No entanto, assim como outros metais essenciais, em excesso, o cobalto é tóxico, devido sua interação com o sítio ativo de algumas enzimas, desativando-as e prejudicando o metabolismo celular (Alves e Rosa, 2003).

- **Cromo**

O cromo é encontrado comumente em dois estados de oxidação,  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$  e suas reações redox podem acontecer sob condições fisiológicas, sendo, portanto ambas as formas biologicamente importantes. A forma hexavalente do cromo é solúvel em água, altamente tóxica, mutagênica e carcinogênica, enquanto a forma trivalente é menos solúvel, bem menos tóxica e responsável pelas funções benéficas do cromo para os animais (Alam e Malik, 2008). Nos micro-organismos, o cromo não causa nenhuma influência benéfica, mas em altas concentrações pode ser tóxico, uma vez que se liga aos ácidos nucleicos e outros componentes celulares (Mattagajasingh e Misra, 1996).

- **Arsênio**

Arsênio é um semimetal que ocorre principalmente como As (III), arsenito, e As (V), arsenato. Devido a sua toxicidade, o arsênio não tem nenhuma função como elemento traço. No entanto, o arsenato pode ser utilizado como aceptor de elétrons na respiração anaeróbica sendo reduzido para arsenito. Já o arsenito pode ser oxidado a arsenato por bactérias aeróbicas, que se utilizam dessa reação para ganhar energia (Chen e Shao, 2009). Apesar de algumas bactérias conseguirem utilizar o arsênio de alguma forma, ele é tóxico para a maioria dos micro-organismos, pois interfere na síntese protéica da célula (Tamaki e Frankenberger jr<sup>3</sup>, 1992 apud Turpeinen et al., 2004).

---

<sup>3</sup> Tamaki S, Frankenberger jr WT. Environmental biochemistry of arsenic. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1992; 124:79-110.

- **Mercúrio**

O mercúrio é o metal pesado com o maior índice de toxicidade e não exerce nenhuma função biológica para a célula. É encontrado em três estados de oxidação,  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{1+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  e pode formar compostos orgânicos ou inorgânicos. Alguns compostos orgânicos são extremamente tóxicos e tendem a se acumular no ecossistema através da cadeia alimentar. A toxicidade do mercúrio se deve principalmente ao fato do  $\text{Hg}^{2+}$  ter uma grande afinidade com os grupos tióis da célula, levando a inativação de enzimas e consequente interrupção do metabolismo celular (Nies, 1999; Chien et al., 2010).

#### **2.4 Bactérias resistentes a metais pesados**

A resistência a metais pesados por bactérias, tanto Gram positivas, quanto Gram negativas vem sendo estudada há algum tempo. É muito frequente se pensar que essa resistência surgiu recentemente, no entanto, assim como os fatores determinantes para resistência a antibióticos, é provável que os fatores determinantes para resistência a metais pesados já existiam antes das atividades humanas e suas consequências. Uma forte evidência disso é o fato de genes de resistência serem encontrados em organismos que não vivem em ambientes contaminados e, principalmente, por esses genes serem encontrados não só em plasmídeos, como se pensava anteriormente, mas também em cromossomos (Silver e Phung, 1996; Ryan et al., 2005).

Um dos mecanismos de resistência a metais mais conhecido e estudado é o do mercúrio. Os fatores genéticos que determinam a resistência a mercúrio em bactérias envolvem os genes do *operon mer*, que quebram os compostos orgânicos de mercúrio, muito tóxicos, liberando íons  $\text{Hg}^{2+}$  que então são reduzidos pela enzima mercúrio redutase a  $\text{Hg}^0$ , menos tóxico, e deixam a célula por difusão (Griffin et al., 1987). Esse *operon* pode estar localizado em plasmídeos, *transposons* ou cromossomos e pode ser transferido à outras bactérias através da transferência horizontal de genes (Griffin et al., 1987; Stanisich et al., 1989; Zeng et al., 2010).

O *operon mer* consiste em um gene regulador (*merR*), proteínas ligadas ao transporte de  $\text{Hg}^{2+}$  (*MerT*, *MerP* e *MerC*) e as enzimas organomercúrio liase (*MerB*) e mercúrio redutase (*MerA*). O primeiro gene do *operon mer* é o gene regulador *merR*, cujo produto é uma proteína ativadora, que se liga a região promotora na presença de mercúrio, permitindo a transcrição de mRNA. Após a região promotora, existe de um a três genes cujos produtos estão envolvidos no transporte de  $\text{Hg}^{2+}$  extracelular através da membrana da célula para a enzima mercúrio redutase, localizada intracelularmente (Silver e Phung, 1996). O produto do *merP* é uma proteína de ligação que se liga ao mercúrio e o transfere para o produto do gene estrutural *merT*, que é responsável pelo sistema de transporte de  $\text{Hg}^{2+}$

extracelular para dentro da célula. Após os genes *merT* e *merP*, há um gene adicional, o *merC*, que pode funcionar sozinho como sistema de transporte de mercúrio, porém não é um gene essencial para resistência ao mercúrio, uma vez que está ausente em alguns *operons mer*, como no plasmídeo pDU1358 e no *transposon* Tn501 e ainda sim, confere a mesma resistência de operons em que esse gene está presente (Silver e Misra, 1988). O gene *merA*, que determina a enzima mercúrio redutase, se encontra logo após os genes de transporte no *operon mer*, seguido do gene *merD*, que codifica uma segunda proteína reguladora que se liga no mesmo local no DNA que a proteína MerR. Alguns *operons mer* ainda possuem outro gene, o *merB*, cujo produto é a enzima organomercúrio liase que confere resistência ao fenilmercúrio e a outros organomercuriais.

Em bactérias Gram negativas, o gene *merB* ocorre raramente. Os sistemas de resistência a mercúrio que possuem o gene *merA*, mas não o gene *merB* são chamados de sistema de espectro estreito (*narrow spectrum*) devido a sua resistência limitada a alguns compostos de mercúrio, enquanto os sistemas que conferem resistência ao fenil e metilmercúrio são chamados de sistema de amplo espectro (*broad spectrum*) e possuem os dois genes, *merA* e *merB* (Silver e Phung, 1996). A resistência a mercúrio por micro-organismos já foi encontrada nos seguintes gêneros: *Arthobacter ramosus* (Bafana et al., 2010), *Pseudomonas* sp. (De et al., 2008; Zeng et al., 2010), *Escherichia coli* (Summers e Silver, 1972), *Acinetobacter junni* (Oyetibo et al., 2009), *Bacillus* sp. (Vetriani et al., 2005; De et al., 2008), entre outros.

Outro mecanismo de resistência descrito em micro-organismos é o do arsênio. As bactérias encontraram várias formas de transformar o arsênio, incluindo oxidação do arsenito, redução do arsenato (citoplasma e respiração) e metilação do arsenito. A maioria das bactérias que oxidam arsenito não consegue ganhar energia através desse processo e, provavelmente, só o utilizam como mecanismo de desintoxicação, já que o arsenato é bem menos tóxico do que o arsenito (Cai et al., 2009).

A oxidação do arsenito é catalisada por uma enzima oxidase periplasmática que contém duas subunidades codificadas pelos genes *asoB* (subunidade menor Fe-S Rieske) e *asoA* (subunidade maior, contendo o cofator molibdopterina). O sítio ativo da enzima arsenito oxidase fica localizado na subunidade AsoA, onde ocorre a entrada do substrato arsenito e a saída do produto arsenato (Ellis et al., 2001). Muitas bactérias podem utilizar o arsenato como acceptor de elétrons na cadeia respiratória através da enzima arsenato redutase. Assim como a enzima arsenito oxidase, a enzima arsenato redutase é um heterodímero periplasmático que consiste em uma subunidade maior, que contém o cofator molibdopterina, codificada pelo gene *arrA* e uma subunidade menor, que contém um centro ferro-enxofre, codificada pelo gene *arrB* (Afkar et al., 2003).

Além do *operon* formado pelos genes *arrA* e *arrB*, que são responsáveis pela redução do arsenato anaerobicamente, um outro *operon*, o *arsDABC*, também confere resistência ao arsenito e ao arsenato. Esse *operon* consiste em um gene regulatório *arsR*, seguido pelo gene *arsD*, que codifica uma segunda proteína reguladora, além dos genes estruturais *arsA*, *arsB* e *arsC*. O gene *arsA* codifica para uma ATPase que se liga ao produto do gene *arsB*, uma proteína de membrana. O complexo ArsA/ArsB funciona como uma bomba de ânion, que extrai o arsenito do citoplasma bacteriano e por isso é responsável pela resistência ao arsenito. O gene *arsC* codifica para uma enzima arsenato redutase, que transforma arsenato em arsenito aerobicamente e este deixa o citoplasma pela bomba (Rosen, 2002). Além da redução e oxidação, os compostos de arsênio inorgânico podem ser metilados por micro-organismos, produzindo ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) e óxido trimetilarsina (TMAsO) (Bentley e Chasteen, 2002). A resistência a arsênio por micro-organismos já foi encontrada nos seguintes gêneros: *Pseudoalteromonas tetraodonis*, *Microbacterium* sp. (Shen e Chao, 2009), *Bacillus* sp. (Cai et al., 2009; Singh et al., 2010), *Stenotrophomonas* sp. (Holmes et al., 2009), *Pseudomonas* sp. (Cai et al., 2009; Shen e Chao, 2009), *Acinetobacter* sp. (Cai et al., 2009), entre outros.

As bactérias desenvolveram diferentes estratégias de resistência ao cromo, incluindo efluxo e redução de cromato. O efluxo de cromato é mediado pela proteína transportadora de cromato, ChrA, pertencente a família de proteínas CHR (*chromate resistance*). A ChrA é uma proteína hidrofóbica codificada pelo gene *chrA*. Esse gene já foi encontrado no plasmídeo pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes et al., 1990) e no plasmídeo pMOL23 da bactéria *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Nies et al., 1990). De acordo com esses dois estudos, o mecanismo básico que confere resistência a cromato seria similar nas duas bactérias, sendo que a proteína ChrA funcionaria como uma bomba de efluxo de cromato, diminuindo o acúmulo deste ânion dentro da célula. Mais tarde, outros estudos, também com *Pseudomonas aeruginosa*, conseguiram demonstrar com novas evidências, que a hipótese de Nies et al. (1990) e Cervantes et al. (1990) sobre o mecanismo de funcionamento de ChrA estava correta (Alvarez et al., 1999; Pimentel et al., 2002). Além disso, Alvarez et al. (1999) também mostraram que o transporte de cromato por ChrA se dá através de gradiente quimiosmótico e que altas concentrações de sulfato inibem o efluxo de cromato, provavelmente por competição entre esses dois ânions.

Além do gene *chrA*, outros genes relacionados ao fator determinante da resistência ao cromo foram encontrados. Em *Ralstonia metallidurans* CH34, existe duas regiões determinantes envolvidas na desintoxicação de cromo pela célula. Uma (*chr<sub>1</sub>*) está localizada no plasmídeo pMOL28 e a outra (*chr<sub>2</sub>*) no cromossomo. A região *chr<sub>1</sub>* possui os genes *chrI*, *chrB<sub>1</sub>*, *chrA<sub>1</sub>*, *chrC*, *chrE* e *chrF<sub>1</sub>*, enquanto a região *chr<sub>2</sub>* possui os genes *chrB<sub>2</sub>*, *chrA<sub>2</sub>* e *chrF<sub>2</sub>*, todos homólogos aos genes de *chr<sub>1</sub>*. A proteína codificada pelo *chrI* está

relacionada a duas proteínas, de *Pseudomonas syringae* e *P. aeruginosa*, ambas com funções desconhecidas. Deleção no gene *chl* de *R. metallidurans* CH34 resultou em perda de 1/8 da resistência ao cromato, indicando que sua função deve estar relacionada ao mecanismo de resistência ao cromato, porém não é essencial. O produto do gene *chrB* foi identificado como uma proteína ativadora cromato-dependente e sua presença é essencial para o funcionamento do mecanismo de resistência em *R. metallidurans* CH34. A deleção do gene *chrB<sub>1</sub>* não afeta a resistência a cromato pela célula, no entanto, a deleção de *chrB<sub>2</sub>* resulta em perda total da resistência, indicando que a proteína ChrB<sub>2</sub> é capaz de substituir a ChrB<sub>1</sub>, quando esta está ausente. A proteína ChrC é provavelmente uma enzima superóxido dismutase (Fe-SOD). Essas enzimas catalisam a reação de dismutase do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Portanto, a função de ChrC, deve ser a de eliminar os radicais superóxidos originados das reações do cromato com os componentes celulares, mas isso ainda não foi confirmado. A proteína ChrE está relacionada com a superfamília rodanase mas sua função é desconhecida. Já a proteína CrhF participa da regulação do mecanismo que determina a resistência ao cromo. Deleção no gene *chrF* de *R. metallidurans* CH34 resultou em aumento da resistência ao cromato pela célula, sugerindo que a proteína ChrF seja um repressor (Juhnke et al., 2002). Os genes *chrB*, *chrA*, *chrC* e *chrF* também foram encontrados em um *transposon* da bactéria *Ochrobactrum tritici* 5bv11 (Branco et al., 2008). No entanto, nem sempre todos esses genes estão presentes.

Em *Bacillus cereus* SJ1, apenas ChrA e uma azoredutase, envolvida na redução de cromato, parecem estar envolvidas com a resistência ao cromo por essa bactéria (He et al., 2010). Além do efluxo de cromato, muitas bactérias podem reduzir Cr (VI) para a forma menos tóxica Cr (III), como mecanismo de defesa contra os efeitos tóxicos desse ânion. A redução enzimática do cromato acontece aerobicamente, anaerobicamente ou ambos. No crescimento aeróbio, predominantemente a redução acontece interna ou externamente à membrana plasmática e está relacionada com enzimas redutase solúveis, enquanto em condições anaeróbias, enzimas redutase ligadas à membrana reduzem o cromato por respiração anaeróbica (Wang et al., 1989, 1990; Park et al., 2000). Na presença de oxigênio, o processo de redução do cromato comumente ocorre em duas ou três etapas, onde o Cr (VI) é reduzido inicialmente a Cr (V) ou/e Cr (IV), antes de ser reduzido ao produto final Cr (III). O Cr (V) é muito instável e ao invés de ser reduzido a Cr (III), pode sofrer uma reação redox, onde perde um elétron, e retorna a Cr (VI). Esse elétron é transferido para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), que se ligam facilmente a complexos de proteínas e DNA, causando danos na célula.

A enzimas ChrR de *Pseudomonas putida*, e YieF de *E. coli*, reduzem eficientemente cromato a Cr (III), gerando uma pequena quantidade de ROS, sendo YieF mais eficiente do ChrR e portanto, mais interessante para biorremediação (Ackerley et al., 2004). Na

respiração anaeróbica, ao reduzir cromato, a célula o utiliza como aceptor de elétrons através de enzimas ligadas a membrana, evitando os efeitos tóxicos que o cromato causaria se entrasse na célula, pela formação de um precipitado, provavelmente  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (Wang et al., 1989, 1990).

Alguns mecanismos encontrados nas bactérias conferem resistência a mais de um metal ao mesmo tempo e estão geralmente associados a sistemas de transporte. Três sistemas diferentes medeiam o efluxo de cátions divalentes de metais pesados na célula bacteriana: transporte transmembrana orientado pela família de proteínas RND (resistance-nodulation-division), facilitadores de difusão de cátions (CDF) e P-types ATPases.

Os sistemas de transporte orientados pela RND são complexos protéicos capazes de atravessar a parede celular completa de uma bactéria Gram-negativa. No caso do sistema de transporte de metais, o componente principal é uma proteína da superfamília RND, entretanto, uma proteína de fusão de membrana (MFP) e um fator de membrana externa (OMF) são necessários para transportar o substrato diretamente para fora da célula (Nies, 2003).

Ao contrário do sistema RDN, as proteínas CDF e P-types ATPases atuam sozinhas, sem formar complexos. As proteínas CDF formam uma família de transportadores de metais. O principal substrato dessa família é o  $\text{Zn}^{2+}$ , no entanto, ela também está envolvida no transporte de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . Os transportadores CDF são dirigidos por gradiente de concentração, gradiente quimiosmótico, potencial elétrico de membrana, variação de pH ou gradiente de potássio (Anton et al., 1999; Grünberg et al., 2001; Spada et al., 2002).

As P-types ATPases constituem uma superfamília de proteínas transportadoras que são dirigidas pela hidrólise de ATP. Os substratos transportados pela família P-type ATPase são cátions inorgânicos como  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  (Nies, 2003). As P-types ATPases podem tanto importar seu substrato de fora da célula ou do periplasma para o citoplasma, como exportar do citoplasma ou periplasma para fora da célula. Esses três sistemas agem de forma a manter a homeostase da célula e evitar a intoxicação por metais pesados e outros substratos.

Sistemas de efluxo RND-MFP-OMF têm sido descritos na resistência de um amplo número de bactérias Gram-negativas patogênicas e não patogênicas. A resistência a  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  pelo plasmídeo pMOL30, isolado da bactéria *Ralstonia metallidurans* CH34, é bastante conhecida e descrita na literatura. A região que confere essa resistência é formada por três genes estruturais, o *czcA*, que codifica uma RND, o *czcB*, que codifica uma proteína da família MFP e o *czcC*, que codifica uma proteína da família OMF. Esses três genes formam o *operon czcCBA*, que é flanqueado por genes envolvidos na regulação metal-dependente de sua expressão. A resistência a  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  mediada pelo *operon czc* é

baseada na diminuição do acúmulo desses íons pela célula devido ao sistema de efluxo de cátions (Nies e Silver, 1989; Nies, 1992; Grobe et al., 1999).

Um sistema similar ao *czcCBA* aparece em outro plasmídeo, também isolado da *R. metallidurans* CH34, e confere resistência ao cobalto e níquel. Essa resistência é dada por uma região de genes estruturais, *cnrCBA*, que determina um sistema de efluxo RND-MFP-OMF, precedida por um gene regulatório, *cnrYXH* (Grass et al., 1999).

Outro sistema de efluxo RND-MFP-OMF, *nccCBA*, também confere resistência ao cobalto e níquel, além do cádmio, de maneira similar ao *czc* e ao *cnr*. O segundo mecanismo encontrado pelas células para expulsar cátions divalentes é através das proteínas facilitadoras de difusão (CDF). A proteína da família CDF mais estudada e usada como modelo é a CzcD da *R. metallidurans* CH34. Primeiramente, ela foi descrita como regulador do sistema *czcCBA* (Nies, 1992). No entanto, a CzcD também é capaz de mediar uma certa resistência ao  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ , na ausência de *czcCBA* (Anton et al., 1999). A presença de CzcD diminui a concentração desses metais no citoplasma. Em um estudo, uma proteína CDF de *Thermus thermophilus* demonstrou ser capaz de mediar a resistência a zinco e cádmio, mas não do cobalto (Spada et al., 2002). Além do  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ , uma proteína da família CDF pode ter a função de transportar ferro. A MamB é uma proteína da membrana do magnetossoma, uma organela presente em bactérias magnetostáticas e que contém o mineral magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). A função da MamB pode ser de transportar ferro para dentro dessa organela (Grünberg et al., 2001).

O terceiro sistema utilizado pelas bactérias no transporte de cátions de metais para fora da célula é por intermédio das proteínas P-types ATPases. A superfamília das P-types ATPases pode ser dividida em cinco grupos de acordo com seu substrato específico (Axelsen e Palmgren, 1998). Um desses grupos contém o subgrupo de P-types ATPases que catalisa o transporte de metais de transição e metais pesados, sendo que as proteínas que fazem parte desse grupo foram chamadas de CPx-types ATPases ou ATPases transportadoras de “soft metal”. O grupo de CPx-types ATPases ainda pode ser dividido em dois grupos: Cu-CPx-types ATPases, envolvido no transporte de  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Ag}^+$  e Zn-CPx-types ATPases, envolvido no transporte de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  (Rensing et al., 1999).

O mecanismo de transporte de cobre melhor estudado é o mediado pelas ATPases CopA, envolvida na absorção de cobre, e CopB, envolvida na resistência ao cobre por efluxo, da bactéria *Enterococcus hirae*. Células com mau funcionamento do gene *copA* necessitam mais de cobre do que o tipo selvagem e também são mais resistentes a prata, enquanto o mau funcionamento de *copB* leva a hipersensibilidade das células a sais de cobre (Rensing et al., 1999). A expressão de *copA* e *copB* é controlada por duas pequenas proteínas citoplasmáticas, CopY e CopZ. Os genes *copYZ*, que codificam essas proteínas precedem os genes *copA* e *copB*, que codificam as ATPases, no operon *copYZAB*. As

proteínas CopY e CopZ funcionam como repressoras (CopY) ou ativadoras (CopZ) na regulação da transcrição do *operon copYZAB*, dependendo da disponibilidade de cobre (Odermatt e Solioz, 1995).

Membros do grupo Cu-CPx-types ATPases foram caracterizados em vários organismos como *Synechococcus* (Phung et al., 1994), *Helicobacter pylori* (Bayle et al., 1998), *Bacillus subtilis* (Banci et al., 2002), *Pseudomonas putida* (Adaikkalam e Swarup, 2002), entre outros. O segundo grupo de transportadores CPx-types ATPases, que confere resistência ao  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ , também foi encontrado em muitos organismos, como *Staphylococcus aureus* (Nucifora et al., 1989), *Stenotrophomonas maltophilia* (Alonso et al., 2000), *Pseudomonas putida* (Lee et al., 2001), *Bacillus subtilis* (Solovieva e Entian, 2002), *Escherichia coli* (Beard et al., 1997; Resing et al., 1997). O primeiro membro descrito das CPx-types ATPases foi CadA, uma proteína que medeia a resistência a cádmio, codificada por um gene localizado num plasmídeo de *Staphylococcus aureus*. O gene *cadA*, que codifica a proteína P-type ATPase CadA, junto com o gene *cadC*, formam o *operon cad*. O gene *cadC* codifica uma proteína regulatória que atua como um repressor na transcrição do *operon cad* (Nucifora et al., 1989; Endo e Silver, 1995). Uma proteína homóloga a CadA foi encontrada em *E. coli* e chamada de ZntA. Em altas concentrações de zinco, o gene *zntA* é ativado pela proteína reguladora ZntR, resultando no efluxo de zinco mediado pela proteína transportadora P-type ATPase ZntA. O mau funcionamento do gene *zntA* resulta em sensibilidade a  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  pela célula bacteriana (Resing et al., 1997; Brocklehurst et al., 1999).

## 2.5 Biorremediação

O aumento da poluição nas últimas décadas levou ao interesse por novos micro-organismos resistentes a metais pesados e a compreensão dos seus mecanismos de resistência, uma vez que esses micro-organismos podem ser potenciais biorremediadores de ambientes contaminados. Como os poluentes metálicos não são degradados, alternativas para transformar esses metais pesados em metais menos tóxicos assim como alternativas para remoção desses poluentes têm sido alvo de interesse de pesquisas.

A remoção dos metais pesados no ambiente pode ser feita através de tratamentos físico-químicos ou com a utilização de micro-organismos e plantas resistentes (Costa e Duta, 2001; Sar et al., 2001; Xinxian et al., 2011). Os processos convencionais usados para remoção de metais pesados em efluentes industriais incluem precipitação química, oxirredução, filtração, técnicas eletroquímicas e sofisticados processos de separação por membranas. Esses processos são geralmente caros e muitas vezes apresentam baixa

eficiência, por isso alternativas biotecnológicas vêm sendo incentivadas devido ao seu custo reduzido, alta eficiência e menores danos ao ambiente.

Os micro-organismos estão cada vez mais sendo explorados na remediação de ambientes contaminados em função dos seus altos índices de crescimento, tolerância a vários poluentes e relação superfície-volume alta.

Os principais processos pelos quais os micro-organismos realizam a biorremediação são a biotransformação e o acúmulo de metais. Os micro-organismos podem acumular metais de duas formas: através de um processo dependente de energia, a bioacumulação, ou através de um processo que não dependa de energia, a biossorção.

O termo “biossorção” é definido como um processo onde sólidos de origem natural ou seus derivados são usados na retenção de metais pesados de um ambiente aquoso. A biossorção compreende a ligação de metais à biomassa por um processo que não envolva energia metabólica ou transporte e que depende da afinidade do metal com os sítios de ligação da parede celular (Cossich, 2000). Já o principal foco nos estudos de biotransformação é a conversão de íons metálicos para formas menos tóxicas através de reações de redução (De et al., 2008).

A biorremediação é interessante se comparada com métodos físico-químicos de remoção de metais, pois pode apresentar baixo custo e alta eficiência quando as concentrações de metais são baixas (De et al., 2008). Portanto, estudos com esses micro-organismos são de suma importância para a recuperação de ambientes contaminados com metais pesados uma vez que eles apresentam um grande potencial como agentes na biorremediação (Castro-Silva, 2003).

### **3 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar as bactérias associadas a processos de biocorrosão e/ou biotransformação em estruturas metálicas de torres de transmissão de energia em operação no campo, bem como avaliar a resistência destas bactérias a diferentes metais pesados.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Isolar bactérias cultiváveis em laboratório a partir de elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica;
- Identificar as bactérias utilizando uma abordagem polifásica envolvendo métodos fenotípicos e genotípicos;
- Avaliar a resistência a metais pesados das linhagens isoladas buscando selecionar micro-organismos com potencial para biorremediação;
- Estruturar uma coleção temática de bactérias resistentes a metais pesados, empregando metodologias de preservação de longo tempo, na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI. /CPQBA - UNICAMP, Campinas, SP.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta, isolamento e condições de cultivo

A coleta dos elementos metálicos para isolamento de bactérias foi realizada em pontos determinados pela empresa Bandeirante de Energia do Brasil, em torres de transmissão de energia elétrica localizadas na região da grande São Paulo, SP, Brasil (Tabela 2). Os elementos metálicos com sinais de corrosão ou formação de biofilmes foram coletados em frascos de vidro previamente esterilizados, mantidos a 4 °C (gelo) e transportados à Divisão de Recursos Microbianos no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

**Tabela 2-** Amostras coletadas em torres de transmissão de energia elétrica na região da grande São Paulo.

<b>Amostra</b>	<b>Identificação</b>	<b>Descrição do elemento metálico</b>
<b>A</b>	Torre nº 119, NE, pintada	Parafuso corroído
<b>B</b>	Torre nº 9, NE, não pintada	Parafuso corroído
<b>C</b>	Torre nº 119, NE, pintada	Pó de corrosão
<b>D</b>	Torre 1DA CPTN Brás Cubas, pintada com zarcão	Pó de corrosão

Os elementos metálicos foram imersos em tampão PBS e diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) foram semeadas em placas de Petri contendo diferentes meios de cultivo nos pHs 7,0 e 4,0. Os meios de cultivo para isolamento foram: Ágar de Soja e Triptona (Difco™ Tryptic Soy Agar), Ágar de extrato de Malte (MS) (Menezes et al., 2010) e Meio oligotrófico (OL) (Menezes et al., 2010), todos acrescidos de actidiona (50 µL/L) para inibição do crescimento de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 a 72 h. Após crescimento, bactérias distintas foram selecionadas com bases em características morfológicas da colônia (cor, borda, aspecto da superfície) e das células (coloração de Gram) e transferidas para outra placa contendo o mesmo meio para purificação dos isolados (Figura 1). As bactérias foram preservadas pelo método de ultracongelamento (- 80 °C), conforme metodologia utilizada atualmente na DRM (Hunter-Cevera e Belt, 1996; Kirsop e Doyle, 1991).



**Figura 1.** A. Elementos metálicos imersos em tampão PBS. B. Isolados de bactérias purificados em meio de cultivo sólido.

## 4.2 Identificação dos isolados

A identificação taxonômica dos isolados de bactérias associados a elementos metálicos foi efetuada por análise filogenética das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S após a seleção de ribotipos distintos obtidos pela análise de *fingerprinting* genômico.

### 4.2.1 Extração e quantificação de DNA genômico

Os isolados preservados foram reativados em 5 mL do meio caldo TSB (Difco™ Tryptic Soy Broth) e incubados nas mesmas condições do isolamento. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 12.000 rpm por 2 min para extração de DNA genômico em pequena escala, segundo o método descrito por Pospiech e Neumann (1995) modificado.

A quantificação de DNA extraído foi estimada através da comparação com DNA do fago  $\lambda$  em diferentes concentrações em gel de agarose a 0,8% submetido a eletroforese por 30 min em condição de 5 V/cm. Os DNAs extraídos foram armazenados em microtubos de polipropileno e mantidos a temperatura de 4 °C.

### 4.2.2 Análises de *fingerprinting* genômico

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S, por PCR, foi efetuada utilizando os *primers* p27f e p1401r (Lane, 1991), homólogos a regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias. Os produtos de amplificação foram utilizados em reações independentes de restrição enzimática, utilizando três enzimas distintas (*Hae* III, *Msp* I, *Hha* I - Promega), a fim de gerar perfis de bandas polimórficos que permitissem a tipagem das

linhagens em nível de espécie e/ou gênero. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1X para visualização do perfil de bandas.

Imagem dos géis com perfis de bandas foram analisadas pelo *software* GelCompar (version 4.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium) após conversão e normalização dos perfis com o padrão de peso molecular (100 pb, MBI Fermentas). Os perfis de bandas foram combinados e analisados em conjunto pelo coeficiente de DICE empregando o algoritmo UPGMA.

As linhagens que apresentaram perfis de bandas distintos, ou seja, representativos de grupos taxonômicos diferentes, tiveram o gene RNA ribossomal 16S sequenciado para análise de inferência filogenética.

#### **4.2.3 Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S**

Os produtos de PCR foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Health Care). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Health Care) utilizando os *primers* internos p10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'), p765f (5' ATT AGA TAC CCT GGT AG 3'), p782r (5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3') e p1100r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3').

As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RDP (<http://www.rdp.cme.msu.edu/>). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo desconhecido foram recuperadas do Genbank para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007), onde o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987) foi utilizado para as reconstruções filogenéticas, com valores de *bootstrap* a partir de 1000 re-amostragens.

## **4.2 Avaliação da resistência a metais pesados**

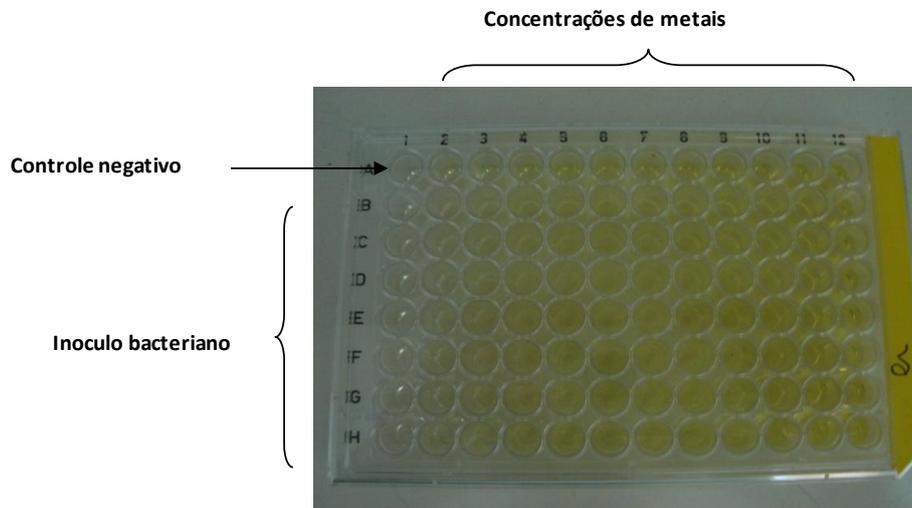
As bactérias isoladas nas amostras obtidas das torres de transmissão de energia elétrica foram avaliadas quanto à resistência a diferentes metais pesados. Os metais zinco, níquel, cobre, cobalto, cromo e mercúrio foram utilizados na forma dos sais  $ZnCl_2$ ,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $K_2Cr_2O_7$  e  $HgCl_2$ , respectivamente. O semimetal arsênio também foi utilizado nos testes de resistência a metais na forma de arsenato de sódio,  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ , e arsenito de sódio,  $Na_2AsO_2$  (Figura 2).



**Figura 2.** Solução estoque dos metais pesados utilizados no estudo.

As bactérias foram reativadas em placa, contendo o meio TSA e, posteriormente, transferidas para o meio mínimo Tris (Sokolovská et al., 2001) em caldo, adicionado de extrato de levedura (5 g/L), e incubadas a 28 °C por 48 h. Os testes foram realizados em microplacas contendo meio mínimo Tris em caldo, adicionado de extrato de levedura, acrescido de diferentes concentrações dos metais pesados (0,5 mM – 10 mM e 0,1 mM – 2 mM para  $HgCl_2$ ). O volume de 2  $\mu$ L da suspensão de bactérias foi inoculado em cada poço da microplaca, contendo 150  $\mu$ L de meio mínimo Tris e diferentes concentrações de metais. A única exceção foi para o isolado BD111 que não cresceu no meio mínimo Tris e, portanto, os testes foram realizados no meio de cultivo Luria Broth (Sambrook et al., 1989). Na primeira linha da microplaca não foi inoculada nenhuma bactéria e na primeira coluna da microplaca não foi acrescentado nenhum metal a fim de se obter controles e padrões para comparação na construção dos gráficos de crescimento (Figura 3). Para monitorar o crescimento celular e determinar a concentração mínima inibitória (MIC), isto é, a concentração que inibe completamente o crescimento da bactéria, a densidade óptica ( $DO_{600}$ ) foi lida em um espectrofotômetro ASYS ExpertPlus imediatamente após o inoculo da bactéria no caldo e após 48 h de incubação da microplaca a 28 °C. Os testes foram realizados em duplicatas e a média das leituras foi utilizada nos cálculos para a construção dos gráficos de resistência. Para alguns isolados cujos resultados foram promissores, a

avaliação da resistência aos metais pesados foi repetida em triplicata, sendo a média das leituras utilizada nos cálculos para a construção dos gráficos (ANEXO C).



**Figura 3.** Teste de resistência a metais pesados em microplaca de 96 poços. Linha 1: diferentes concentrações de metais (0,5 a 10 mM, exceto para  $\text{HgCl}_2$  que foi de 0,1 mM – 2 mM); Coluna 1: inoculo bacteriano; Poço A1: controle negativo: meio de cultivo sem o metal pesado e sem bactéria.

#### 4.3 Manutenção e preservação dos isolados na CBMAI

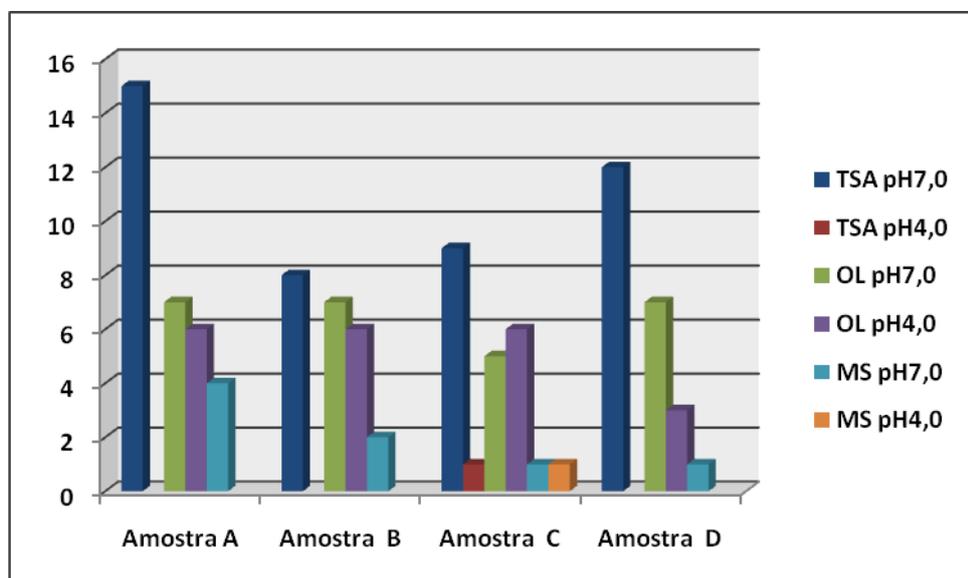
Após a identificação taxonômica e avaliação da resistência a metais pesados, os isolados de interesse foram depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos Ambientais e Industriais (CBMAI), conforme metodologia utilizada atualmente na CBMAI (Hunter-Cevera e Belt, 1996; Kirsop e Doyle, 1991), para compor uma Coleção Temática de bactérias resistentes a metais pesados (ANEXO B).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento de bactérias associadas a elementos metálicos

O isolamento das bactérias associadas a elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica resultou em 101 isolados de bactérias distintas com bases em características morfológicas da colônia e das células, sendo 32 isoladas da amostra A e 23 das amostras B, C e D. A amostra A (parafuso corroído) e a amostra C (pó de corrosão) foram coletadas na torre de transmissão de energia nº 119 NE que apresentava pintura e revestimento utilizados na proteção de estruturas metálicas contra o ataque de agentes biodeteriogênicos microbianos, enquanto as outras amostras, B e D, foram obtidas de outras duas torres, uma sem nenhum tipo de proteção e outra pintada com zarcão.

A Figura 4 mostra a distribuição de bactérias isoladas por meio de cultivo para cada elemento metálico. O meio de cultivo TSA no pH 7,0 foi o mais eficiente para o isolamento resultando no isolamento de 44 bactérias (44,44%), seguido do meio OL no pH 7,0 com 26 (26,26%) e no pH 4,0 com 21 (21,21%) e meio MS pH 7,0 com 8 (8,08%). Somente uma bactéria (1,01%) foi isolada nos meios TSA e MS no pH 4,0.



**Figura 4.** Distribuição do número de bactérias isoladas por meio de cultivo para cada elemento metálico.

### 5.2 Identificação dos isolados

A identificação taxonômica dos isolados de bactérias associados a elementos metálicos foi efetuada por análise filogenética das sequências parciais do gene RNA

ribossomal 16S dos ribotipos distintos selecionados a partir da análise de *fingerprinting* genômico.

### 5.2.1 Extração e quantificação de DNA genômico

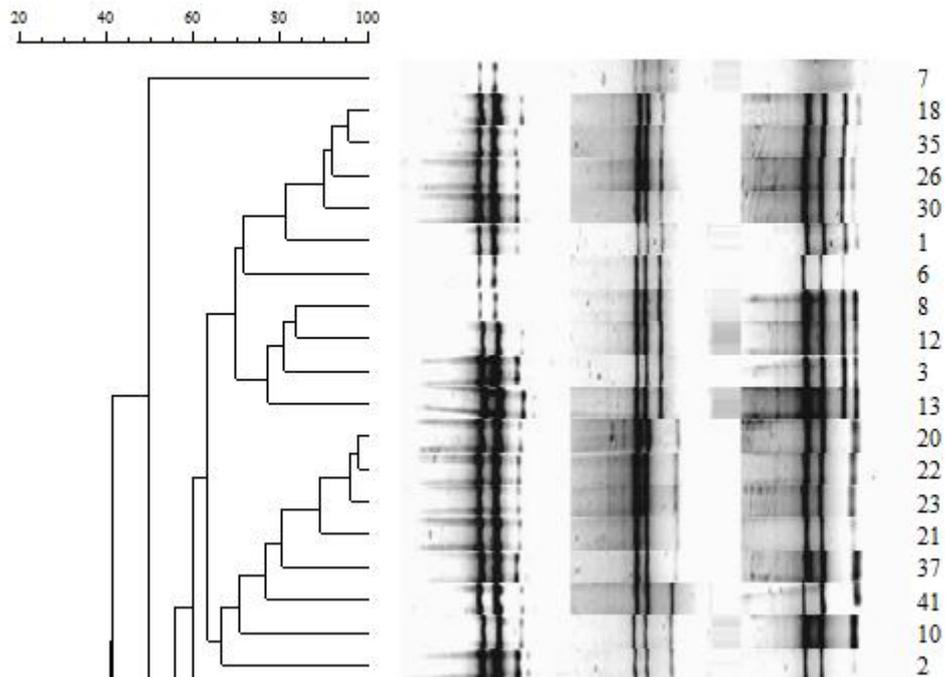
Todos os isolados foram reativados a partir da preservação por ultracongelamento – 80 °C, indicando que o método utilizado foi eficiente e adequado. O DNA genômico obtido pelo protocolo descrito por Pospiech e Neumann (1995) modificado rendeu aproximadamente 100 ng/ $\mu$ L de DNA de cada isolado (Figura 5).



**Figura 5.** Quantificação de DNA genômico de alguns isolados em gel de agarose 0,8%.

### 5.2.2 Análises de *fingerprinting* genômico

As bactérias isoladas dos elementos metálicos foram submetidas à análise de *fingerprinting* genético pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) utilizando três enzimas de restrição independentes (*Hae* III, *Msp* I, *Hha* I). Um total de 62 ribotipos distintos ( $\geq$  95% de similaridade) foi verificado a partir dos 101 isolados de bactérias, revelando uma alta diversidade nas bactérias cultiváveis recuperadas dos elementos metálicos (Figura 6).

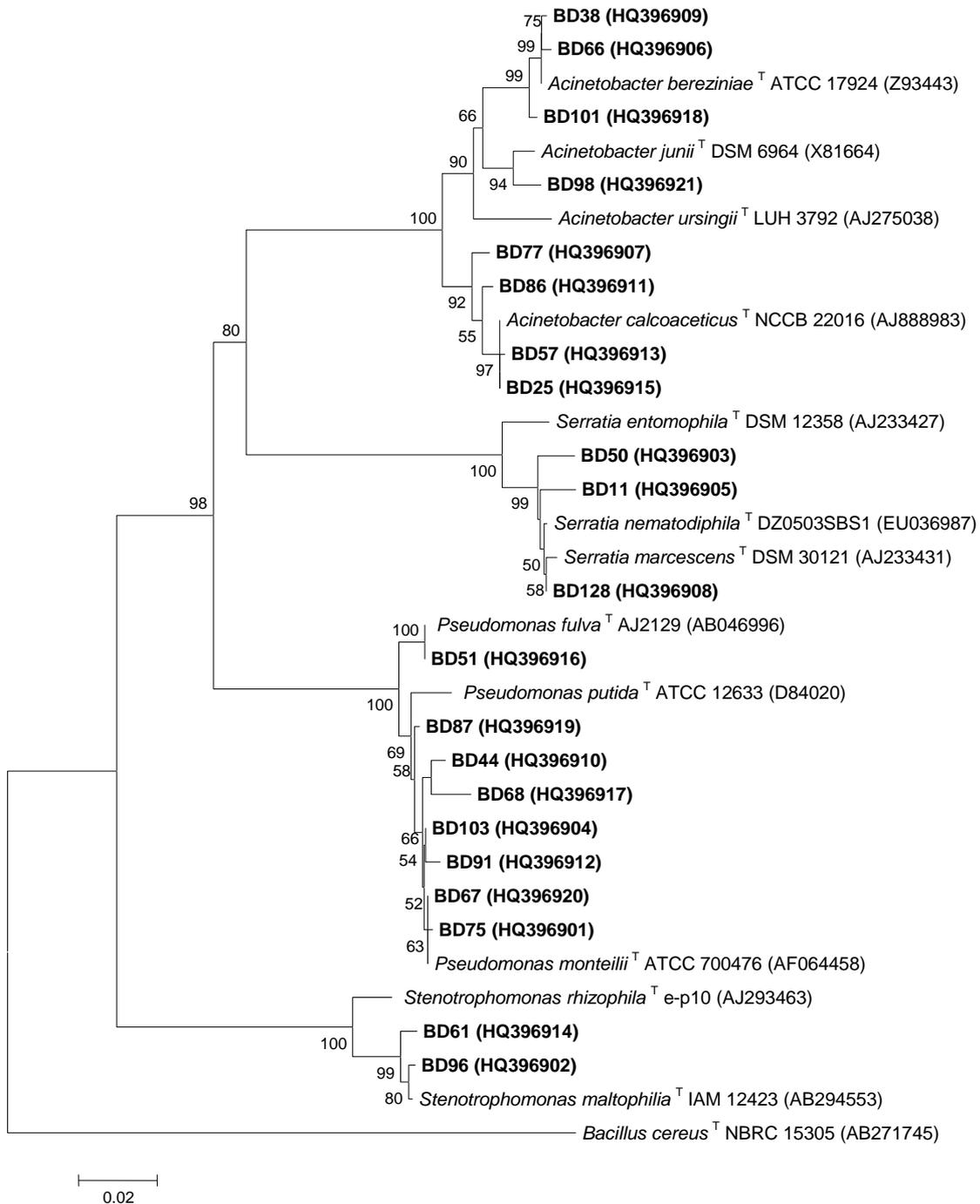


**Figura 6.** Dendrograma de similaridade construído pelo *software* GelCompar (version 4.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium) a partir de uma análise do perfil de bandas do gene ribossomal 16S, após digestão com as enzimas *Hae* III, *Msp* I, *Hha* I.

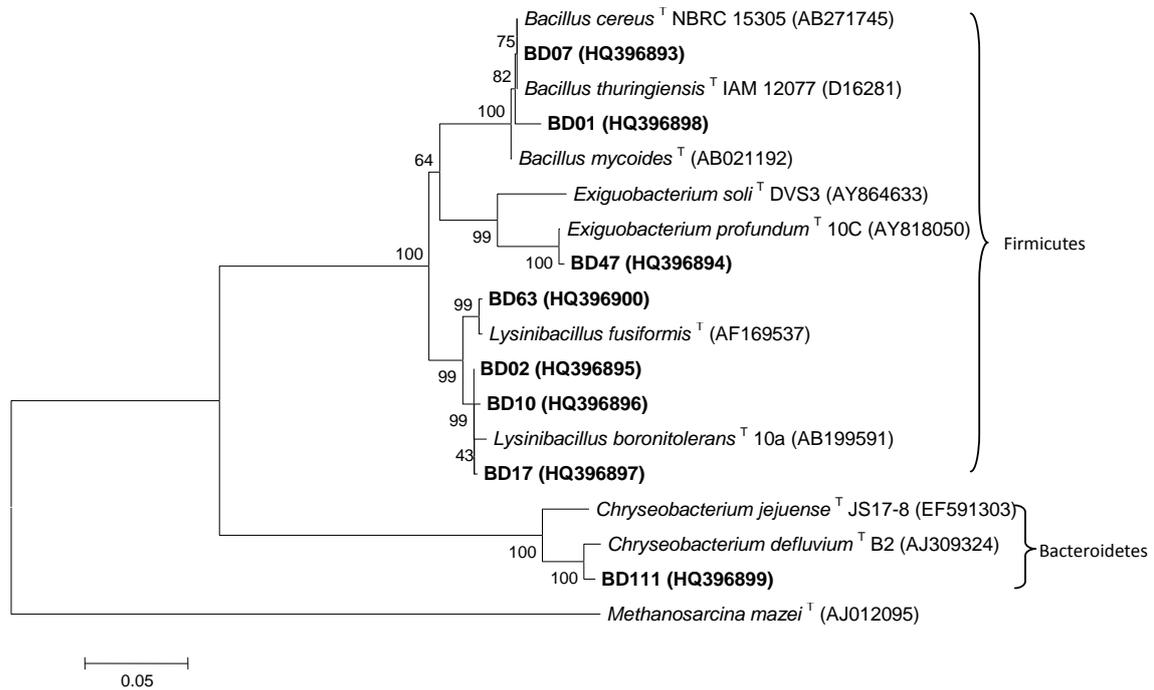
Na amostra A foram recuperados 28 ribotipos diferentes, na amostra B 18 ribotipos, nas amostras C e D 19 ribotipos cada. Alguns ribotipos foram encontrados em mais de uma amostra e apesar das amostras A e C derivarem da mesma torre, ribotipos iguais foram encontrados também nas amostras A e B, A e D, assim como nas amostras A e C. Isso mostra que a pintura de proteção das torres A, C e D não restringe o crescimento dos microorganismos e, portanto, não é um método efetivo para evitar o ataque de agentes biodeteriogênicos microbianos.

### 5.2.3 Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S

Baseado nas análises da matriz de distância criada a partir das sequências dos 62 ribotipos distintos, 29 isolados representativos foram submetidos à análise filogenética (ANEXO A). O sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S dos ribotipos distintos revelaram a presença dos gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Chryseobacterium*, *Exiguobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* (Figuras 7 e 8).

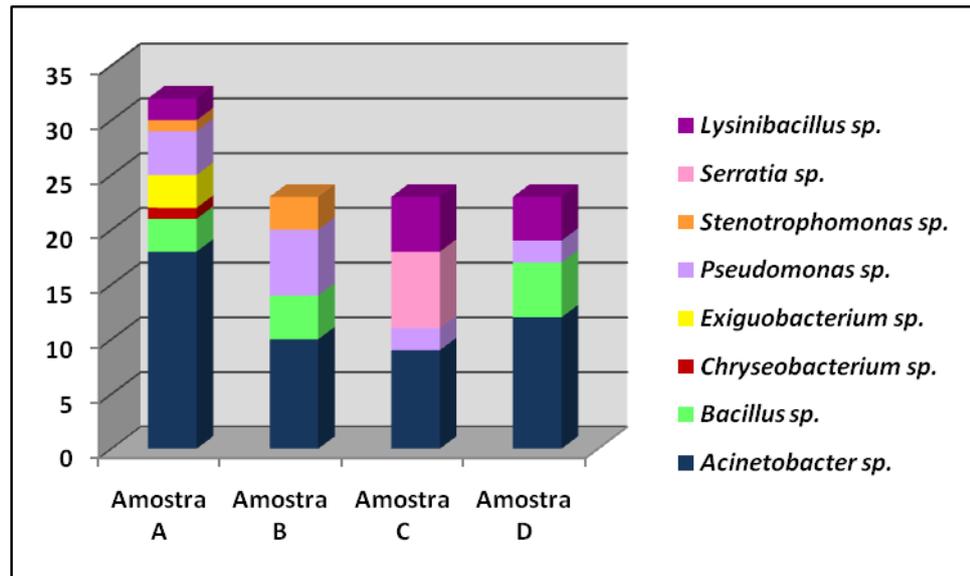


**Figura 7.** Árvore filogenética baseada em análises das seqüências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias do filo *Proteobacteria* associadas a elementos metálicos (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 re-amostragens).



**Figura 8.** Árvore filogenética baseada em análises das sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* associadas a elementos metálicos (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Neighbor-Joining com bootstrap de 1000 re-amostragens).

Os gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* foram encontrados nas quatro amostras coletadas. A amostra A apresentou a maior diversidade genética (28 ribotipos) com representantes de sete diferentes gêneros. Nas amostras B (18 ribotipos), C (19 ribotipos) e D (19 ribotipos) foram encontrados apenas quatro gêneros em cada (Figura 9).



**Figura 9.** Distribuição da diversidade microbiana encontrada nas amostras derivadas de torres de transmissão de energia elétrica.

Embora não se possa afirmar, a princípio, a relação dos isolados obtidos neste trabalho com a corrosão presente nas torres, a presença dos gêneros encontrados no isolamento dos elementos metálicos, principalmente os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, já foi relatada em vários ambientes contaminados com metais, associados ou não a corrosão influenciada por micro-organismos.

O gênero *Bacillus* já foi encontrado em amostras de metais expostas a diferentes condições na Lituânia. Dentre 70 populações de bactérias e fungos, as espécies encontradas com maior frequência foram os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium frequentans* e a bactéria *Bacillus mycoides* (Juzeliunas et al., 2005). Segundo Juzeliunas et al. (2005), estas três espécies agem como aceleradores ou inibidores da corrosão em metais, dependendo do metal que eles colonizam.

Korenblum et al. (2008) sugerem que uma substância antimicrobiana produzida pelas linhagens T6-5 e H2O-1 de *Bacillus* possa inibir a formação de biofilme e conseqüentemente inibir ou reduzir a biocorrosão. Já Jayaraman (1999) acredita que a inibição da corrosão em metais se deve a células vivas presentes no biofilme. Em seu trabalho, ele concluiu que ambas as espécies de bactérias *Pseudomonas fragi* e *Bacillus brevis* foram capazes de proteger cobre e alumínio contra corrosão em determinado meio de cultivo. Ao contrário, Pavissich et al. (2010) associaram o processo de corrosão em encanamentos de cobre com a formação de biofilme. Dentre os gêneros encontrados na constituição do biofilme, estavam presentes *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* e *Pseudomonas*. Rajasekar et al. (2007) também conseguiram comprovar o envolvimento de uma bactéria no processo de degradação de tubulações de petróleo na Índia. Estudos realizados no Institute of Microbial

Technology, em Chandigarh (Índia) confirmaram que essa capacidade de degradação é devido a uma enzima peroxidase presente na linhagem ACE2 de *Serratia marcescens*, que através do peróxido de hidrogênio produzido, causa uma série de reações que acaba por levar a corrosão.

Embora ainda exista muita controvérsia a respeito de como esses micro-organismos realmente se comportam, a presença desses em ambientes com grandes concentrações de metais parece ser constante. Garcia-Meza (2008) estudou a colonização de micro-organismos em amostras de rejeitos de minas coletadas no México e os principais gêneros de bactérias presentes no biofilme formado pela colonização foram: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium*. Os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium* tiveram sua presença relatada também em antigas áreas de mineração de ouro na Nova Zelândia (Chappell e Craw, 2002) e em solos afetados pela drenagem de minas (Babich e Stotzky, 1985). Membros dos grupos *Pseudomonas* e *Aeromonas* foram isolados a partir de resíduos de urânio encontrados nas proximidades de uma área de mineração na Saxônia (Haferburg e Knothe, 2007). Os gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Enterobacter* e *Stenotrophomonas* já foram encontrados em rejeitos de uma mina de chumbo e zinco em Yunnan, China (Zhang et al., 2007). Os gêneros *Acinetobacter*, *Serratia*, *Exiguobacterium* e *Bacillus*, entre outros, já foram encontrados em plantas tolerantes ao cobre, sendo o gênero *Bacillus* o mais predominante, seguido pelo gênero *Acinetobacter* (Sun et al., 2010). Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Listeria*, e ao filo *Bacteroidetes* já foram relatadas como parte da comunidade bacteriana de crustáceos (*Porcellio scaber*) de um ambiente poluído com mercúrio (Lapanje et al., 2010).

A presença de metais pesados seleciona os micro-organismos capazes de sobreviver nesse ambiente, tornando-os uma fonte importante de pesquisa já que podem ser potenciais agentes biorremediadores em áreas contaminadas com metais pesados.

### **5.3 Avaliação da resistência a metais pesados**

Existem muitos estudos que tratam da tolerância de metais pesados por bactérias, entretanto, é difícil fazer uma comparação válida com a literatura existente devido a diversidade de meios e condições de incubação utilizadas nesses estudos. MICs obtidos em meio sólido são geralmente mais altos do que os obtidos em meio líquido. Isso acontece porque no meio líquido a difusão e disponibilidade dos metais é maior do que no meio sólido. Além disso, o uso de meios ricos também influencia na concentração real dos metais disponíveis, uma vez que os íons desses metais podem formar complexos com componentes do meio, especialmente com substâncias orgânicas e fosfatos.

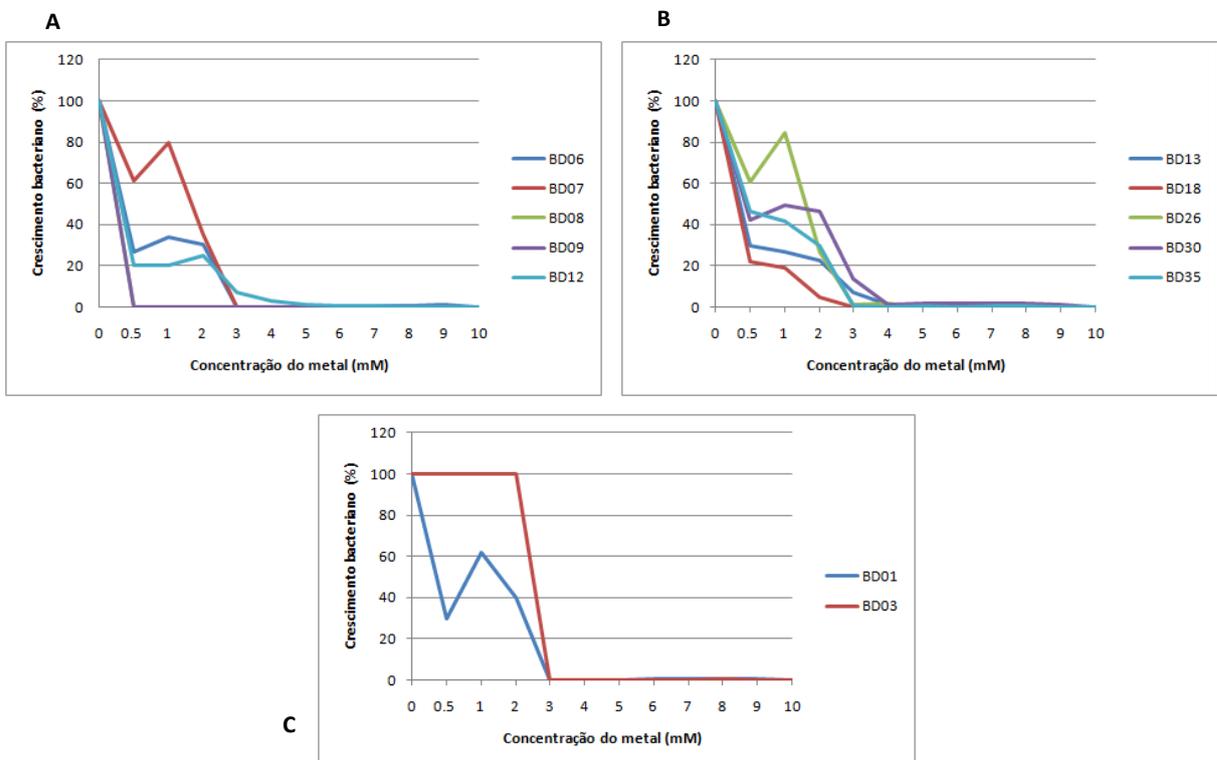
Os 101 isolados das torres de transmissão de energia elétrica foram avaliados quanto à resistência a diferentes metais pesados em meio mínimo líquido com adição de extrato de levedura e diferentes concentrações de metais (exceto o isolado BD111, aonde foi utilizado meio de cultivo Luria Broth). Para a maioria dos isolados e dos metais, o crescimento bacteriano diminuiu conforme o aumento da concentração do metal.

### 5.3.1 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Bacillus*

Foram avaliados em duplicatas os 12 isolados do gênero *Bacillus* (BD01, BD03, BD06, BD07, BD08, BD09, BD12, BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35). Os isolados BD01 e BD03 foram selecionados para repetição dos testes em triplicatas.

#### • Zinco

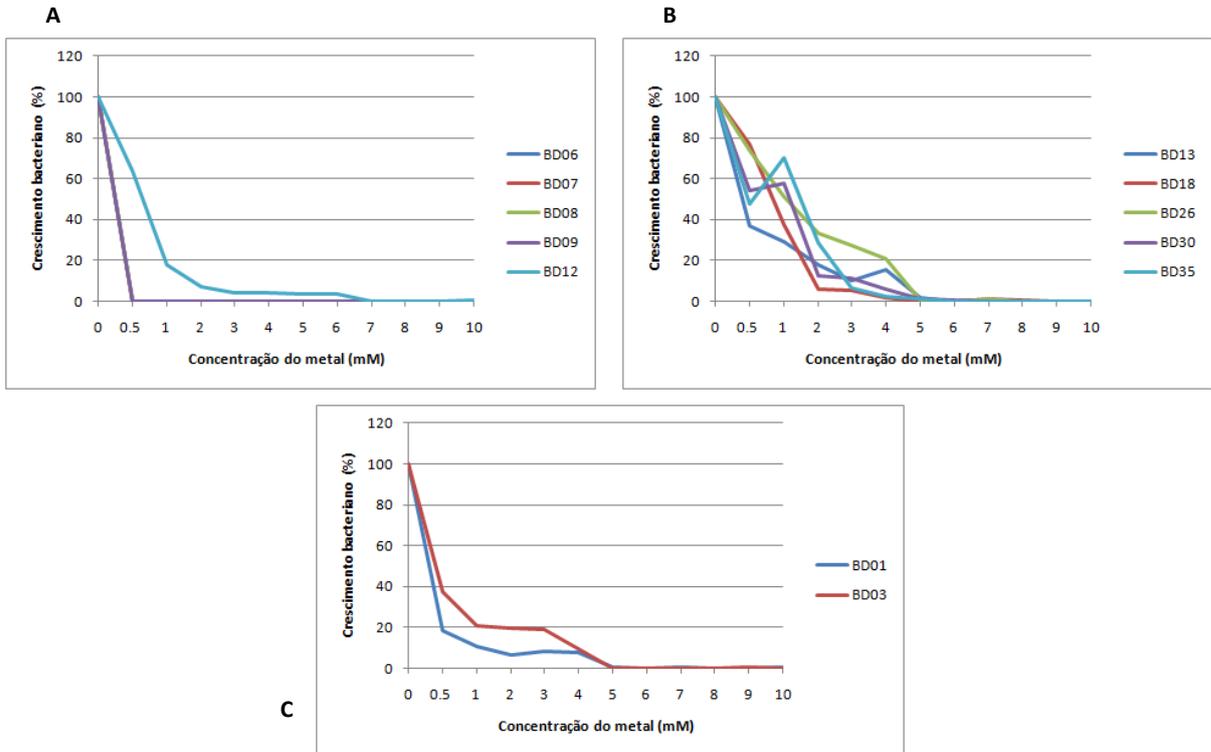
A maioria dos isolados só cresceu em concentrações iguais ou menores do que 5 mM (Figura 10). Apenas o isolado BD30 conseguiu crescer na concentração 9 mM, no entanto, esse crescimento foi muito baixo (1,045%).



**Figura 10.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

#### • Níquel

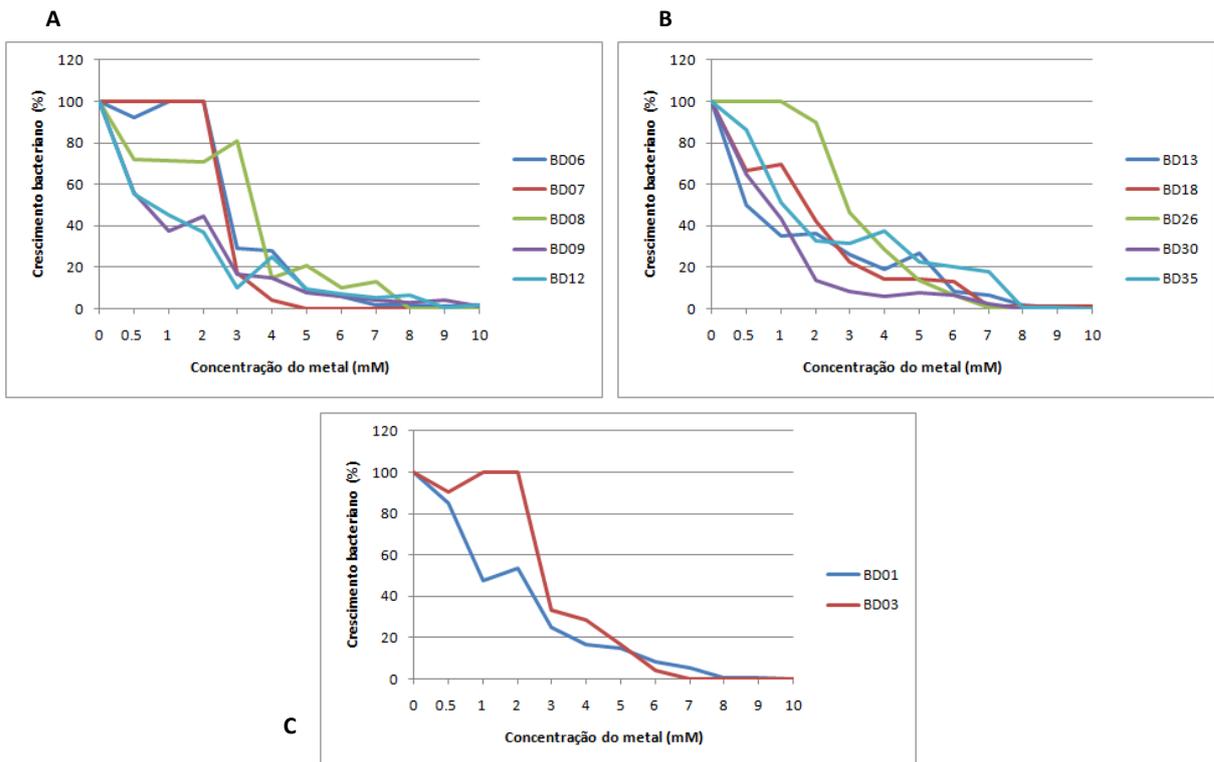
Quatro isolados do gênero *Bacillus* se mostraram sensíveis ao metal níquel (BD06, BD07, BD08 e BD09), não crescendo nem na menor concentração testada (0,5 mM). Os outros isolados, no entanto, se mostraram mais tolerantes a esse metal, com MICs em torno de 4 e 5 mM (Figura 11). O isolado BD12 conseguiu crescer na concentração de 6 mM, embora o crescimento tenha sido baixo (3, 35%).



**Figura 11.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

#### • Cobre

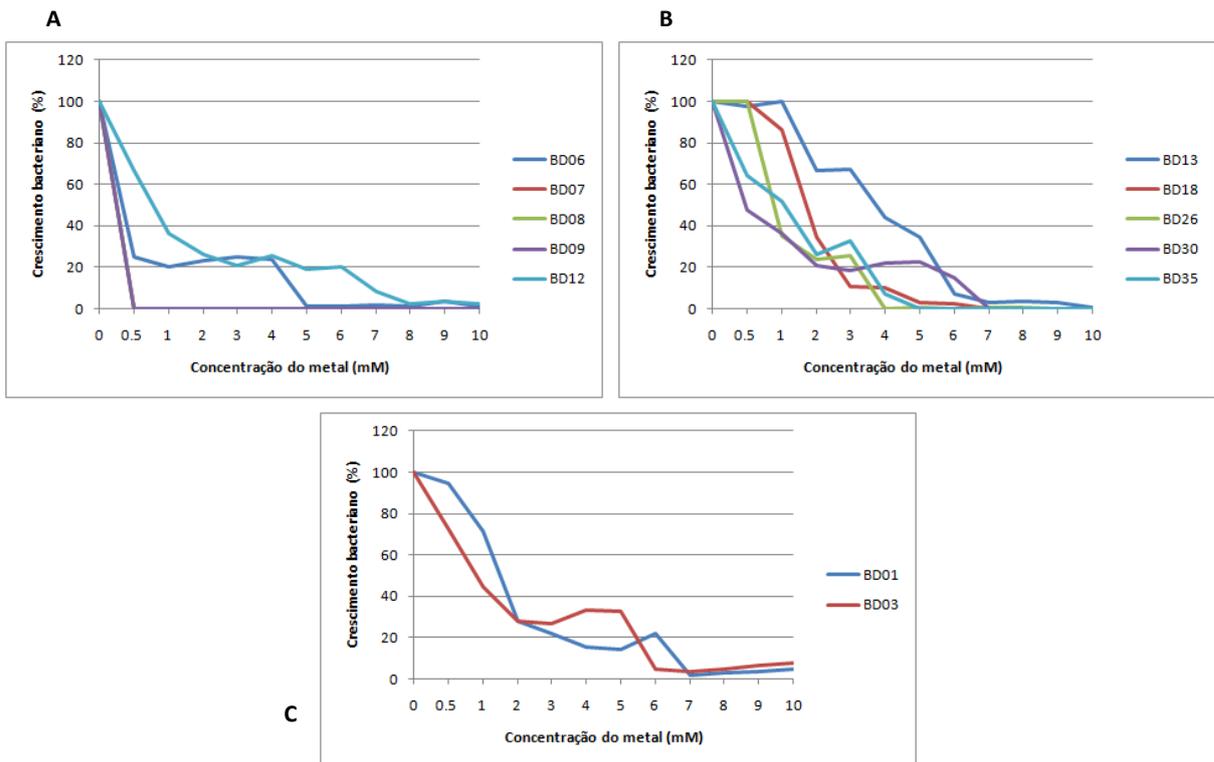
Exceto pelo isolado BD07 (MIC = 4 mM), o gênero *Bacillus* apresentou MIC para o metal cobre igual ou maior do que 6 mM (Figura 12). O isolado BD06 conseguiu crescer na presença de 10 mM de cobre, no entanto, foi um crescimento baixo (1,659%).



**Figura 12.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

#### • Cobalto

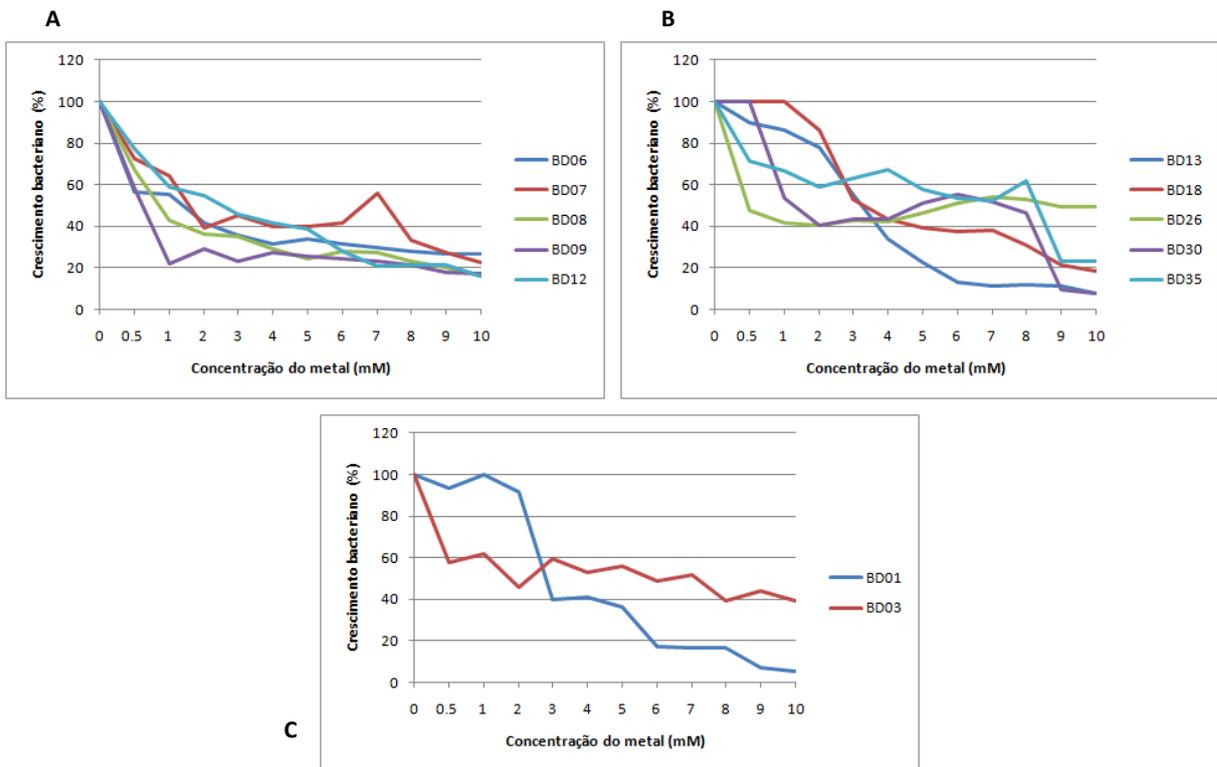
Dos doze isolados de *Bacillus*, cinco resistiram a 9 ou 10 mM de cobalto (BD01, BD03, BD06, BD12 e BD13), embora o crescimento não tenha chegado a 10%. Três isolados (BD07, BD08 e BD09) não cresceram nem na menor concentração testada (0,5 mM), sendo considerados sensíveis a cobalto (Figura 13).



**Figura 13.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

- **Cromo**

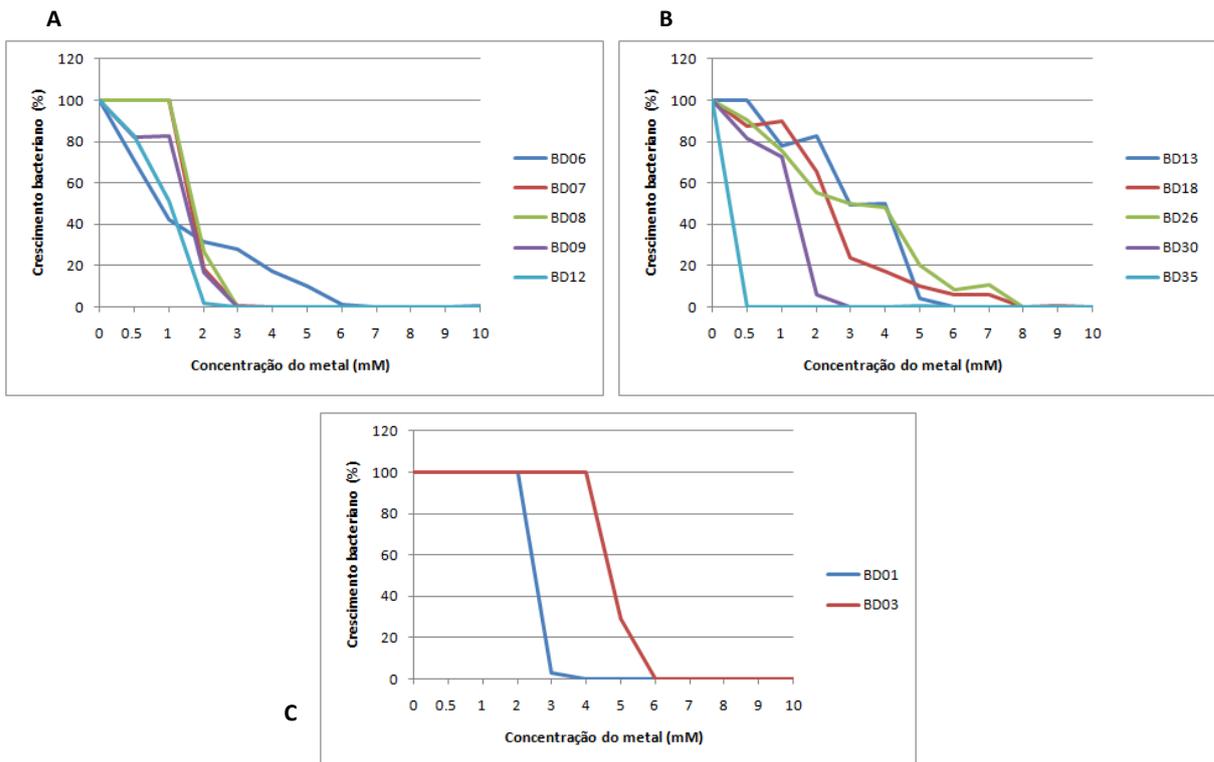
Os isolados do gênero *Bacillus* foram, no geral, bastante resistentes ao cromo. Todos cresceram na maior concentração testada (10 mM) (Figura 14) e com exceção dos isolados BD01 e BD13, o crescimento obtido nessa concentração foi maior do que 15%.



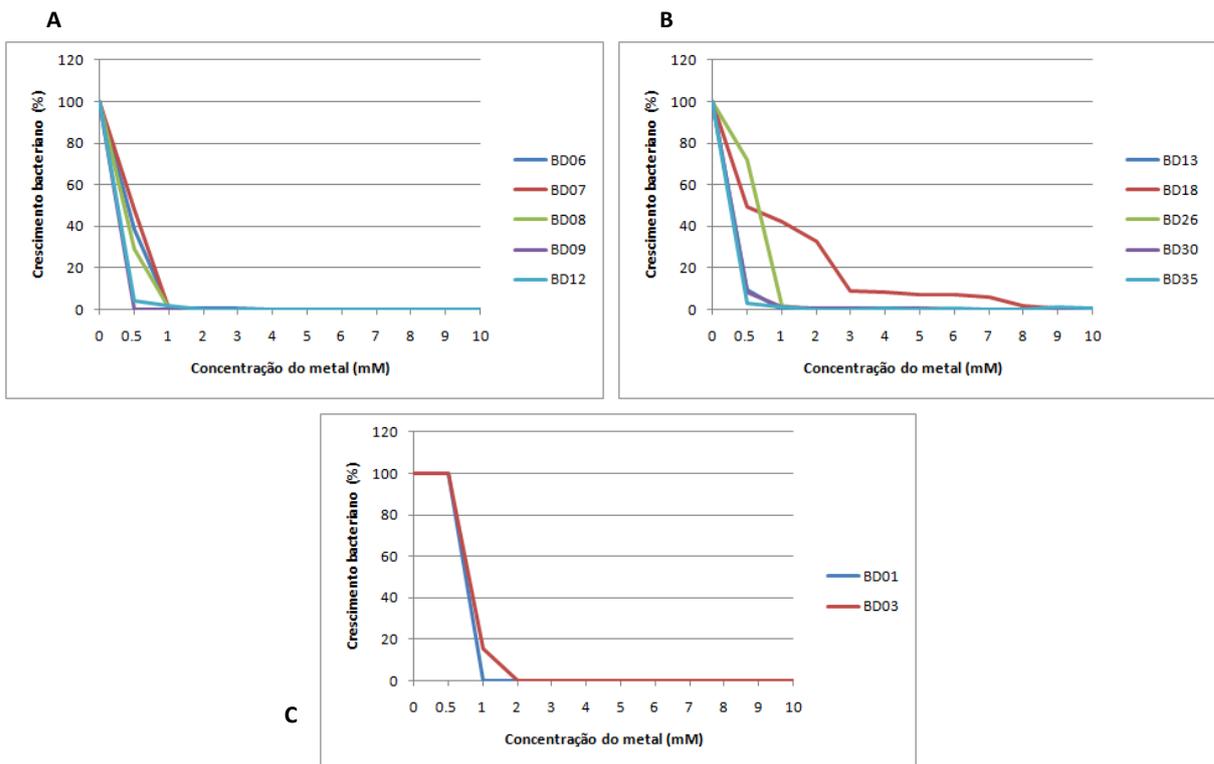
**Figura 14.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

- **Arsênio**

Metade dos isolados não resistiu a concentrações maiores do que 2 mM de arsenato e a maioria não cresceu em concentrações maiores do que 1 mM de arsenito. O isolado BD18 pode ser considerado o mais resistente do gênero *Bacillus* ao semimetal arsênio, já que cresceu na concentração de 7 mM nas duas formas testadas (Figuras 15 e 16).



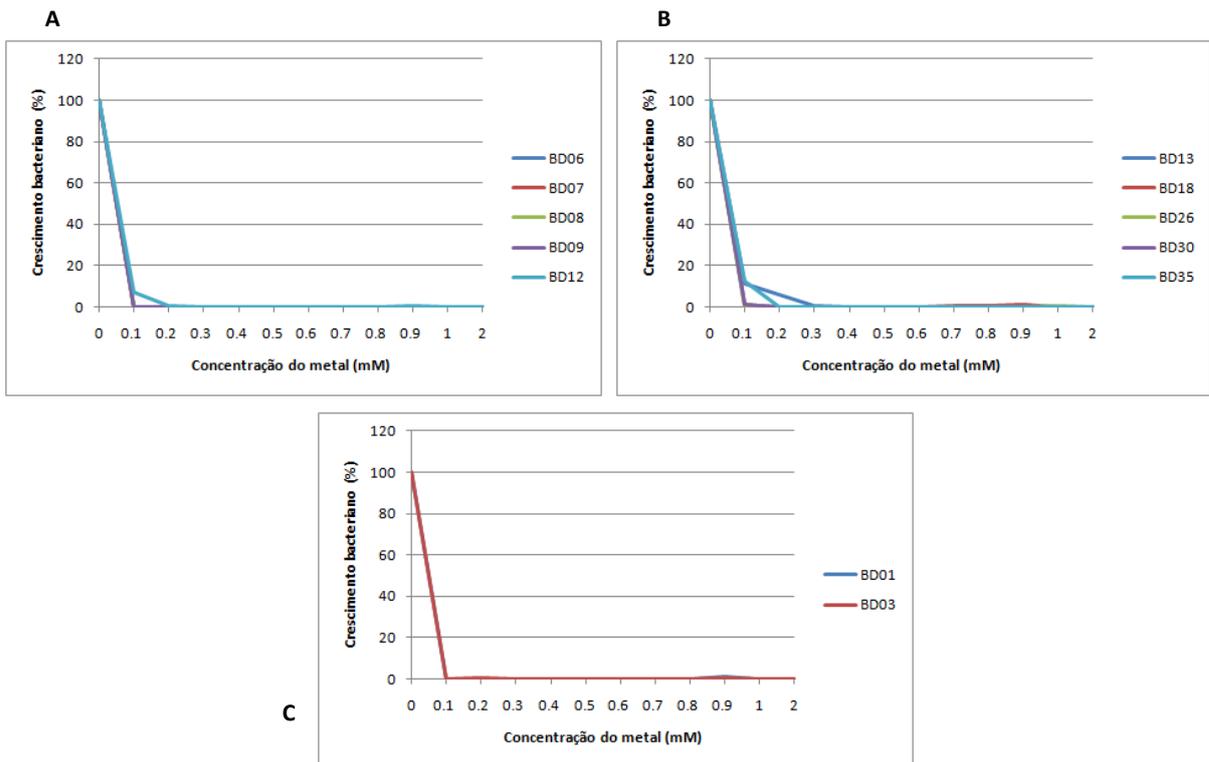
**Figura 15.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.



**Figura 16.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

#### • Mercúrio

Os isolados do gênero *Bacillus* foram sensíveis ao metal mercúrio. A maioria só cresceu na menor concentração testada (0,1 mM) e apenas um isolado (BD13) cresceu na concentração 0,2 mM (Figura 17).



**Figura 17.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Bacillus* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD06, BD07, BD08, BD09 e BD12. B. Isolados BD13, BD18, BD26, BD30 e BD35. C. Isolados BD01 e BD03.

Os isolados do gênero *Bacillus*, no geral, foram mais resistentes ao cromo e mais sensíveis ao mercúrio. Os isolados BD07, BD08 e BD09 foram os que apresentaram menor resistência a diversos metais, enquanto os isolados BD06 e BD12 mostraram uma resistência maior a mais de um metal testado.

A resistência a metais pelo gênero *Bacillus* já foi estudada por vários autores, sendo o grau de resistência desse gênero muito variado, com linhagens apresentando MICs menores do que 0,6 mM até maiores do que 20 mM de um mesmo metal.

Uma linhagem de *Bacillus cereus*, isolada de uma área metalúrgica em Nápoles, Itália, e utilizada em um estudo de biorremediação, apresentou MICs para o zinco, o cromo e o níquel de 3, 1,5 e 1 mM, respectivamente e MICs menores do que 1 mM para o cobre e o cobalto (Alisi et al., 2009). Uma linhagem de *B. megaterium* isolada de efluentes de indústria têxtil também apresentou um MIC muito baixo para o zinco, de apenas 0,45 mM (Ali et al., 2009). No entanto, uma linhagem de *Bacillus subtilis* mostrou ser resistente a 10,43 mM de zinco (Ali et al., 2009), enquanto uma linhagem de *Bacillus circulans*, isolada de solo contaminado com metais pesados na Turquia, mostrou ser resistente a 22 mM de zinco (Yilmaz, 2003). Assim como o zinco, a resistência ao níquel, ao cobre e ao cobalto pelo gênero *Bacillus* também já foi estudada por diversos autores. Em um estudo com *Bacillus cereus*, uma linhagem produtora de enzima protease, isolada de uma amostra de

solo da Índia, apresentou um MIC de apenas 0,73 mM para o níquel e 0,94 mM para o cobalto (Singh et al., 2010). No entanto, a linhagem de *Bacillus circulans* isolada na Turquia mostrou ser resistente a 10 mM de níquel e 2 mM de cobalto (Yilmaz, 2003). Diferente do zinco e do níquel, por exemplo, a tolerância ao cobre por esse gênero não é muito alta. Enquanto a linhagem de *Bacillus circulans* isolada na Turquia mostrou ser resistente a 10 mM de níquel e a 22 mM de zinco, o MIC dessa mesma linhagem para o cobre foi de apenas 2,5 mM (Yilmaz, 2003). Outros estudos com *Bacillus* registraram MICs iguais ou menores do que 1 mM para o cobre (Alisi et al., 2009; Viti et al., 2002).

Em outro estudo, quatro linhagens de *Bacillus*, três *Bacillus maroccanus* e um *Bacillus megaterium*, isoladas de solo poluído com cobre, foram avaliadas quanto à tolerância a alguns metais pesados, incluindo o zinco, o níquel, o cobalto, o cobre e o cromo. O MIC de todas as quatro linhagens para estes metais não passou de 0,8 mM com exceção do metal cromo que apresentou MICs bem maiores, de 9 a 20 mM (Viti et al., 2002). A resistência ao cromo hexavalente pelo gênero *Bacillus* já foi estudada por diversos autores, mas nem sempre valores altos de MICs são encontrados. A linhagem de *Bacillus cereus* isolada na Índia apresentou um MIC de apenas 0,42 mM para o cromo (Singh et al., 2010). Valores baixos de MIC (< 1 mM) também foram obtidos por Verma et al. (2009) com *Bacillus* de quatro espécies diferentes isolados de efluentes de curtume.

De acordo com a literatura, os resultados obtidos com as linhagens isoladas das torres de transmissão de energia elétrica mostraram que essas bactérias apresentam certa resistência ao zinco, maior do que algumas linhagens citadas na literatura, mas menor do que outras, dificultando uma classificação de linhagem resistente ou sensível. Mesmo assim, dentre as espécies citadas acima, o *Bacillus cereus*, que é a espécie filogeneticamente mais próxima dos isolados das torres, apresentou um MIC parecido com os obtidos neste trabalho. Já no caso do níquel e do cromo, os isolados das torres de transmissão foram mais resistentes do que as espécies filogeneticamente mais próximas deles (*Bacillus cereus*), porém menos resistentes do que os *Bacillus* testados por Yilmaz et al. (2003) e Viti et al. (2002). No entanto, todos os testes citados acima foram realizados em meio sólido, o que dificulta novamente a comparação.

Nossos resultados indicam que os isolados das torres de transmissão apresentaram resistência maior do que os *Bacillus* descritos na literatura, tanto para o cobre, quanto para o cobalto, sendo, portanto, considerados mais resistentes.

Em um estudo com *Bacillus cereus*, uma linhagem produtora de enzima protease, isolada de uma amostra de solo da Índia, apresentou um MIC de 7,37 mM para o arsenato (Singh et al., 2010), mostrando um resultado semelhante ao obtido por dois isolados das torres (BD18 e BD26). Quatro espécies de *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. brevis*, *B. pumilis* e *B. coagulans*), resistentes ao cromo e isoladas de efluentes de curtume apresentaram

resistência a 0,5 mM de arsenito (Verma et al., 2009). No entanto, outros quatro *Bacillus*, isolados de solo contaminado com arsênio, mostraram-se resistentes a 3 ou 5 mM de arsenito (Cai et al., 2009). Esses resultados mostram que a resistência a altas concentrações de arsênio, principalmente na forma de arsenito, não é tão comum nesse gênero, corroborando com os valores obtidos neste trabalho.

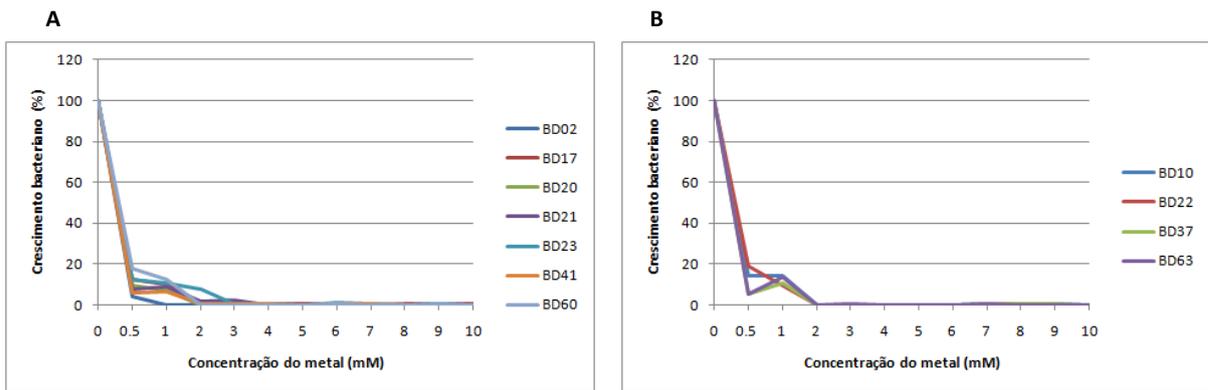
A resistência ao mercúrio não é muito comum, mesmo entre micro-organismos resistentes a diversos metais. Vetriani et al. (2005) estudaram a relação entre a resistência ao mercúrio pelas bactérias e sua proximidade com os fluidos hidrotermais do oceano no leste do Pacífico. Entre essas bactérias, foi isolado um *Bacillus*, que, no entanto, só conseguiu crescer em concentrações iguais ou menores do que 0,005 mM de mercúrio. De et al. (2008) isolaram diversas bactérias capazes de resistir a 0,09 mM de mercúrio, dentre elas três *Bacillus pumilis*. Já outro *B. pumilis*, junto com mais duas espécies de *Bacillus* (*B. megaterium* e *B. brevis*) se mostraram sensíveis a 0,07 mM de mercúrio (Verma et al., 2009). Uma linhagem de *Bacillus* foi testada quanto à sua resistência a diversos metais com o intuito de ser utilizada em biorremediação e apesar da sua alta resistência ao cromo (15 mM), apresentou um MIC para o mercúrio de apenas 0,18 mM (Zahoor e Rehman, 2009). Tanto os resultados encontrados na literatura, quanto os resultados obtidos neste trabalho, mostram o quanto o mercúrio é tóxico para isolados do gênero *Bacillus*.

### **5.3.2 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Lysinibacillus***

Os 11 isolados do gênero *Lysinibacillus* foram avaliados em duplicatas quanto à resistência a diversos metais. Os isolados BD02, BD10, BD17, BD20, BD21, BD22, BD23, BD37 e BD41 foram identificados apenas em nível de gênero, enquanto os isolados BD60 e BD63 foram identificados como *Lysinibacillus fusiformis*. Os isolados BD10, BD22, BD37 e BD63 foram selecionados para a repetição dos testes em triplicatas.

- **Zinco**

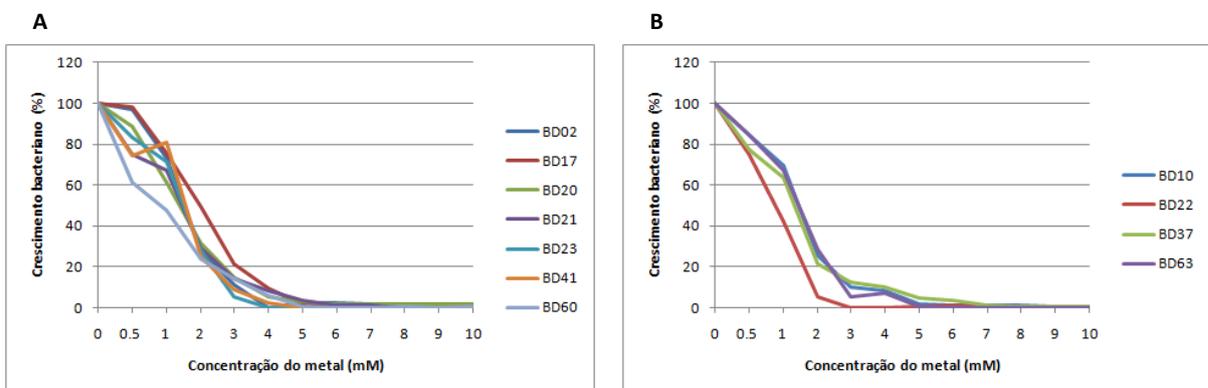
Os isolados do gênero *Lysinibacillus* não apresentaram muita resistência ao zinco e mesmo na concentração mais baixa houve pouco crescimento. O maior MIC foi do isolado BD21 (3 mM). O BD02 só resistiu à menor concentração testada (0,5 mM) (Figura 18).



**Figura 18.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

### • Níquel

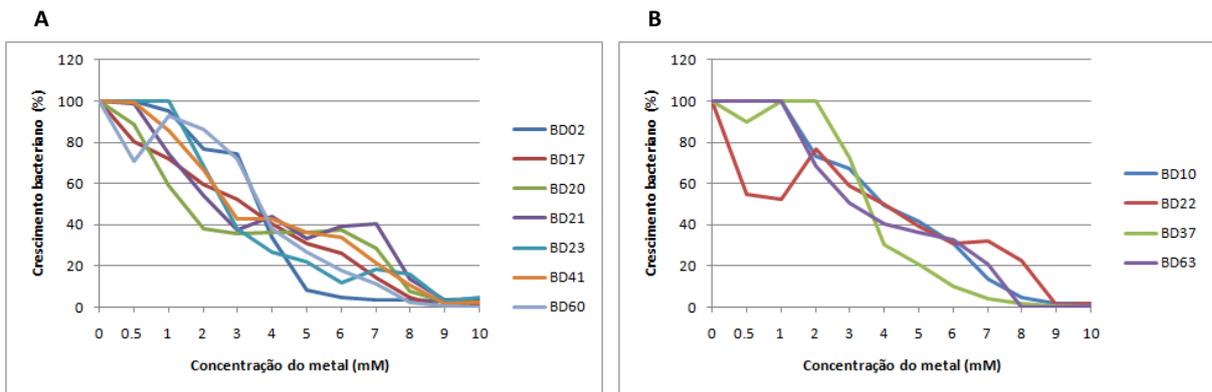
Todos os isolados do gênero *Lysinibacillus* cresceram na concentração de 2 mM. Cinco isolados conseguiram crescer em concentrações iguais ou maiores do que 5 mM de níquel (BD02, BD17, BD10, BD20 e BD21) (Figura 19). O isolado BD20 mostrou-se resistente à 10 mM, embora o crescimento tenha sido muito baixo (1,98%).



**Figura 19.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

### • Cobre

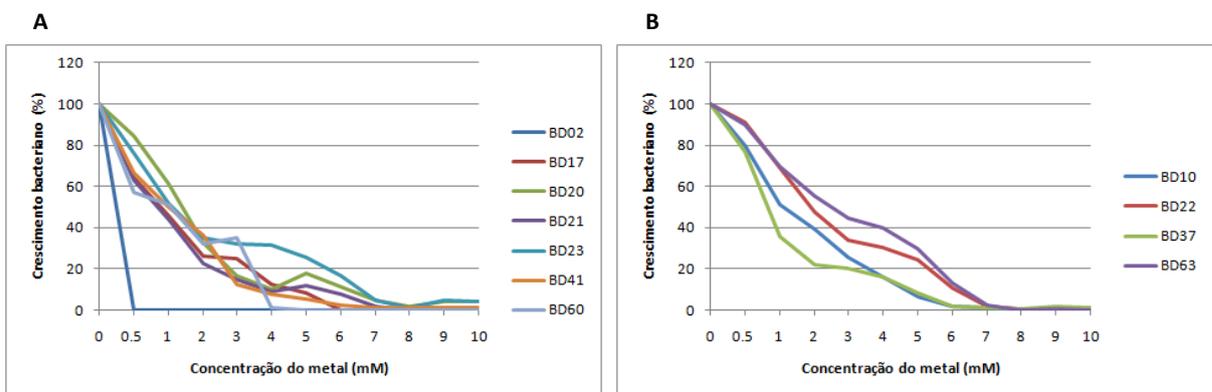
A maioria dos isolados (BD10, BD20, BD21, BD22, BD23 e BD41) conseguiu crescer até a concentração máxima testada (10 mM), embora o crescimento celular tenha sido baixo (< 5%). O BD63 foi o isolado que apresentou o menor MIC para o cobre (7 mM) (Figura 20).



**Figura 20.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

### • Cobalto

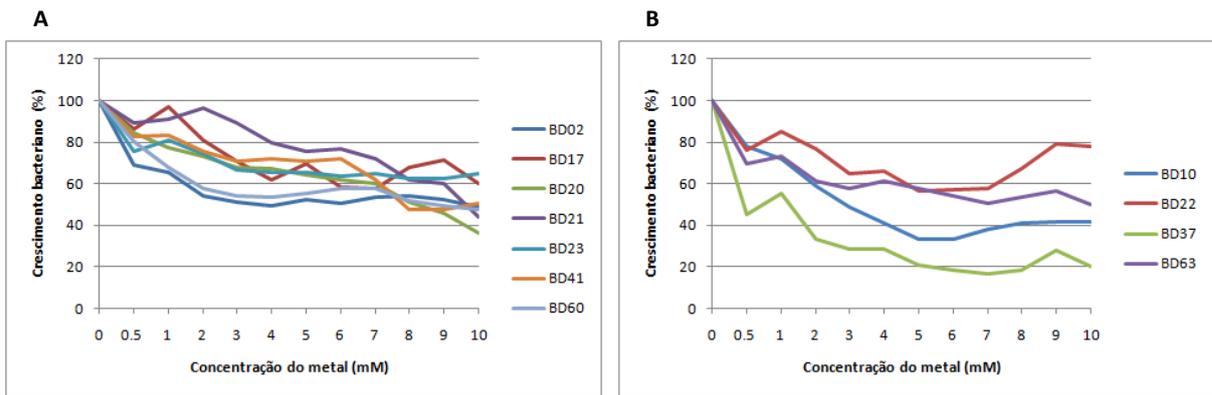
Os BD20, BD23, BD37 e BD41 cresceram na concentração de 10 mM embora o crescimento tenha sido muito baixo ( $\leq 4\%$ ). O isolado BD02 não tolerou nem 0,5 mM, podendo, portanto, ser considerado sensível ao metal cobalto (Figura 21).



**Figura 21.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

### • Cromo

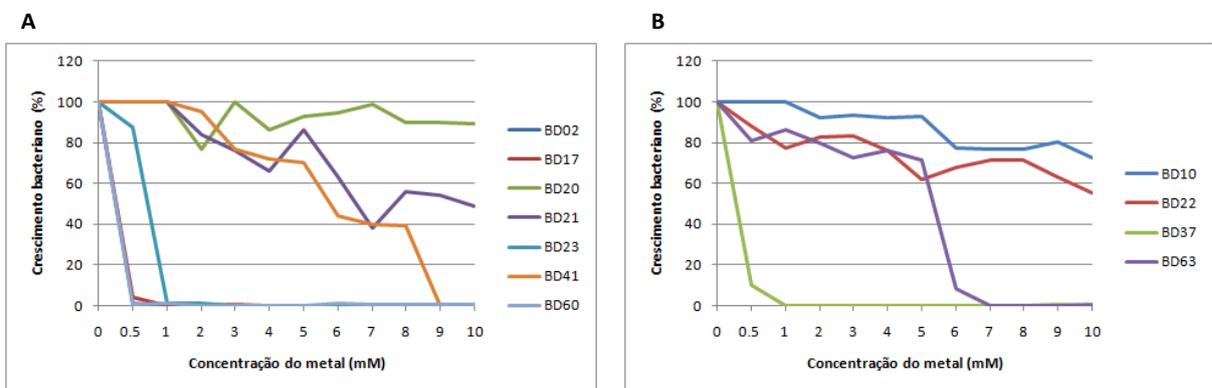
O gênero *Lysinibacillus* se mostrou muito resistente ao cromo, com todos os isolados conseguindo crescer na maior concentração testada (10 mM). Além disso, com exceção do BD37, o crescimento celular frente a 10 mM de cromo foi bom ( $> 35\%$ ) (Figura 22).



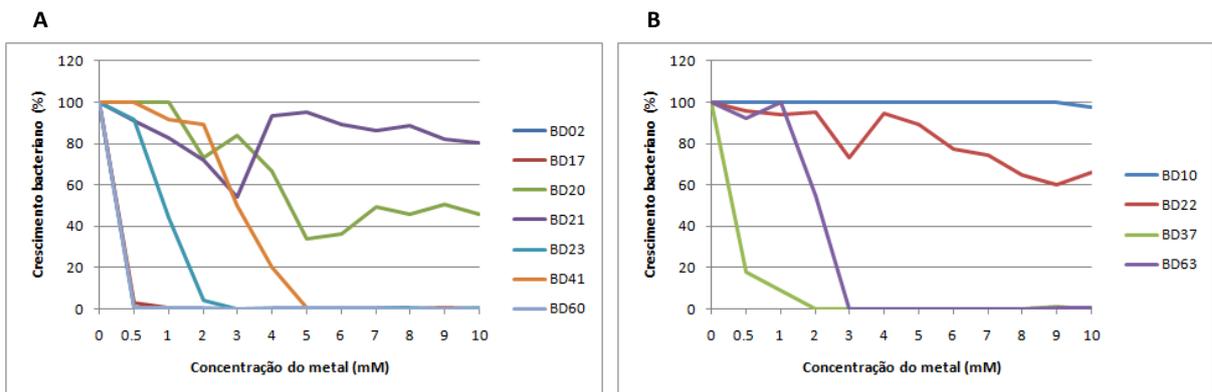
**Figura 22.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

### • Arsênio

Dos onze isolados do gênero *Lysinibacillus*, quatro (BD10, BD20, BD21 e BD22) conseguiram crescer na maior concentração testada (10 mM) de arsenito. O isolado BD60, no entanto, não tolerou 0,5 mM de arsenato ou arsenito, sendo considerado sensível ao arsênio. Assim como ele, os isolados BD02 e BD17 também foram sensíveis ao arsênio, já que não resistiram a concentrações maiores do que 0,5 mM de arsenato (Figura 23) ou arsenito (Figura 24).



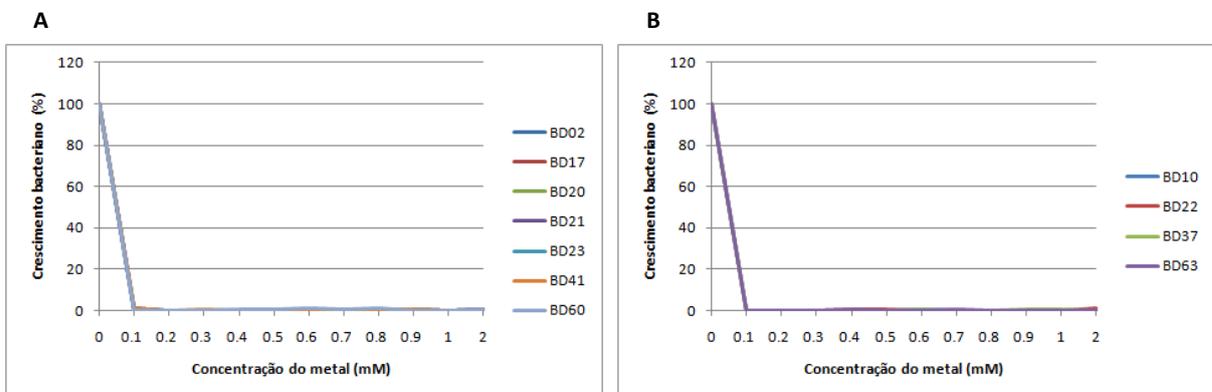
**Figura 23.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.



**Figura 24.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio (Na<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

#### • Mercúrio

Os isolados do gênero *Lysinibacillus* foram extremamente sensíveis ao metal mercúrio. Dos onze isolados, sete (BD02, BD10, BD22, BD23, BD37, BD60 e BD63) não cresceram nem na menor concentração testada (0,1 mM). Os quatro isolados restantes cresceram apenas na concentração de 0,1 mM e o crescimento foi muito baixo (< 1,5%) (Figura 25).



**Figura 25.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Lysinibacillus* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio (HgCl<sub>2</sub>). A. Isolados BD02, BD17, BD20, BD21, BD23, BD41 e BD60. B. Isolados BD10, BD22, BD37 e BD63.

O gênero *Lysinibacillus* apresentou maior resistência ao metal cromo e foi mais sensível ao mercúrio, seguido pelo zinco. O isolado que apresentou os menores MICs em mais de um metal foi o BD02, enquanto, o isolado que apresentou os maiores MICs em mais de um metal foi o BD20.

Uma linhagem de *Lysinibacillus*, ZC1, isolada de águas residuais contaminadas com cromo foi identificada como *Lysinibacillus fusiformis* e apresentou um MIC extremamente alto para o cromato de 60 mM (He et al., 2011). Os isolados das torres também foram

resistentes ao cromo considerando a concentração de 10 mM como sendo a maior concentração testada. No entanto, como essa foi muito inferior a 60 mM, a comparação se torna impossível e novos testes deverão ser efetuados para avaliar qual é o MIC dos isolados do nosso estudo. Outros *Lysinibacillus* já foram isolados a partir de solos contaminados com cromo. Um *Lysinibacillus fusiformis* e um *Lysinibacillus sphaericus*, ambos com capacidade de reduzir cromato, foram isolados de solo contaminado com cromo, numa área industrial da Índia (Desai et al., 2008).

A linhagem *Lysinibacillus fusiformis* ZC1, apesar de apresentar alta resistência ao cromo (MIC = 60 mM), só resistiu a 0,5 mM de níquel, 0,7 mM de cobre e 0,5 mM de cobalto (He et al., 2011). Os isolados das torres foram bem mais resistentes ao níquel, cobre e cobalto do que a linhagem ZC1, no entanto, a falta de mais dados na literatura impede o estabelecimento de um grau de resistência desses isolados para estes metais.

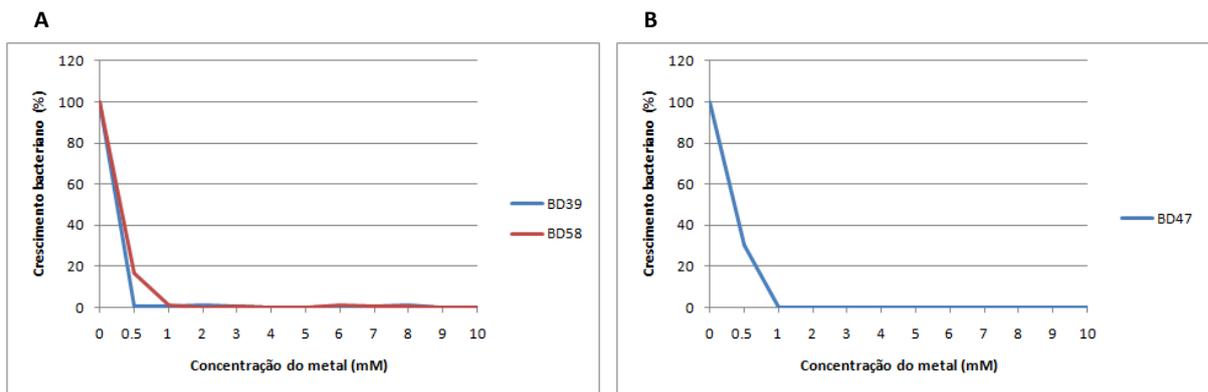
A resistência ao arsenato e arsenito também foi verificada na linhagem de *Lysinibacillus fusiformis* ZC1, sendo considerada muito resistente, tanto para o arsenato (50 mM), quanto para o arsenito (15 mM) (He et al., 2011). Assim como o cromo, alguns isolados das torres, do gênero *Lysinibacillus*, também foram resistentes ao arsênio, crescendo na maior concentração testada. No entanto, essa concentração foi de 10 mM, o que torna difícil a comparação com a linhagem ZC1. Em relação ao mercúrio, todos os isolados da torre de transmissão foram sensíveis, assim com a linhagem *Lysinibacillus fusiformis* ZC1, que apresentou o MIC de 0,04 mM (He et al., 2011).

### **5.3.3 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Exiguobacterium***

Os três isolados do gênero *Exiguobacterium* (BD39, BD47 e BD58) foram avaliados em duplicatas primeiramente, sendo o isolado BD47 selecionado para repetição dos testes em triplicata. Os isolados foram identificados como *Exiguobacterium profundum*.

- **Zinco**

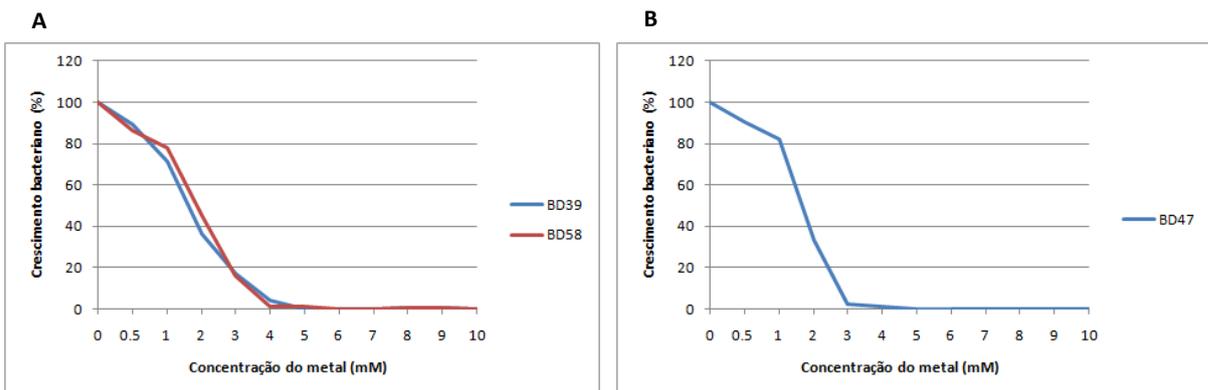
O gênero *Exiguobacterium* foi extremamente sensível ao zinco, não tolerando concentrações acima de 0,5 mM (Figura 26).



**Figura 26.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

### • Níquel

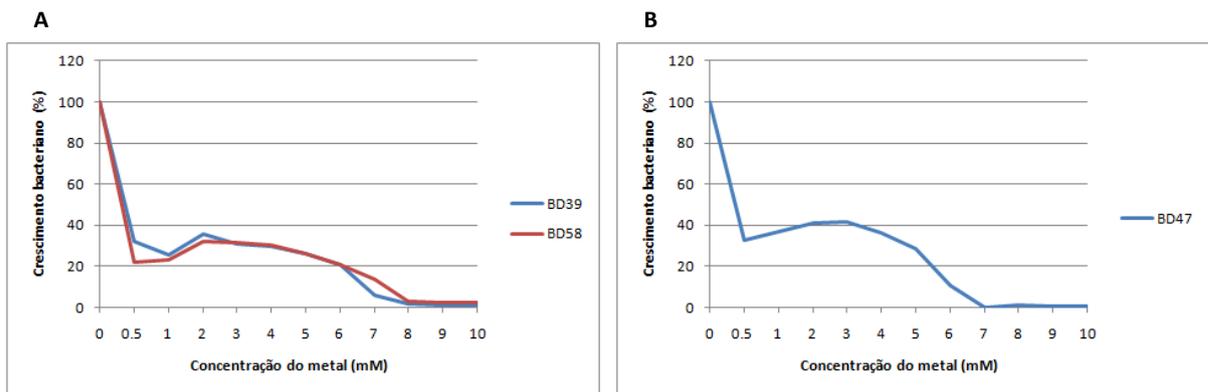
O gênero *Exiguobacterium* não foi muito resistente ao níquel. Os três isolados conseguiram crescer na concentração de 4 mM, porém o crescimento foi baixo (< 4%) (Figura 27).



**Figura 27.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

### • Cobre

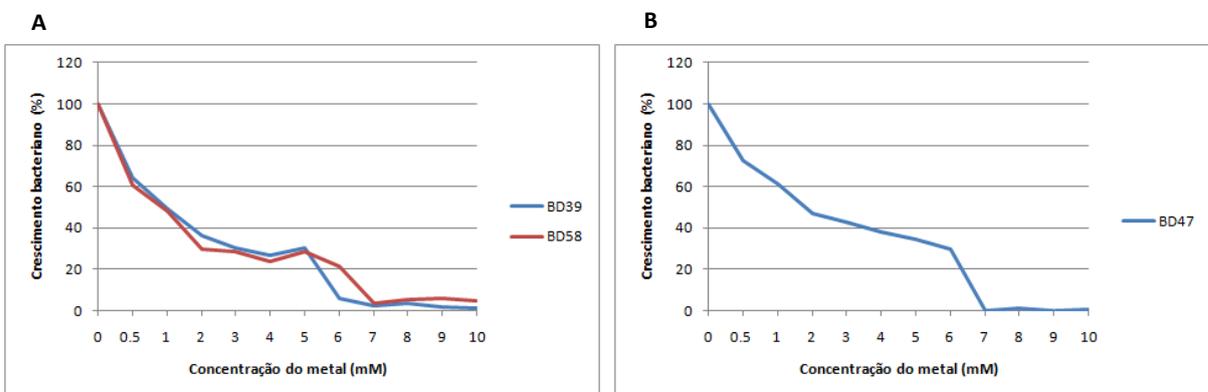
Os três isolados do gênero *Exiguobacterium* apresentaram um crescimento bom (> 25%) na concentração de 5 mM de cobre, porém após essa concentração, o crescimento caiu, entretanto, os isolados BD39 e BD58 foram resistentes até a máxima concentração testada (10 mM) (Figura 28).



**Figura 28.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

#### • Cobalto

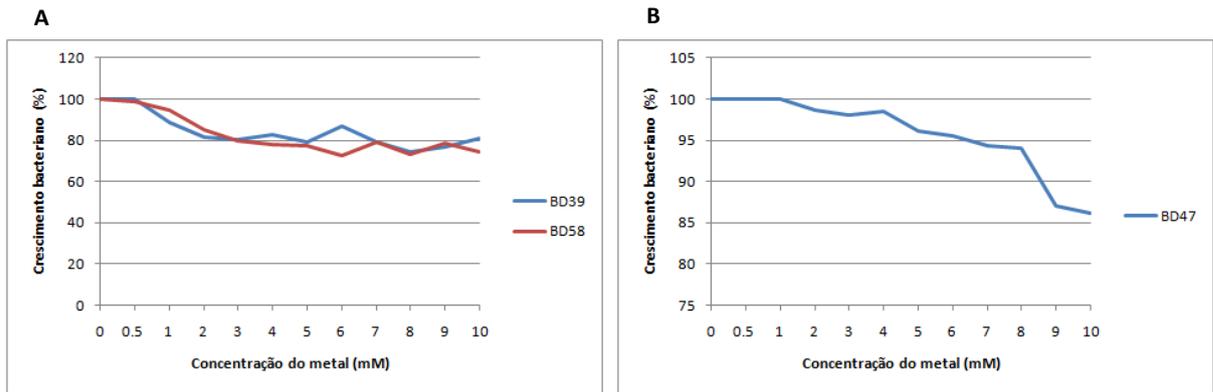
Dos três isolados do gênero *Exiguobacterium*, dois (BD39 e BD58) conseguiram crescer na maior concentração testada, porém o crescimento foi baixo (1 e 5%, respectivamente). O BD47 resistiu a 6 mM de cobalto. Até a concentração de 5 mM, os isolados apresentaram em média um crescimento de 30% (Figura 29).



**Figura 29.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

#### • Cromo

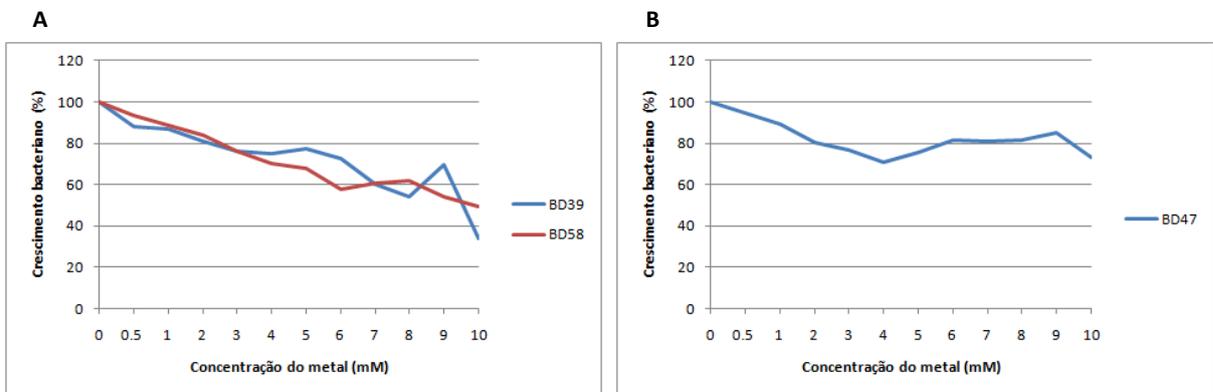
O gênero *Exiguobacterium* foi muito resistente ao cromo, apresentando crescimento superior a 70% na maior concentração testada (10 mM) (Figura 30).



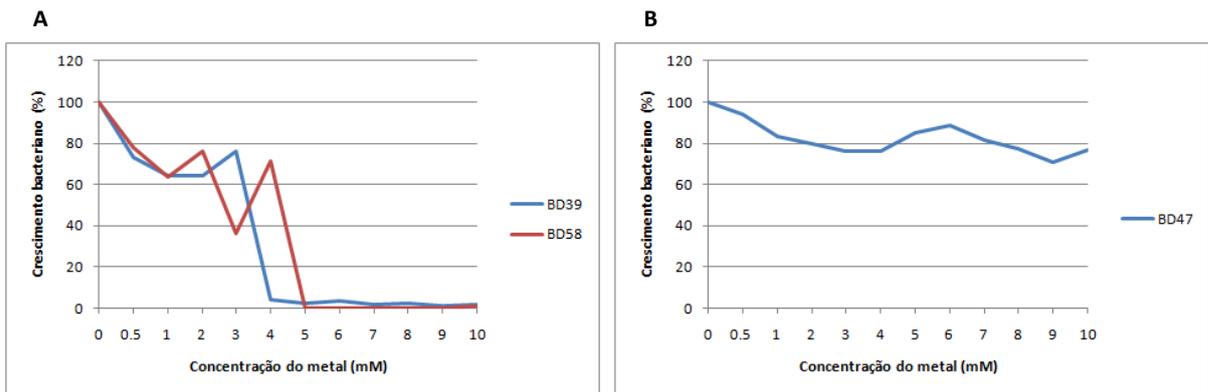
**Figura 30.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

#### • Arsênio

Os três isolados do gênero *Exiguobacterium* foram resistentes ao arsênio na forma de arsenato, com MICs iguais a 10 mM (Figura 31). No entanto, o isolado BD58 não conseguiu crescer em concentrações maiores do que 4 mM de arsenito. Os isolados BD39 e BD47 toleraram a maior concentração testada, porém apenas o isolado BD47 apresentou crescimento alto na presença de 10 mM (73%) (Figura 32).



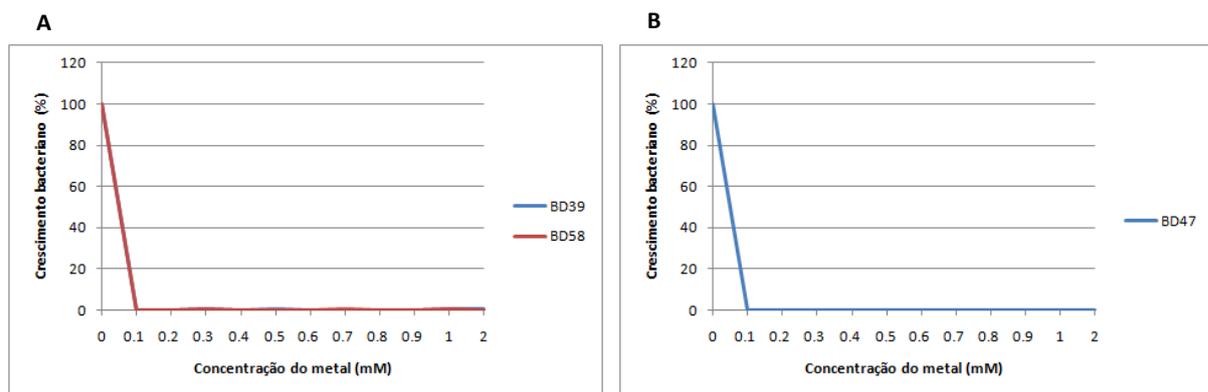
**Figura 31.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.



**Figura 32.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio (Na<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

### • Mercúrio

Os isolados do gênero *Exiguobacterium* não toleraram nem a menor concentração testada de mercúrio (0,1 mM) sendo, portanto, considerados sensíveis a esse metal (Figura 33).



**Figura 33.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio (HgCl<sub>2</sub>). A. Isolados BD39 e BD58. B. Isolado BD47.

Um estudo com uma linhagem de *Exiguobacterium* sp., isolada de solo irrigado com efluentes de curtume no norte da Índia, avaliou sua resistência a diversos metais, incluindo o zinco, níquel e cobre. Para estes metais, a *Exiguobacterium* sp. ZM-2 conseguiu crescer na concentração de 2,78 mM, 6,73 mM e 2,35 mM, respectivamente (Alam e Malik, 2008). Outra linhagem de *Exiguobacterium* sp., isolada de uma área metalúrgica em Nápoles, Itália, e utilizada em um estudo de biorremediação, apresentou um MIC de 5 mM para o zinco, 4 mM para o níquel e 2 mM para o cobre (Alisi et al., 2009). De acordo com a literatura, o gênero *Exiguobacterium* apresenta alguma resistência ao metal zinco, porém os resultados obtidos com as linhagens isoladas das torres de transmissão de energia elétrica não foram promissores e mostraram que esses isolados são sensíveis ao zinco. Em relação ao níquel,

os isolados das torres apresentaram resistência um pouco menor do que as bactérias do gênero *Exiguobacterium* descritas na literatura, no entanto, os resultados obtidos neste trabalho foram em meio líquido, enquanto que na literatura os ensaios foram feitos em meio sólido, o que dificulta a comparação. Quanto ao cobre, os isolados das torres de energia elétrica também apresentaram resistência a esse metal e, inclusive foram mais resistentes do que as bactérias encontradas na literatura. Além disso, em um trabalho sobre diversidade de bactérias endofíticas de plantas tolerantes ao cobre foram encontrados 12 gêneros de bactérias resistentes ao cobre incluindo o gênero *Exiguobacterium* (Sun et al., 2010).

Pouco se encontra na literatura sobre a relação do gênero *Exiguobacterium* com o metal cobalto. A mesma linhagem de *Exiguobacterium* sp., isolada de uma área metalúrgica em Nápoles, Itália, e utilizada em um estudo de biorremediação, apresentou um MIC para o cobalto menor do que 1 mM (Alisi et al., 2009). Devido a falta de dados na literatura, a dificuldade de se estabelecer um grau de resistência dos isolados das torres de transmissão é grande. No entanto, os três isolados tiveram um crescimento bom (30%) na concentração de 5 mM e dois deles conseguiram crescer até 10 mM, o que é bem maior do que a linhagem de *Exiguobacterium* relatada na literatura.

A resistência ao cromo pelo gênero *Exiguobacterium* já foi estudada por diversos autores, sendo o grau de resistência desse gênero muito variado, com MICs menores do que 0,7 mM até maiores do que 12 mM. A linhagem de *Exiguobacterium* sp., isolada de uma área metalúrgica em Nápoles, Itália, apresentou um MIC para o cromo de apenas 0,5 mM (Alisi et al., 2009). Uma espécie de *Exiguobacterium*, identificada como *E. acetylicum*, apesar da capacidade de reduzir cromato, também apresentou um MIC baixo para este metal, de apenas 0,68 mM (Okeke, 2008). Algumas espécies de bactérias, resistentes ao cromato, foram isoladas de solo contaminado com cromo e uma delas foi identificada como *Exiguobacterium* sp. Essa linhagem, além de reduzir cromato, mostrou ser resistente a concentração de 1,5 mM desse metal (Sarangi e Krishnan, 2008). Além dessas linhagens de *Exiguobacterium*, uma bactéria desse gênero, que foi isolada no norte da Índia a partir de amostras de solo irrigado com efluentes de curtume, conseguiu crescer na concentração de 12,37 mM de cromo, sendo, portanto, mais resistente a esse metal (Alam e Malik, 2008). Os isolados das torres foram muito resistentes ao cromo e apresentaram crescimento alto na presença de 10 mM. Como essa foi a maior concentração testada, não se sabe se esses isolados são mais resistentes do que a linhagem encontrada por Alam e Malik (2008) e portanto novos experimentos, com concentrações maiores devem ser realizados.

Não há muita informação na literatura sobre a relação do gênero *Exiguobacterium* com o semimetal arsênio e as informações encontradas mostram que o grau de resistência desse gênero é muito abrangente, com MICs variando de 3 a 30 mM. Dentre muitas bactérias isoladas do solo de uma região altamente contaminada com arsênio na China, foi

identificada uma bactéria de gênero *Exiguobacterium* capaz de resistir a 3 mM de arsenito (Cai et al., 2009). Já uma *Exiguobacterium* sp., isolada do lago Ohakuri, na Nova Zelândia, mostrou ser extremamente resistente ao arsênio, tolerando concentrações maiores do que 30 mM de arsenito e com MIC de 100 mM para o arsenato (Anderson e Cook, 2004). Os isolados das torres foram mais resistentes do que a linhagem isolada na China, uma vez que conseguiram crescer na concentração de 10 mM, porém como essa foi a maior concentração testada, se torna impossível a comparação com a bactéria isolada na Nova Zelândia.

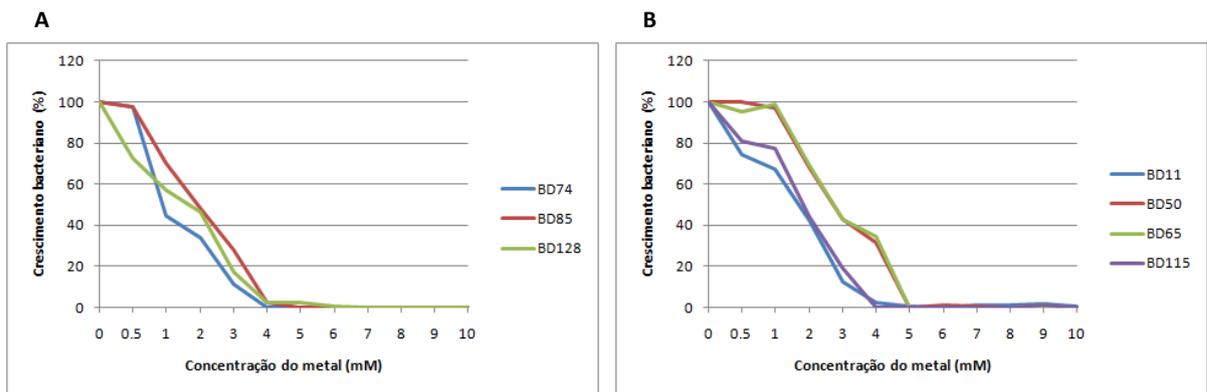
Os isolados do gênero *Exiguobacterium* apresentaram resposta parecida no crescimento celular diante das diversas concentrações de metais. No geral, os isolados do gênero *Exiguobacterium* obtidos em nosso estudo foram mais resistentes ao cromo, e mais sensíveis ao zinco e ao mercúrio. A existência de plasmídeos contendo o *operon mer*, envolvido na resistência ao mercúrio, é conhecida no gênero *Exiguobacterium* (Bogdanova et al., 1998). No entanto, os isolados das torres foram extremamente sensíveis a esse metal, indicando que este *operon* não está presente ou não está sendo expresso.

#### **5.3.4 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Serratia***

Os sete isolados do gênero *Serratia* (BD11, BD50, BD65, BD74, BD85, BD115 e BD128) foram avaliados em duplicatas, sendo que os isolados BD11, BD50, BD65 e BD115 foram selecionados para repetição dos testes em triplicatas. Os sete isolados foram identificados apenas em nível de gênero.

- **Zinco**

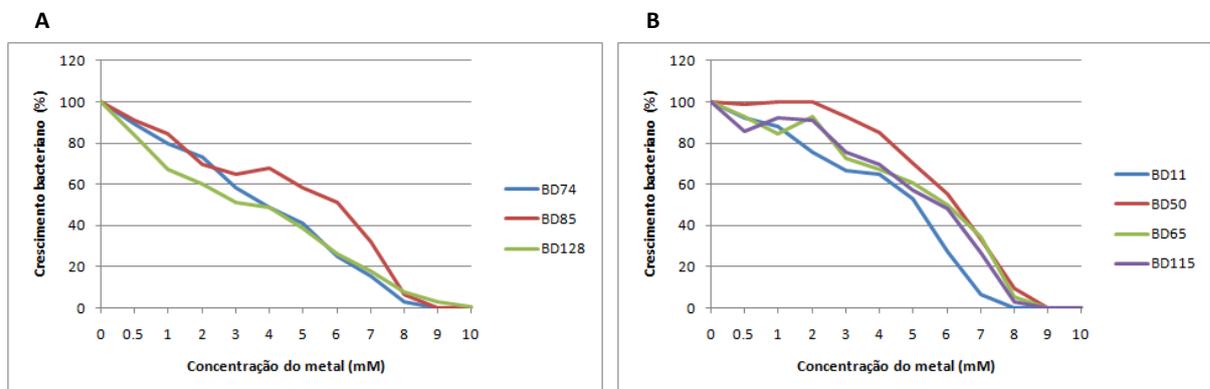
O crescimento celular da maioria dos isolados testados diminuiu consideravelmente a partir da concentração de 3 mM, no entanto, cinco isolados conseguiram crescer em concentrações maiores do que 3 mM. Os isolados BD11, BD50, BD65 e BD85 resistiram até 4 mM e o isolado BD128 conseguiu crescer na concentração de 5 mM de zinco, embora o crescimento tenha sido baixo (2,49%) (Figura 34).



**Figura 34.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

### • Níquel

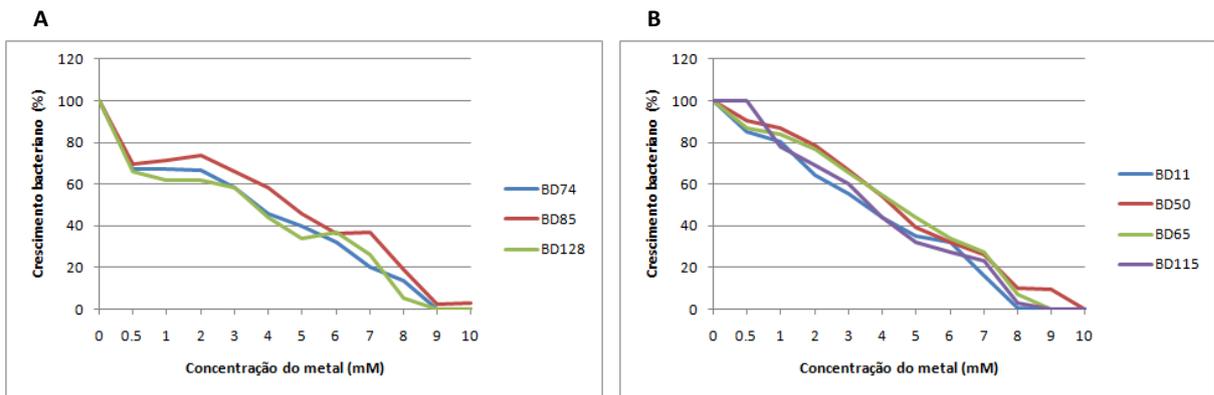
Os isolados do gênero *Serratia* tiveram seu crescimento diminuído conforme aumento da concentração de níquel. Todos os isolados conseguiram crescer até pelo menos a concentração de 7 mM, sendo que o maior MIC foi do isolado BD128 que resistiu a 9 mM de níquel, embora com baixo crescimento (3,18%) (Figura 35).



**Figura 35.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

### • Cobre

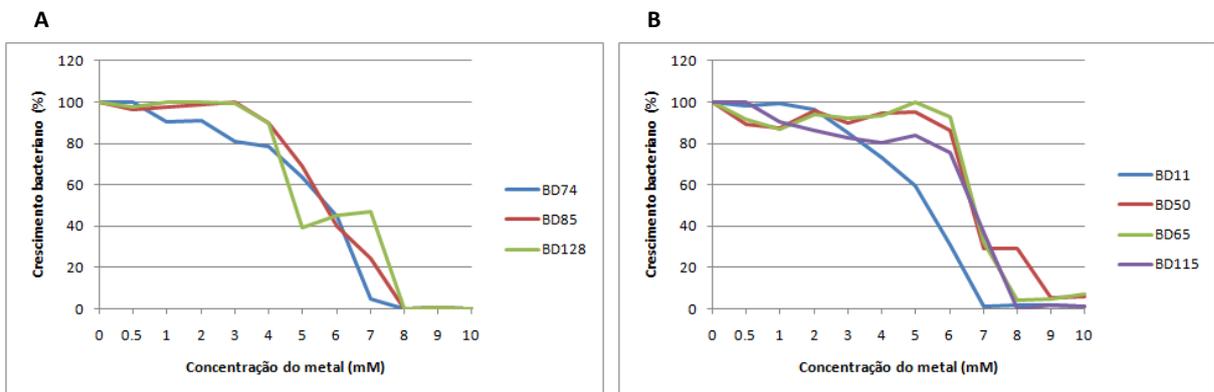
Todos os isolados do gênero *Serratia* conseguiram crescer pelo menos na concentração de 7 mM de cobre, destacando-se os isolados BD50 e BD85, que resistiram respectivamente a 9 e 10 mM (Figura 36).



**Figura 36.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

#### • Cobalto

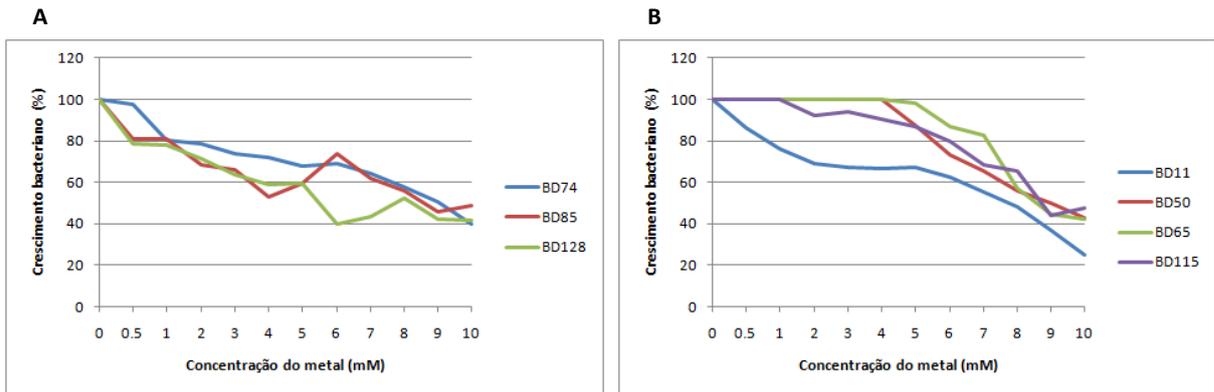
Todos os isolados do gênero *Serratia* resistiram a concentrações iguais ou maiores do que 7 mM de cobalto. Três isolados (BD11, BD50 e BD65) conseguiram crescer na maior concentração testada (10 mM), embora com crescimento celular abaixo de 7% (Figura 37).



**Figura 37.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Exiguobacterium* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

#### • Cromo

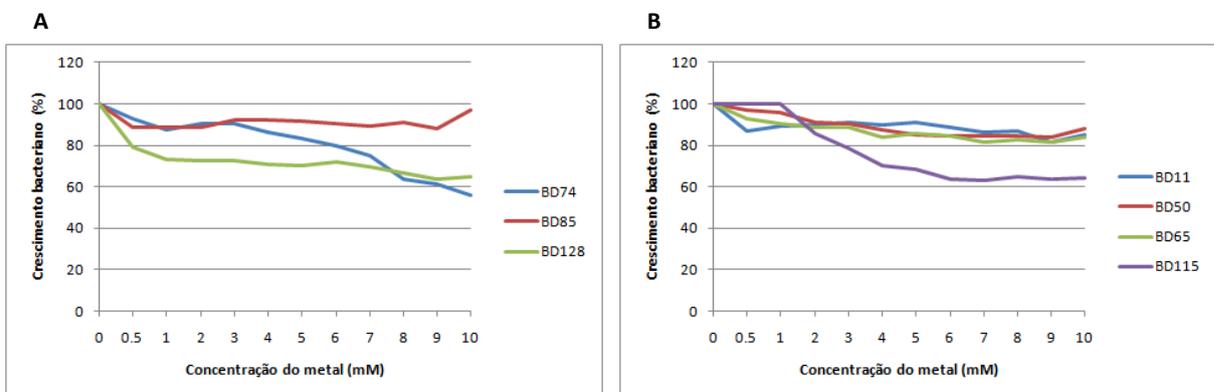
Os isolados do gênero *Serratia* podem ser considerados resistentes ao metal cromo, uma vez que cresceram na maior concentração testada (10 mM) e o crescimento foi maior do que 25% (Figura 38).



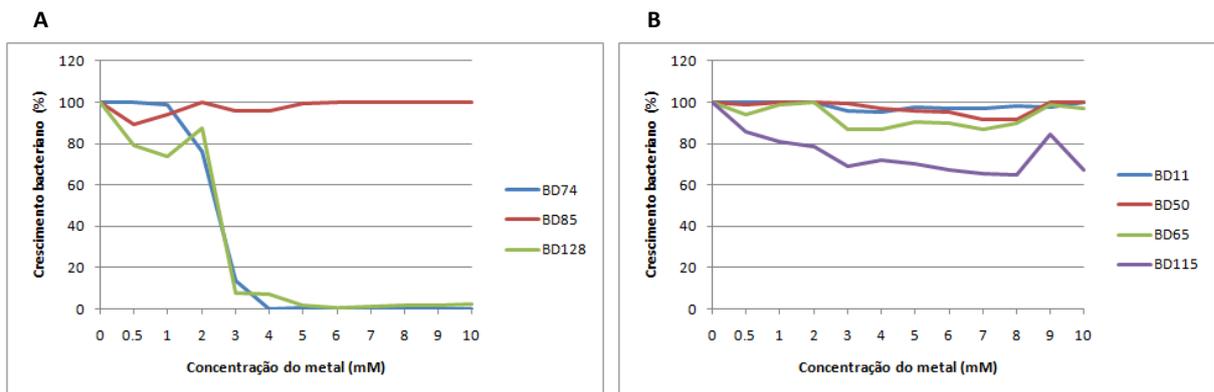
**Figura 38.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

#### • Arsênio

Todos os isolados do gênero *Serratia* foram resistentes ao arsênio na forma de arsenato (Figura 39), e apenas o isolado BD74 não conseguiu crescer na maior concentração (10 mM) do arsênio, na forma de arsenito (Figura 40). Apesar do BD128 ter crescido na concentração de 10 mM, o crescimento foi muito baixo (< 3%), diferentemente dos isolados BD11, BD50, BD65, BD85 e BD115 que apresentaram crescimento celular maior do que 65% na presença de 10 mM de arsenito.



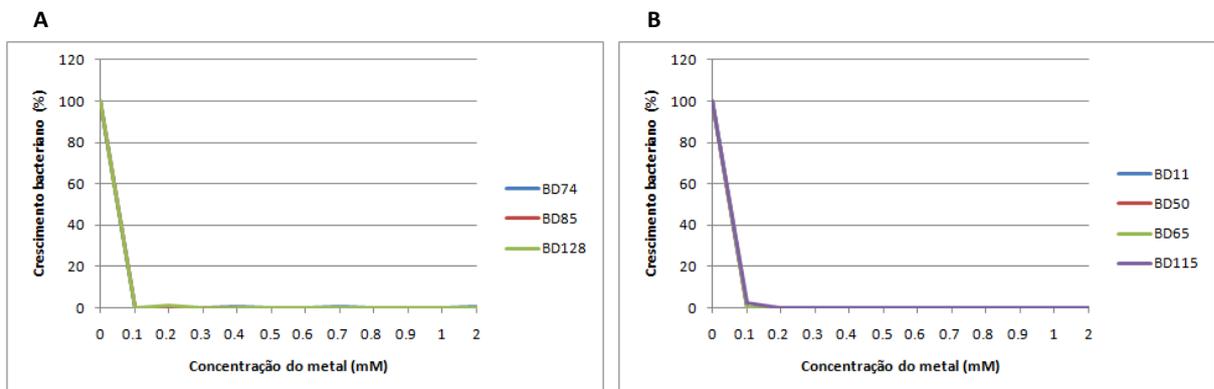
**Figura 39.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.



**Figura 40.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

#### • Mercúrio

Os isolados do gênero *Serratia* não conseguiram crescer nem na menor concentração testada de mercúrio (0,1 mM) com exceção do isolado BD115, que apresentou crescimento de apenas 2,47% nessa concentração (Figura 41).



**Figura 41.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Serratia* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD74, BD85 e BD128. B. Isolados BD11, BD50, BD65 e BD115.

O gênero *Serratia* apresentou maior resistência aos metais cromo e arsênio, na forma de arsenato, e menor resistência ao metal mercúrio. O isolado BD50 foi o que apresentou o maior MIC em mais de um metal.

A linhagem de *Serratia marcescens* C-1 isolada de um ambiente contaminado com níquel e cobalto em Cuba apresentou um MIC de 20 mM e 30 mM, respectivamente (Marrero et al., 2007). Embora o teste tenha sido realizado em meio sólido, dificultando a comparação com as linhagens isoladas das torres, fica claro que a *Serratia marcescens* C-1 é mais resistente do que os isolados deste trabalho para os dois metais.

Uma espécie de bactéria endofítica foi isolada de uma planta hiper-acumuladora de cádmio, na China, e identificada como *Serratia* sp. A bactéria foi testada contra vários metais, incluindo o zinco, o cobre e o cromo. O MIC para estes metais foi de 5 mM para o zinco, 10 mM para o cobre e 12 mM para o cromo (Luo et al., 2011). O resultado encontrado na linhagem da China não difere muito dos resultados obtidos neste trabalho. Isolados do gênero *Serratia* também foram obtidos em um estudo sobre a diversidade de bactérias endofíticas de plantas tolerantes ao cobre, indicando que estes micro-organismos apresentam resistência a alguns metais pesados (Sun et al., 2010).

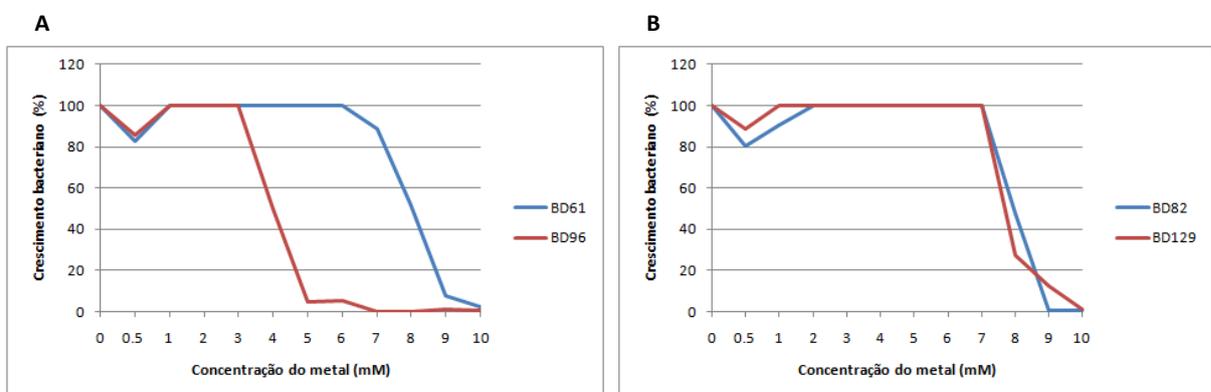
Sabe-se que o plasmídeo pDU1358, que confere resistência ao mercúrio, foi primeiramente isolado de uma linhagem de *Serratia marcescens* (Griffin et al., 1985; 1987), no entanto, os isolados das torres de transmissão de energia elétrica do gênero *Serratia* não apresentaram qualquer resistência a esse metal.

### 5.3.5 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Stenotrophomonas*

Os quatro isolados do gênero *Stenotrophomonas* (BD61, BD82, BD96 e BD129) foram avaliados em duplicatas, sendo selecionados os isolados BD82 e BD129 para a repetição dos testes em triplicatas. Os quatro isolados foram identificados como *Stenotrophomonas maltophilia*.

#### • Zinco

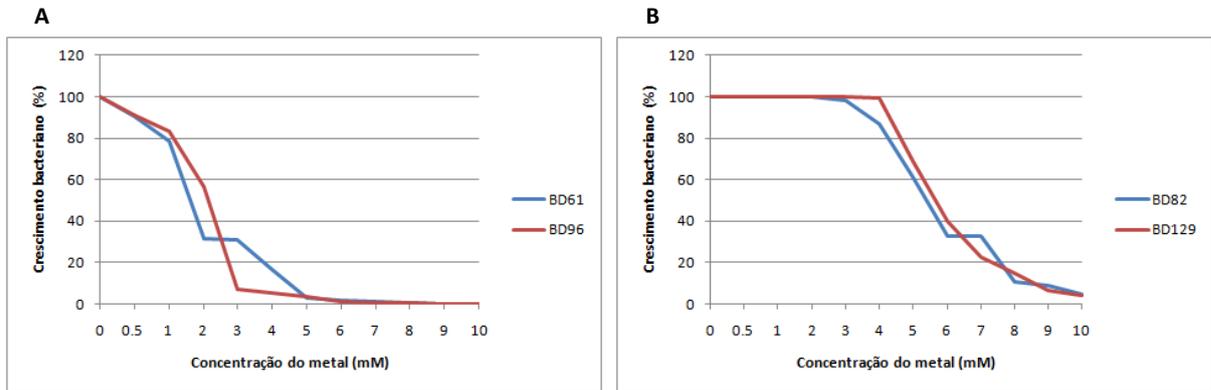
O gênero *Stenotrophomonas* mostrou-se resistente ao zinco. Os MICs dos isolados BD61, BD82, BD96 e BD129 foram 10 mM, 8 mM, 6 mM e 10 mM, respectivamente. Apesar de terem tolerado a concentração de 10 mM de zinco, os isolados BD61 e BD129 apresentaram uma diminuição drástica no crescimento a partir das concentrações 9 e 8 mM, respectivamente (Figura 42).



**Figura 42.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

- **Níquel**

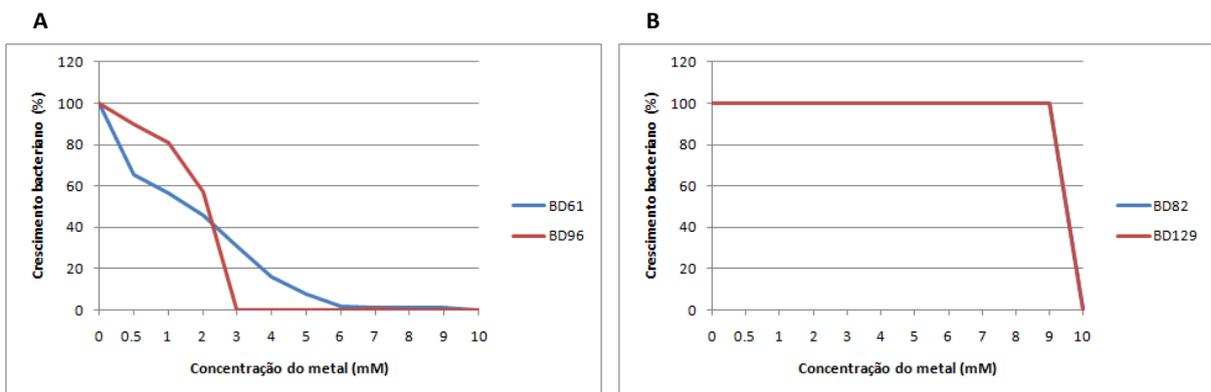
Os isolados BD82 e BD129 cresceram na presença de 10 mM de níquel, embora o crescimento tenha sido baixo (< 5%). Os isolados BD61 e BD96 resistiram a 6 mM e 5 mM, respectivamente (Figura 43).



**Figura 43.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

- **Cobre**

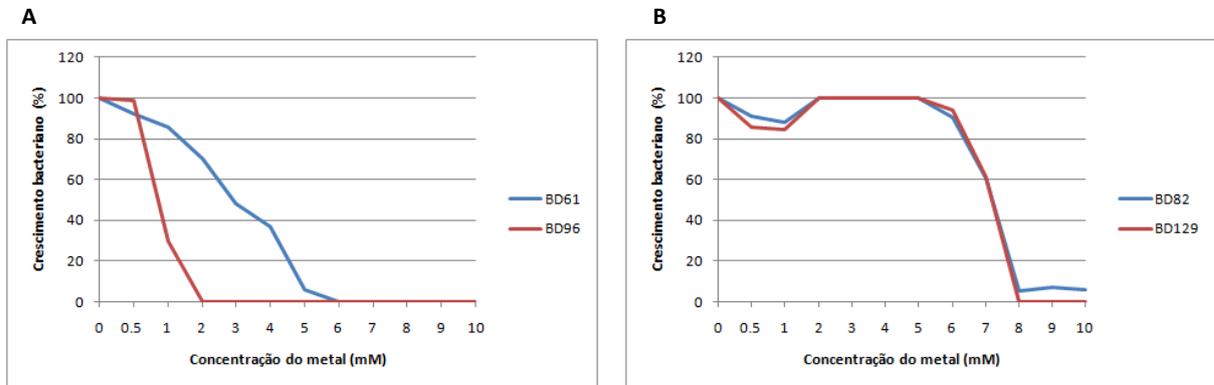
Os isolados BD82 e BD129 foram resistentes ao cobre, com crescimento celular praticamente inalterado na presença de 9 mM. O isolado BD61 apresentou MIC de 8 mM, porém o crescimento celular foi muito pequeno (< 2%). O isolado BD96 só tolerou a concentração de 2 mM (Figura 44).



**Figura 44.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

- **Cobalto**

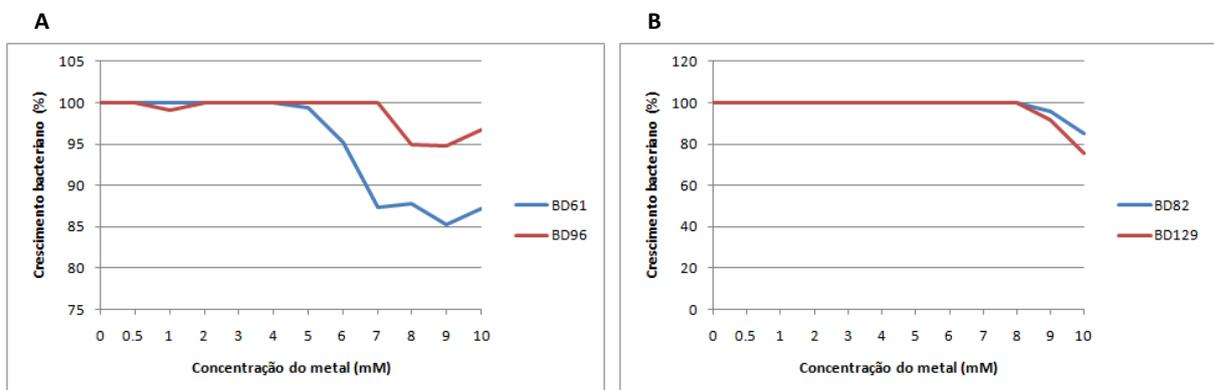
O gênero *Stenotrophomonas* variou muito quanto a sua resistência ao cobalto. O BD96 só conseguiu crescer na concentração de 1 mM, enquanto o BD82 resistiu a 10 mM de cobalto, embora seu crescimento tenha sido baixo (6,09%) (Figura 45).



**Figura 45.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

#### • Cromo

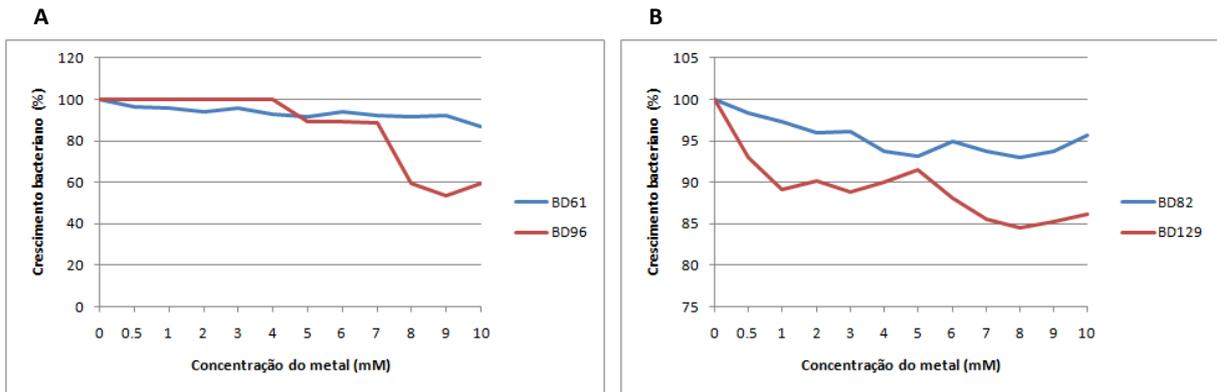
O gênero *Stenotrophomonas* foi muito resistente ao cromo. Os quatro isolados apresentaram crescimento acima de 75% na maior concentração testada (10 mM) (Figura 46).



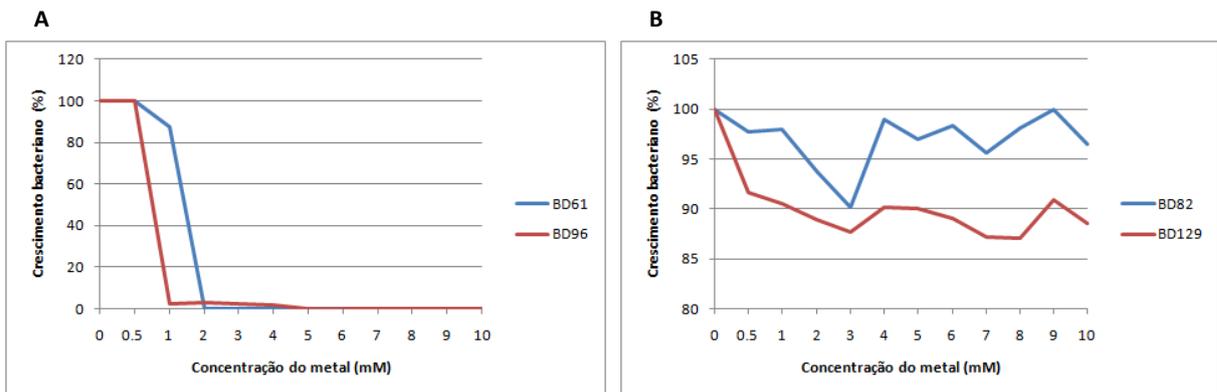
**Figura 46.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

#### • Arsênio

Todos os isolados do gênero *Stenotrophomonas* foram resistentes ao arsênio na forma de arsenato (Figura 47), no entanto, na forma de arsenito apenas os isolados BD82 e BD129 toleraram a maior concentração testada (10 mM) (Figura 48). Os MICs para o BD61 e BD96 foram respectivamente 1 mM e 4 mM.



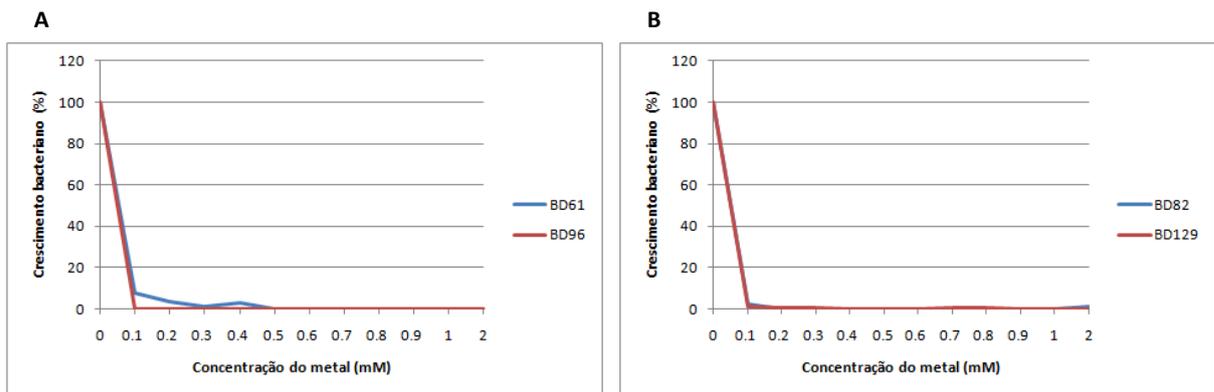
**Figura 47.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.



**Figura 48.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

- **Mercúrio**

Os isolados do gênero *Stenotrophomonas* foram sensíveis ao mercúrio, com MICs menores do 0,5 mM (Figura 49).



**Figura 49.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Stenotrophomonas* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD61 e BD96. B. Isolados BD82 e BD129.

O gênero *Stenotrophomonas* foi mais resistente aos metais cromo e arsênio, na forma de arsenato, e mais sensível ao mercúrio. Os isolados mais tolerantes a diversos metais foram o BD82 e BD129, enquanto o menos tolerante foi o BD96.

Estudos de tolerância a metais pesados com o gênero *Stenotrophomonas* são relativamente comuns na literatura. Uma linhagem de *Stenotrophomonas maltophilia*, isolada de uma área contaminada com metais pesados nos Estados Unidos foi utilizada num trabalho de comparação entre duas bactérias resistentes a metais. O MIC para essa *Stenotrophomonas* foi de 5 mM para o zinco e 5 mM para o cobre (Holmes et al., 2009). Além disso, o MIC obtido para o cromo foi de 8 mM (Holmes et al., 2009), enquanto uma *Stenotrophomonas* sp., isolada de solo contaminado com metais pesados em Taiwan, apresentou um MIC de 2,5 mM (Chien et al., 2007). Outra *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm 777) apresentou um MIC para o zinco de 4 mM, 5 mM para cobre e 10 mM para o níquel (Pages et al., 2008). Ainda o genoma da linhagem *Stenotrophomonas maltophilia* (K279a) foi sequenciado e sua anotação revelou a presença de regiões que codificam genes envolvidos na resistência de metais, como o gene *czc*, envolvido na resistência de zinco, cobalto e cádmio e dos *operons cop* e *cus*, envolvidos no metabolismo e homeostase de cobre (Rocco et al., 2009). Os isolados das torres da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* apresentaram maior resistência ao metal zinco e cromo do que as linhagens descritas na literatura. Além dos MICs terem sido maiores no caso do zinco, as concentrações aonde o crescimento foi em torno de 50% também foram maiores (7 mM). Os isolados das torres, da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, também apresentaram resistência ao metal cobre, inclusive maior do que as linhagens descritas na literatura, enquanto que para o metal níquel a resistência foi semelhante a encontrada por Pages et al. (2008) na linhagem Sm 777.

Embora algumas linhagens de *Stenotrophomonas maltophilia* possam apresentar genes de resistência ao cobalto, essa característica parece ser bem variável entre os

membros dessa espécie, assim como a resistência que eles possuem. Os resultados obtidos com os isolados das torres de transmissão, por si só, mostram um pouco da variação existente na resistência ao cobalto entre os membros dessa espécie. No caso do cobalto, mesmo o isolado que apresentou o menor MIC (1 mM) foi mais resistente do que a linhagem Sm 777 utilizada por Pages et al. (2008), que tolerou apenas 0,1 mM.

A resistência ao arsênio pelo gênero *Stenotrophomonas* já foi estudada por vários autores. O sequenciamento e anotação do genoma da linhagem K279a de *Stenotrophomonas maltophilia* revelaram a presença de regiões que codificam genes envolvidos na resistência de metais e uma região que carrega o operon *ars*, envolvido na resistência de arsênio, foi encontrada, indicando a provável tolerância a esse semimetal (Rocco et al., 2009). De fato, dentre muitas bactérias isoladas do solo de uma região altamente contaminada com arsênio na China, foi identificada uma bactéria do gênero *Stenotrophomonas* capaz de resistir a mais de 20 mM de arsenito (Cai et al., 2009).

Outra bactéria do gênero *Stenotrophomonas*, identificada como *S. maltophilia*, foi isolada de uma área contaminada com metais pesados nos Estados Unidos e apresentou um MIC para o arsenito de 14 mM (Holmes et al., 2009). Assim como na literatura, dois isolados das torres também apresentaram MICs altos para o arsenito (10 mM), no entanto como a maior concentração testada foi a de 10 mM, é impossível dizer se esses isolados são mais resistentes do que os descritos na literatura, sendo necessária a realização de testes em maiores concentrações.

Na linhagem de *Stenotrophomonas maltophilia* (K279a), o sequenciamento do genoma também revelou a presença de regiões que codificam genes envolvidos na resistência de outros metais, dentre eles, genes envolvidos na resistência do mercúrio (Rocco et al., 2009). Apesar disso, outros trabalhos mostram que o gênero *Stenotrophomonas* não é muito resistente ao mercúrio. Uma linhagem de *Stenotrophomonas maltophilia*, isolada de uma área contaminada com metais pesados nos Estados Unidos apresentou um MIC para metal mercúrio de 0,25 mM (Holmes et al., 2009). Outra *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm 777) apresentou um MIC ainda menor, de 0,05 mM para o mercúrio (Pages et al., 2008). Com os isolados das torres de transmissão também não foi diferente, o MIC não passou de 0,4 mM, sendo os isolados, portanto, considerados sensíveis a esse metal.

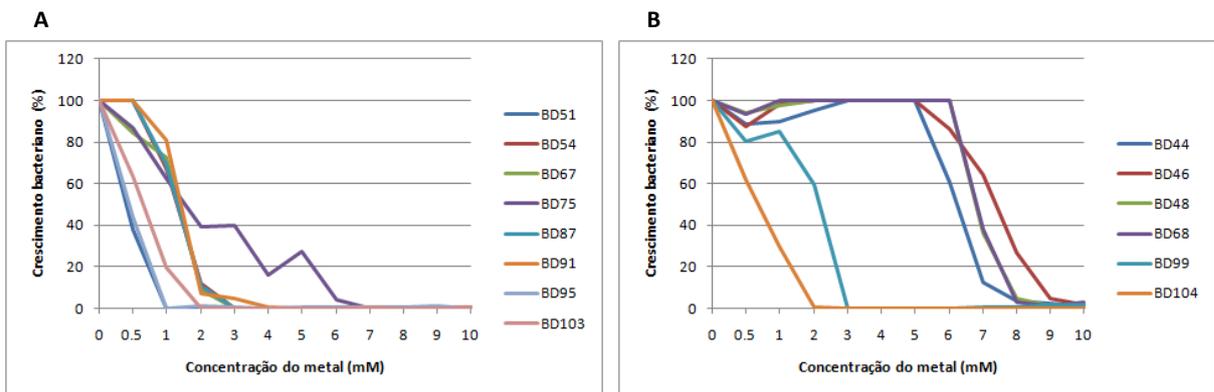
### **5.3.6 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Pseudomonas***

Os 14 isolados do gênero *Pseudomonas* (BD44, BD46, BD48, BD51, BD54, BD67, BD68, BD75, BD87, BD91, BD95, BD99, BD103 e BD104) foram avaliados em duplicatas e os isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104 foram selecionados para repetição

dos testes em triplicatas. A maioria dos isolados foram identificados apenas em nível de gênero.

### • Zinco

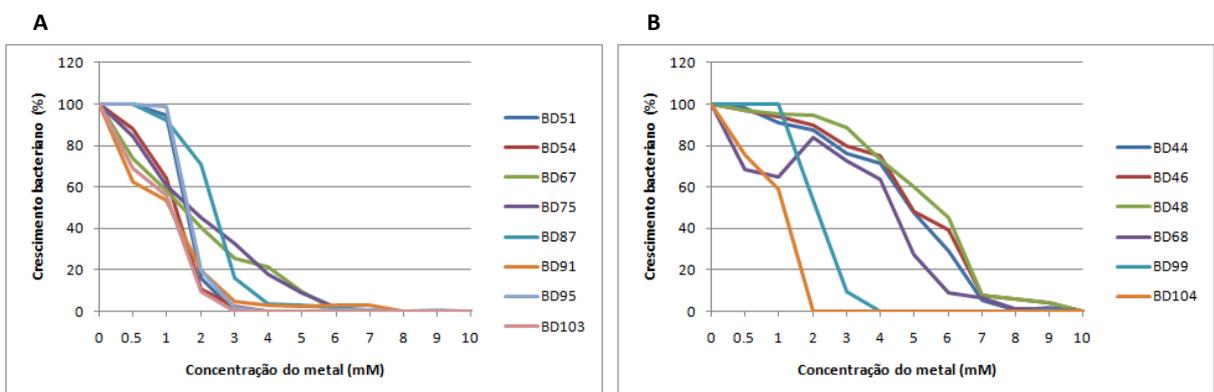
Os isolados do gênero *Pseudomonas* apresentaram uma grande variação quanto a resistência ao metal zinco. Enquanto os isolados BD51 e BD95 só cresceram na menor concentração testada (0,5 mM), os isolados BD44, BD46, BD48 e BD68 resistiram a 10 mM, porém com crescimento celular menor do que 3% (Figura 50).



**Figura 50.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

### • Níquel

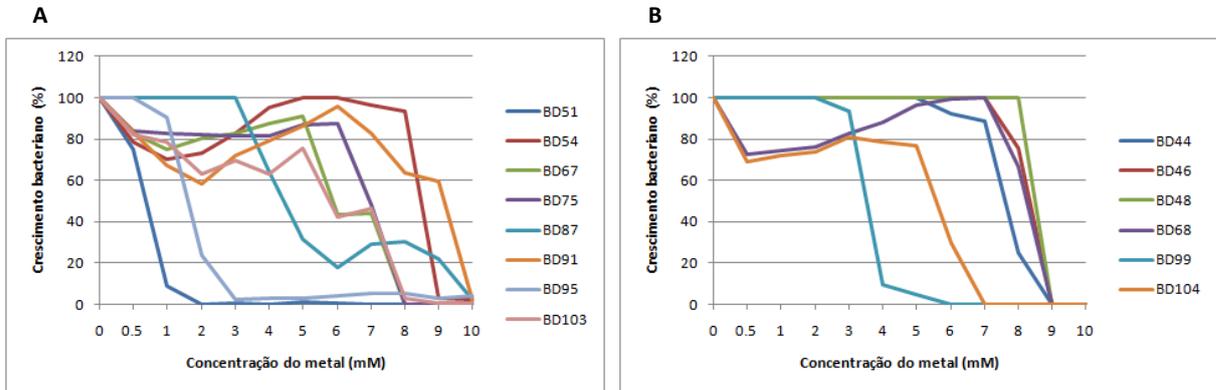
Entre os isolados das torres houve variação quanto à tolerância ao metal níquel. Nenhum isolado conseguiu crescer na maior concentração testada (10 mM), mas os isolados BD46 e BD48 resistiram a 9 mM, apesar do baixo crescimento (<4%). O BD104 foi o mais sensível, apresentando MIC de apenas 1 mM para o níquel (Figura 51).



**Figura 51.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

### • Cobre

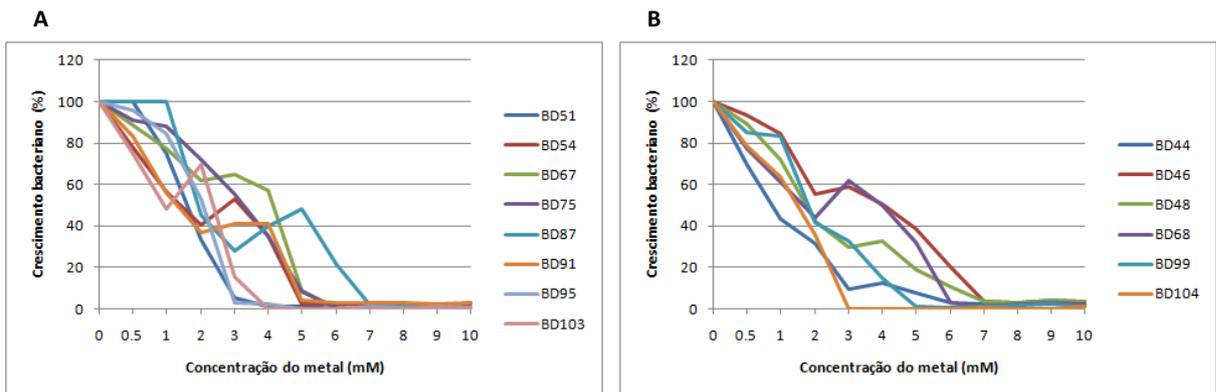
Quatro isolados (BD54, BD87, BD91 e BD95) conseguiram crescer na concentração de 10 mM de cobre, no entanto, o crescimento celular nessa concentração foi menor do que 4%. O BD51 foi o mais sensível a esse metal, com MIC de apenas 1 mM (Figura 52).



**Figura 52.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

### • Cobalto

A maioria dos isolados do gênero *Pseudomonas* conseguiu crescer em concentrações iguais ou maiores do que 5 mM de cobalto. Oito isolados (BD44, BD46, BD48, BD54, BD68, BD87, BD91 e BD99) toleraram a concentração de 10 mM, embora com baixo crescimento (< 4%) (Figura 53).

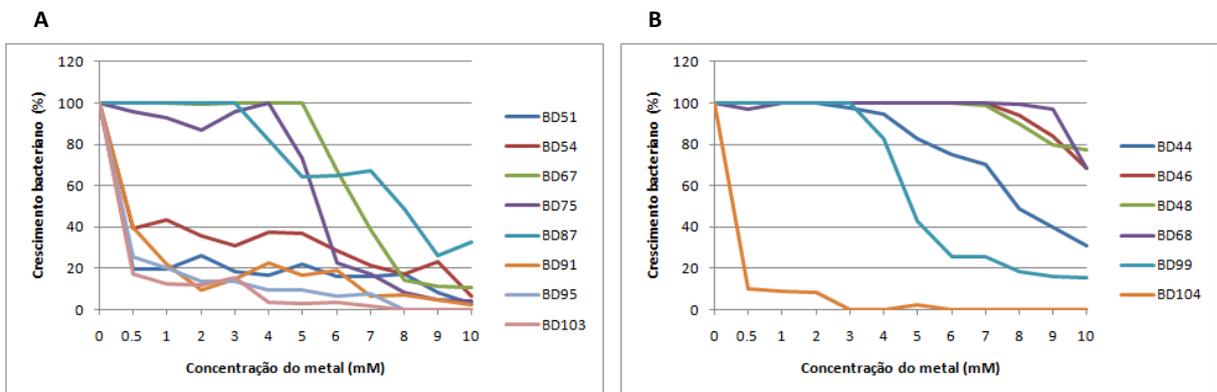


**Figura 53.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

### • Cromo

A maioria dos isolados cresceram na maior concentração testada (10 mM). Os isolados BD46, BD48 e BD68, não só foram resistentes a 10 mM, como também

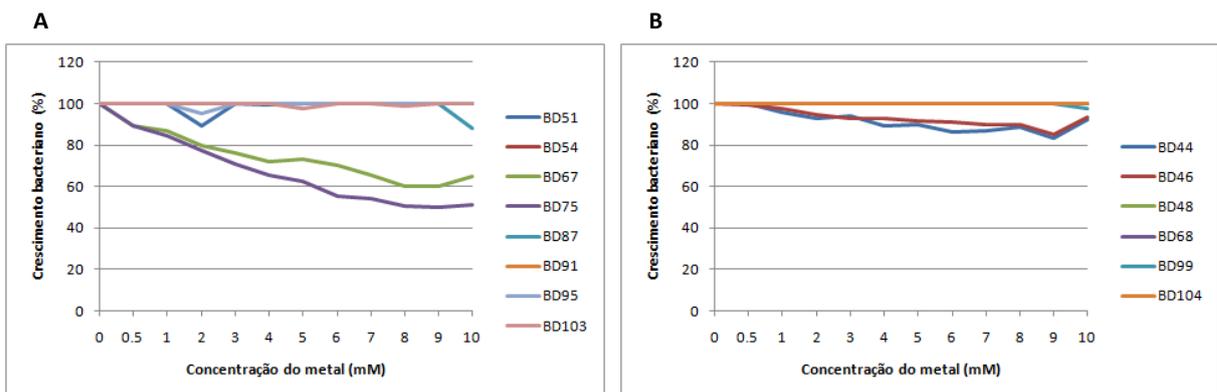
apresentaram crescimento alto na presença desse metal (> 68%). O BD104 foi o isolado mais sensível ao cromo, tolerando apenas 2 mM (Figura 54).



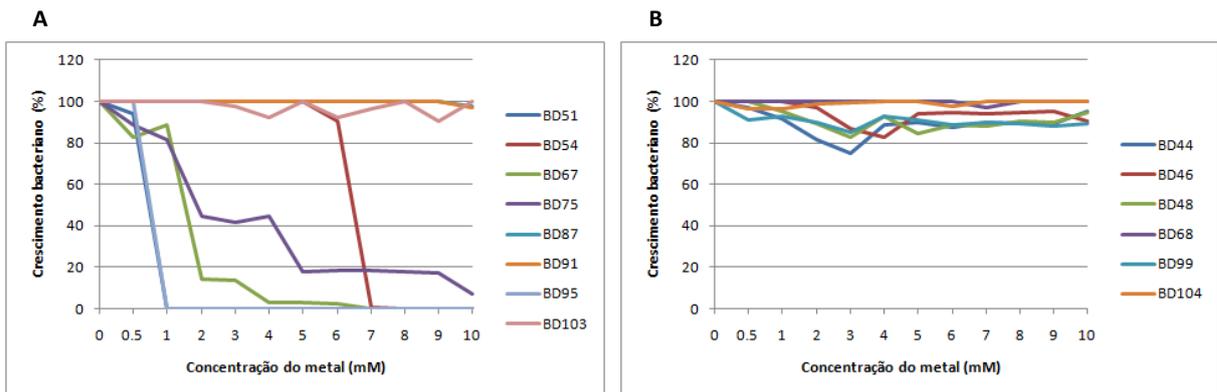
**Figura 54.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do ion cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

#### • Arsênio

Todos os isolados do gênero *Pseudomonas* cresceram sem dificuldades na concentração de 10 mM de arsenato (Figura 55). Já com o arsenito foi diferente, apesar da maioria dos isolados terem crescido na presença de 10 mM, o crescimento de alguns foi baixo em comparação com o arsenato, além de quatro isolados não terem crescido nessa concentração (BD51, BD54, BD67 e BD95) (Figura 56). Os isolados BD51 e BD95 só resistiram 0,5 mM de arsenito, sendo os mais sensíveis desse gênero para esse metal.



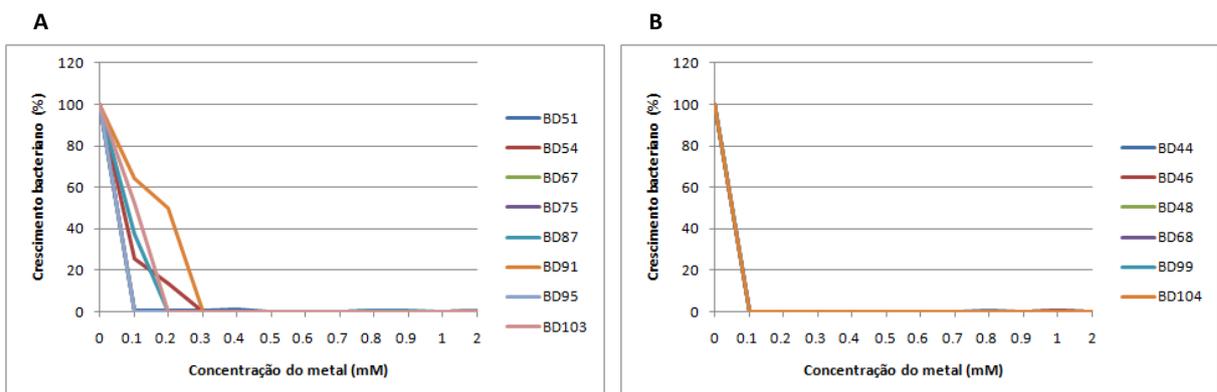
**Figura 55.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.



**Figura 56.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

#### • Mercúrio

O gênero *Pseudomonas* foi sensível ao metal mercúrio, e os isolados não resistiram a concentrações maiores do que 0,2 mM desse metal (Figura 57).



**Figura 57.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Pseudomonas* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD51, BD54, BD67, BD75, BD87, BD91, BD95 e BD103. B. Isolados BD44, BD46, BD48, BD68, BD99 e BD104.

Malik e Jaiswal (2000) relataram a resistência a metais pesados pelo gênero *Pseudomonas*. Neste trabalho, os autores isolaram *Pseudomonas* de solo tratado com águas residuais de indústria na Índia, as quais foram resistentes ao zinco, ao cobre, ao cromo e ao mercúrio. Os maiores MICs obtidos dentre as bactérias isoladas foram de 11,73 mM para o zinco, 18,7 mM para o cobre, 6 mM para o cromo e 0,73 mM ao mercúrio (Malik e Jaiswal, 2000). Outros autores também evidenciaram resistência a outros metais, tais como níquel e cobalto, além dos já mencionados (Hassan et al., 2008; Alisi et al., 2009; Ali et al., 2009; Zeng et al., 2010).

Hassan et al. (2008) recuperaram um isolado de águas residuais no Egito, identificado como *Pseudomonas aeruginosa*, cuja tolerância a vários metais pesados foi

testada. Os MICs obtidos foram de 9,2 mM para o zinco, 6,8 mM para o níquel, 6,3 mM para o cobre, 5,9 mM para cobalto e 6,0 mM para o cromo. Estes valores são considerados altos quando comparados com os resultados obtidos por Ali et al. (2009), cuja resistência da linhagem de *P. aeruginosa* isolada de efluentes de indústria têxtil apresentou um MIC baixo para o zinco (0,45 mM), níquel (0,51 mM), cobre (0,52 mM) e cromo (0,34 mM).

Outras três espécies de *Pseudomonas*; *P. jessenii*, *P. resinovorans* e *P. fluorescens*, isoladas de uma área metalúrgica em Nápoles, Itália, e utilizadas em um estudo de biorremediação, apresentaram resistência ao zinco, níquel, cobre, cobalto e cromo (Alisi et al., 2009). As três linhagens apresentaram MICs variando entre 2,0 e 5,0 mM para zinco, 0,5 a 2,0 mM para o níquel, 1,0 a 4,0 mM para o cobre, 0,5 a 2 mM para o cobalto e, finalmente, 0,5 para o cromo.

Ainda, Zeng et al. (2010) isolaram uma linhagem de solo poluído com metais pesados na China, identificada como *P. aeruginosa*, que apresentou um MIC de 1,2 mM para o zinco, 1,29 mM para o cobre e 0,75 mM para o cobalto (Zeng et al., 2010).

Assim como na literatura, os isolados das torres de transmissão também apresentaram uma grande variação quanto a resistência ao metal zinco. Quatro isolados (BD44, BD46, BD48 e BD68) conseguiram crescer na concentração de 10 mM, no entanto, como essa foi a maior concentração testada, é impossível afirmar que foram menos resistentes do que as linhagens isoladas na Índia ou na Turquia. Além disso, nos exemplos citados acima foi utilizado meio sólido nos testes, o que dificulta ainda mais a comparação com os resultados obtidos nesse trabalho.

Ainda, nossos resultados revelam que algumas linhagens isoladas de torres de transmissão foram mais resistentes ao níquel e cobalto quando comparadas com a literatura, exceto quando comparada a linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de amostras de solo, água e sedimento de parques industriais na Nigéria, cujo MIC para níquel foi de 15 mM e para cobalto de 10 mM (Oyetibo et al., 2009).

Em relação ao cromo, os isolados das torres também foram muito resistentes, assim como algumas linhagens descritas na literatura. Uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de amostras de solo, água e sedimento de parques industriais na Nigéria, apresentou um MIC alto para cromo, de 12 mM (Oyetibo et al., 2009), assim como uma bactéria isolada do Mar Mediterrâneo, na costa da Turquia e identificada como *Pseudomonas* sp., que também apresentou um MIC de 12 mM para o cromo (Matyar et al., 2010). Como a maior concentração utilizada neste experimento foi 10 mM, é impossível dizer se os isolados das torres foram menos resistentes do que os relatados na literatura.

Os resultados encontrados com os isolados das torres confirmam uma característica que parece ser relativamente comum no gênero *Pseudomonas*: a resistência ao arsênio. Uma linhagem de *Pseudomonas* isolada de solo conseguiu crescer na concentração de 275

mM de arsenato e 10 mM de arsenito (Jackson et al., 2005). Dentre muitas bactérias isoladas do solo de uma região altamente contaminada com arsênio na China, foi identificada uma bactéria do gênero *Pseudomonas* capaz de resistir a concentrações maiores do que 20 mM de arsenito (Cai et al., 2009). Em outro trabalho, uma linhagem de *Pseudomonas putida*, isolada do oceano Índico, conseguiu crescer normalmente na presença de 10 mM de arsenito (Chen e Shao, 2009).

Trabalhos envolvendo o gênero *Pseudomonas* e resistência ao mercúrio são comuns na literatura. Em um estudo sobre a comunidade bacteriana de crustáceos (*Porcellio scaber*) de ambiente poluído com mercúrio, foi encontrada, em sua maioria, bactérias que pertenciam a *Pseudomonas*, *Listeria* e *Bacteroidetes* (Lapanje et al., 2010). *Pseudomonas* resistentes ao mercúrio também foram encontradas em diferentes lugares da costa indiana (De et al., 2008). Vetriani et al. (2005) estudaram a relação entre a resistência ao mercúrio pelas bactérias e sua proximidade com os fluidos hidrotermais do oceano no leste do Pacífico. Entre essas bactérias, foi isolada uma *Pseudomonas*, que, no entanto, só resistiu a 0,075 mM de mercúrio. Já uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de amostras de solo, água e sedimento de parques industriais na Nigéria, apresentou um MIC alto para mercúrio, de 1 mM (Oyetibo et al., 2009).

Pelos resultados obtidos neste trabalho e pelos dados da literatura pode-se perceber que a resistência ao metal mercúrio não é muito comum mesmo em bactérias resistentes a outros metais.

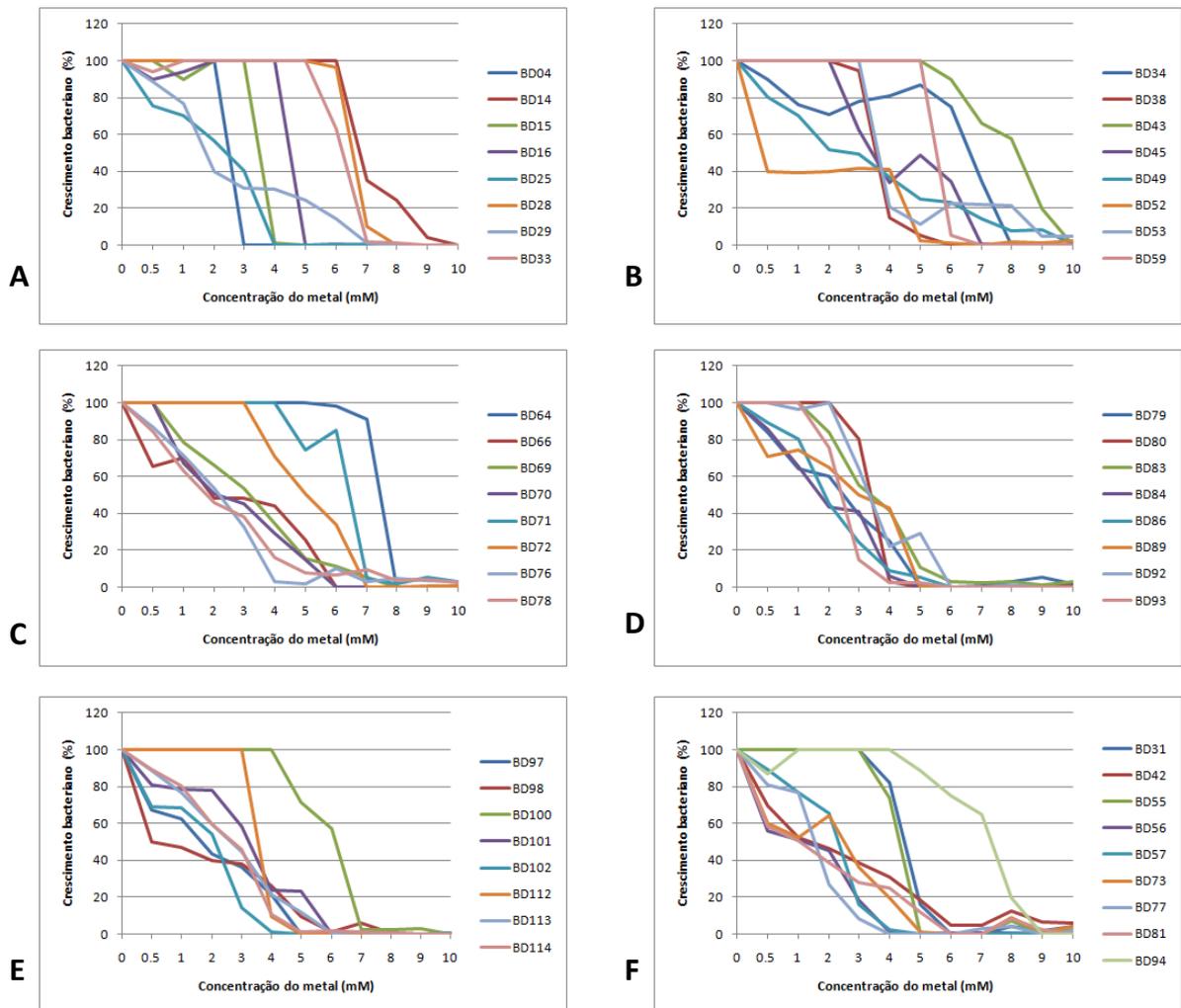
O gênero *Pseudomonas* foi mais resistente ao cromo e arsenato, embora tenha sido bem resistente também ao arsenito. O metal mais tóxico para esse gênero foi o mercúrio. Os isolados mais resistentes foram BD44, BD46 e BD48, e o isolado menos resistente foi o BD51 (*Pseudomonas fulva*).

### **5.3.7 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Acinetobacter***

Foram avaliados em duplicatas os 49 isolados do gênero *Acinetobacter* (BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29, BD31, BD33, BD34, BD38, BD42, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53, BD55, BD56, BD57, BD59, BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD73, BD76, BD77, BD78, BD79, BD80, BD81, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92, BD93, BD94, BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114), identificados na sua maioria apenas em nível de gênero. Os isolados BD25, BD29, BD49, BD56, BD57, BD113 e BD114 foram identificados como *Acinetobacter calcoaceticus*, os isolados BD31, BD33, BD34, BD38 e BD66 como *Acinetobacter bereziniae* e o BD98 como *Acinetobacter junii*. Nove isolados (BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94) foram escolhidos para a repetição dos testes em triplicatas.

- Zinco

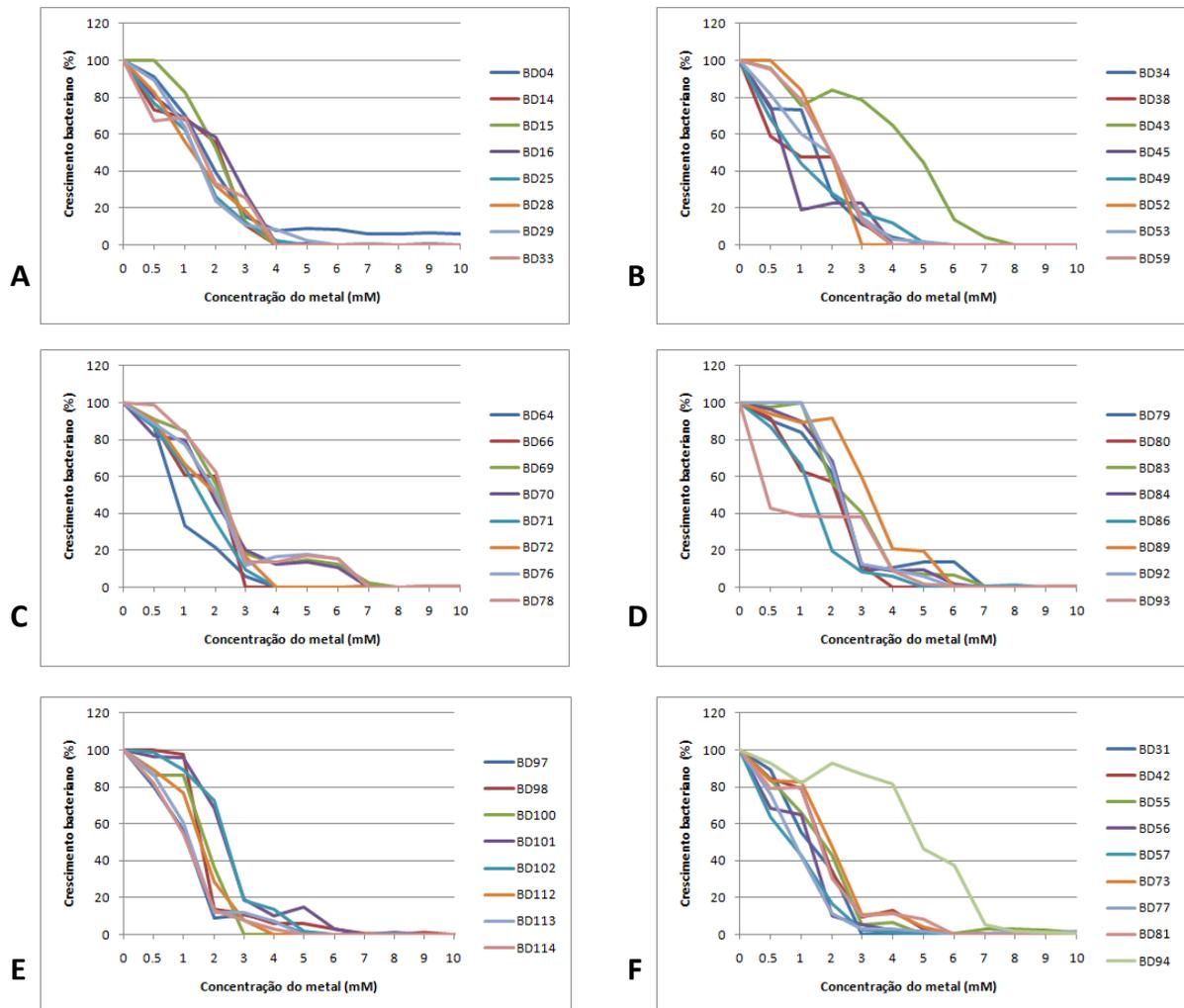
O gênero *Acinetobacter* apresentou uma grande variação quanto a resistência ao zinco. Com exceção dos isolados BD04 (MIC = 2 mM), BD25 e BD77 (MIC = 3 mM), os isolados cresceram em concentrações iguais ou maiores do que 4 mM de zinco. Os isolados BD42, BD53, BD71, BD76, BD78 e BD83 toleraram a concentração de 10 mM, porém o crescimento foi baixo (< 6%) (Figura 58).



**Figura 58.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

- Níquel

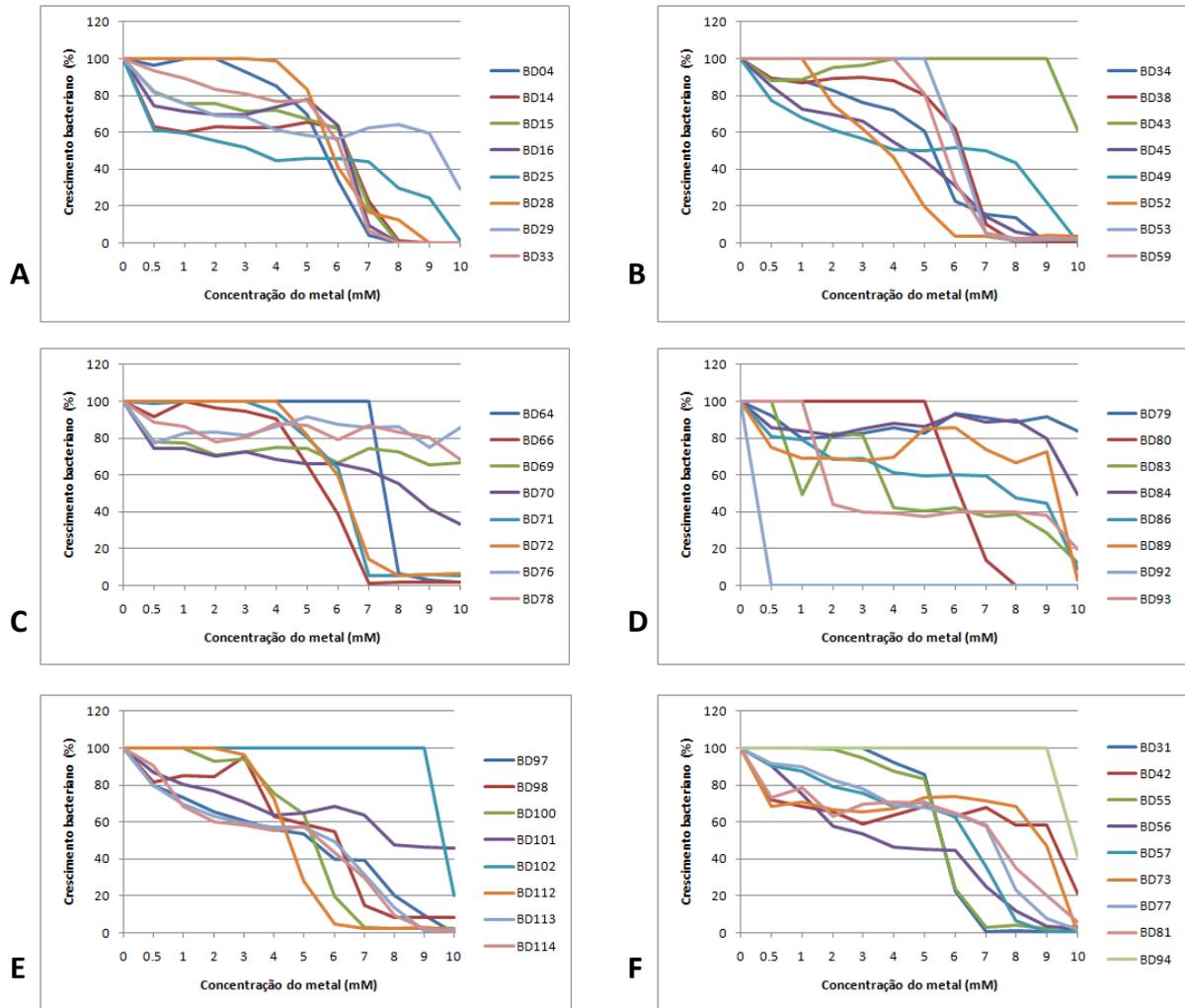
A maioria dos isolados do gênero *Acinetobacter* apresentou MIC entre 3 e 6 mM. Os isolados mais resistentes foram o BD04 e BD94 que toleraram 10 e 9 mM de níquel, respectivamente, embora com baixo crescimento (<6%) (Figura 59).



**Figura 59.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

#### • Cobre

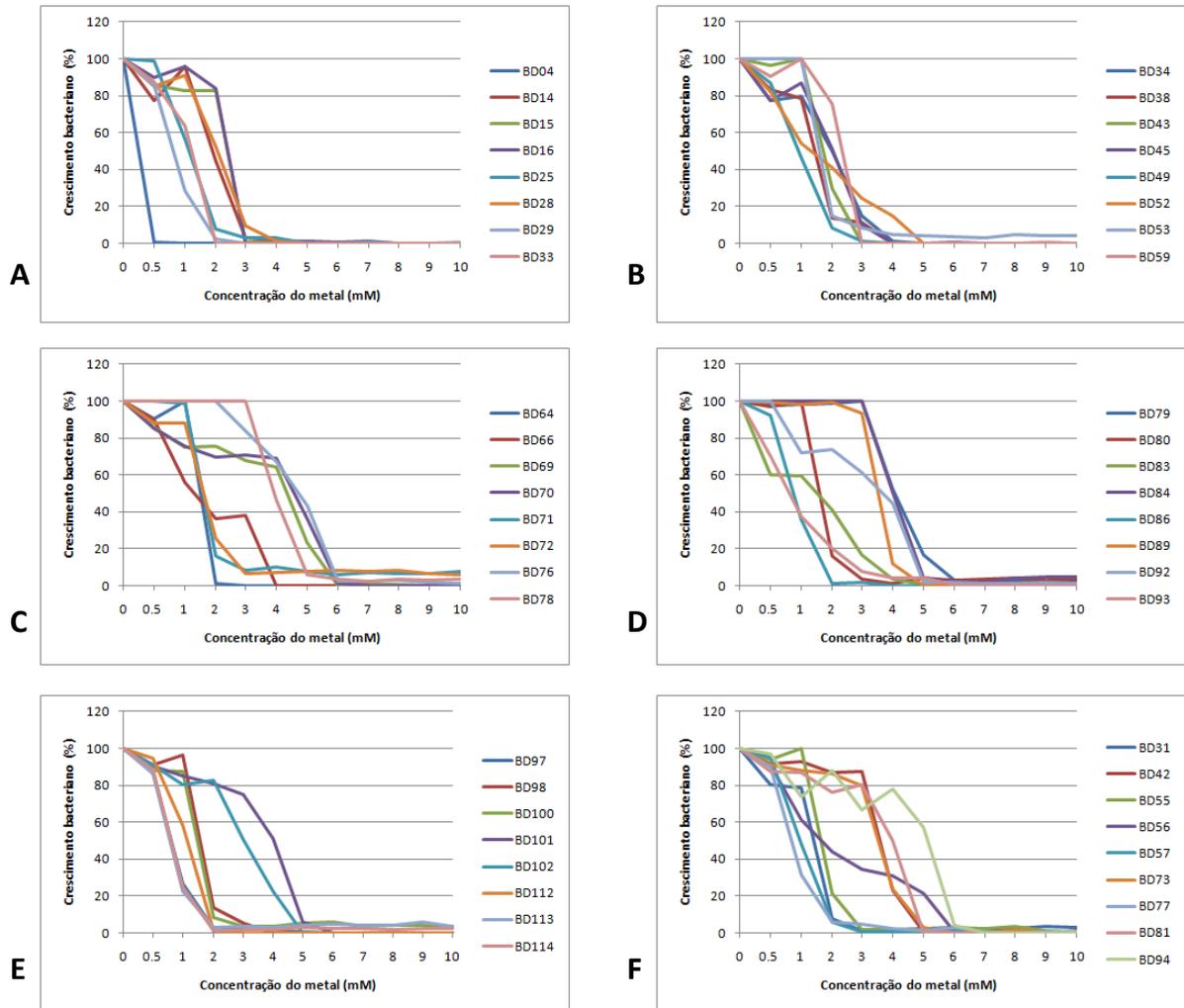
O gênero *Acinetobacter* se mostrou resistente ao cobre, conseguindo crescer em concentrações iguais ou maiores do que 6 mM, sendo a maioria resistente a 10 mM (Figura 60). A única exceção foi o isolado BD92 que não conseguiu crescer nem na menor concentração testada (0,5 mM).



**Figura 60.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

#### • Cobalto

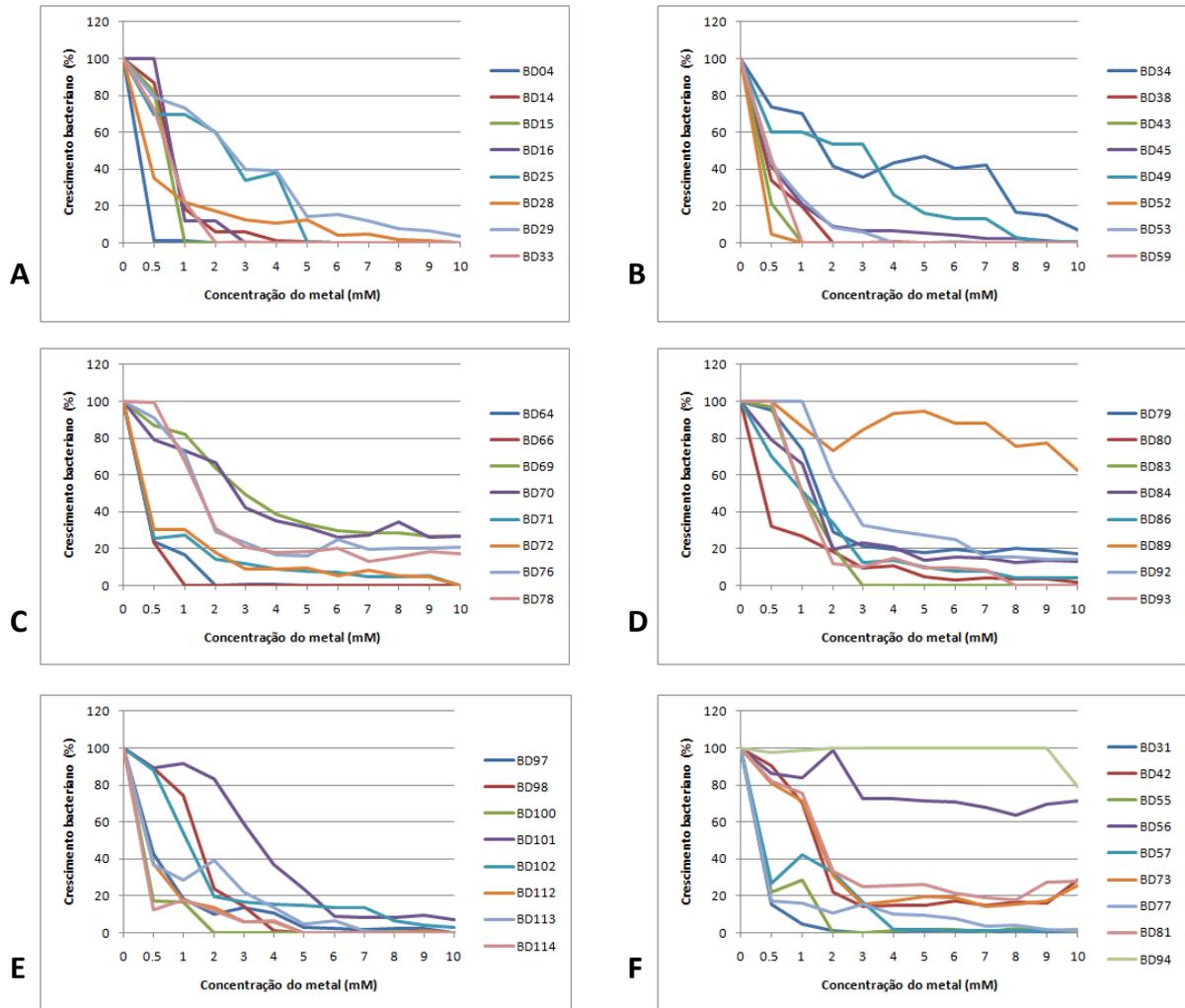
O gênero *Acinetobacter* apresentou uma grande variação quanto a resistência ao metal cobalto, variando de 0,5 mM até 10 mM. Catorze isolados conseguiram crescer na presença de 10 mM de cobalto, porém o crescimento foi baixo (< 8%). Os isolados mais sensíveis foram o BD04 e o BD33 que toleraram apenas 0,5 e 1 mM, respectivamente (Figura 61).



**Figura 61.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

#### • Cromo

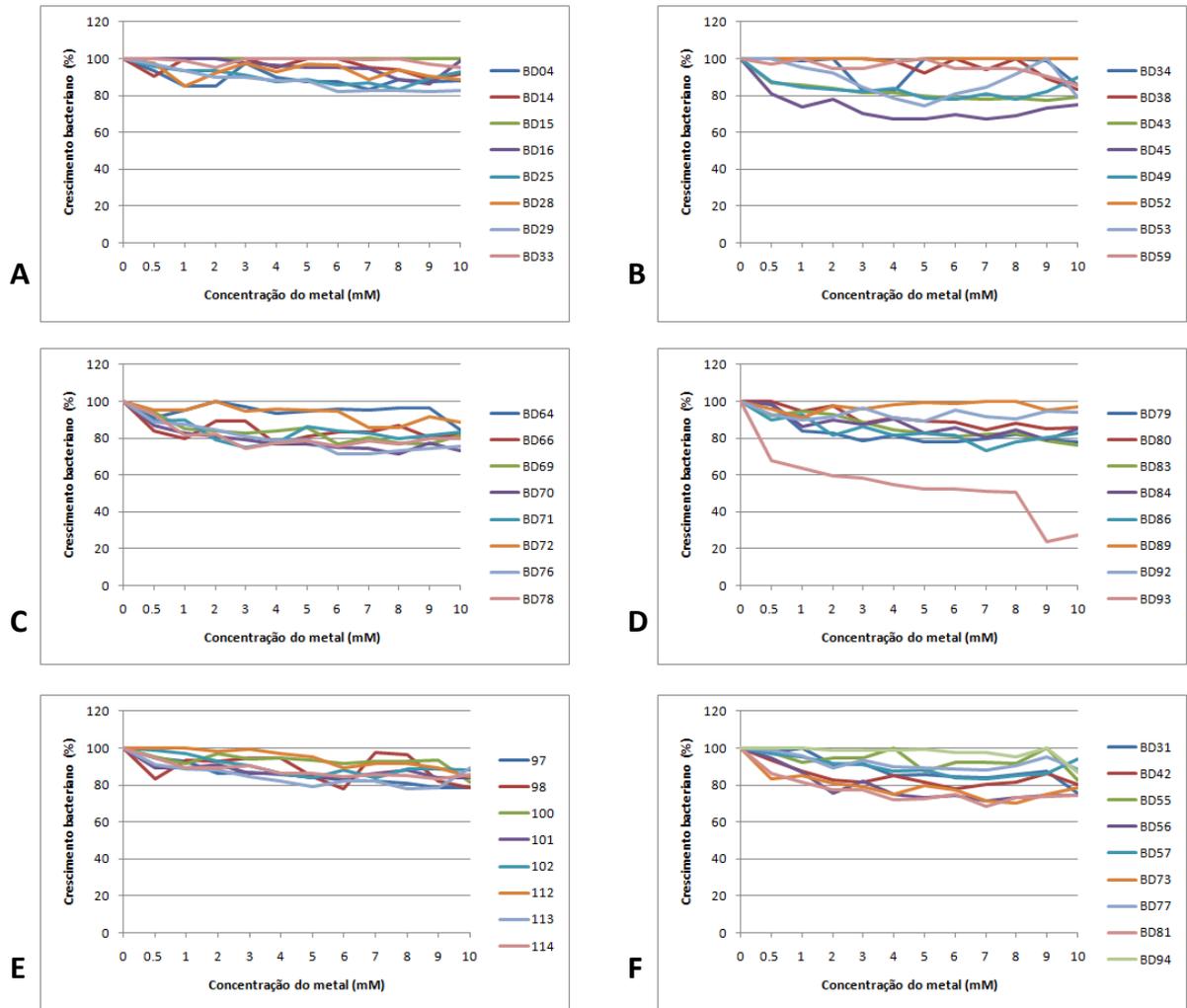
Dos quarenta e nove isolados do gênero *Acinetobacter*, vinte resistiram a 10 mM de cromato. Dentre esses, os isolados BD56, BD89 e BD94 se destacaram, pois apresentaram crescimento maior do que 60% nessa concentração. Os isolados mais sensíveis foram os BD15, BD43, BD52, BD59 e BD66, que só toleraram 0,5 mM de cromato (Figura 62).



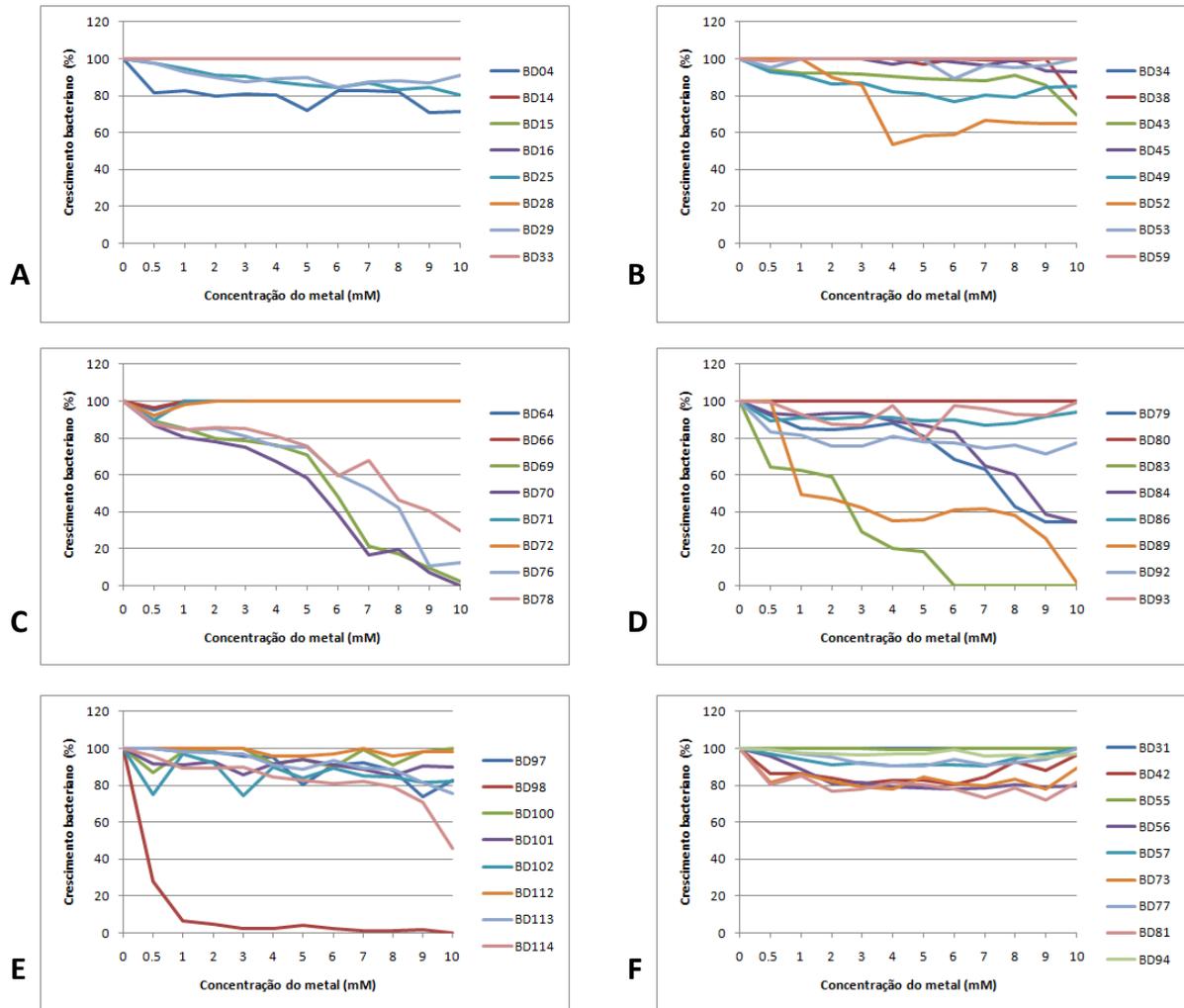
**Figura 62.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

#### • Arsênio

O gênero *Acinetobacter* foi muito resistente ao arsênio, tanto na forma de arsenato, quanto na forma de arsenito. Todos os isolados cresceram na maior concentração testada (10 mM) de arsenato e com exceção do BD93, todos apresentaram crescimento maior do que 70% nessa concentração (Figura 63). A maioria dos isolados também apresentou crescimento alto na presença de 10 mM de arsenito (Figura 64). O isolado mais sensível foi o BD83 que só resistiu a 5 mM de arsenito.



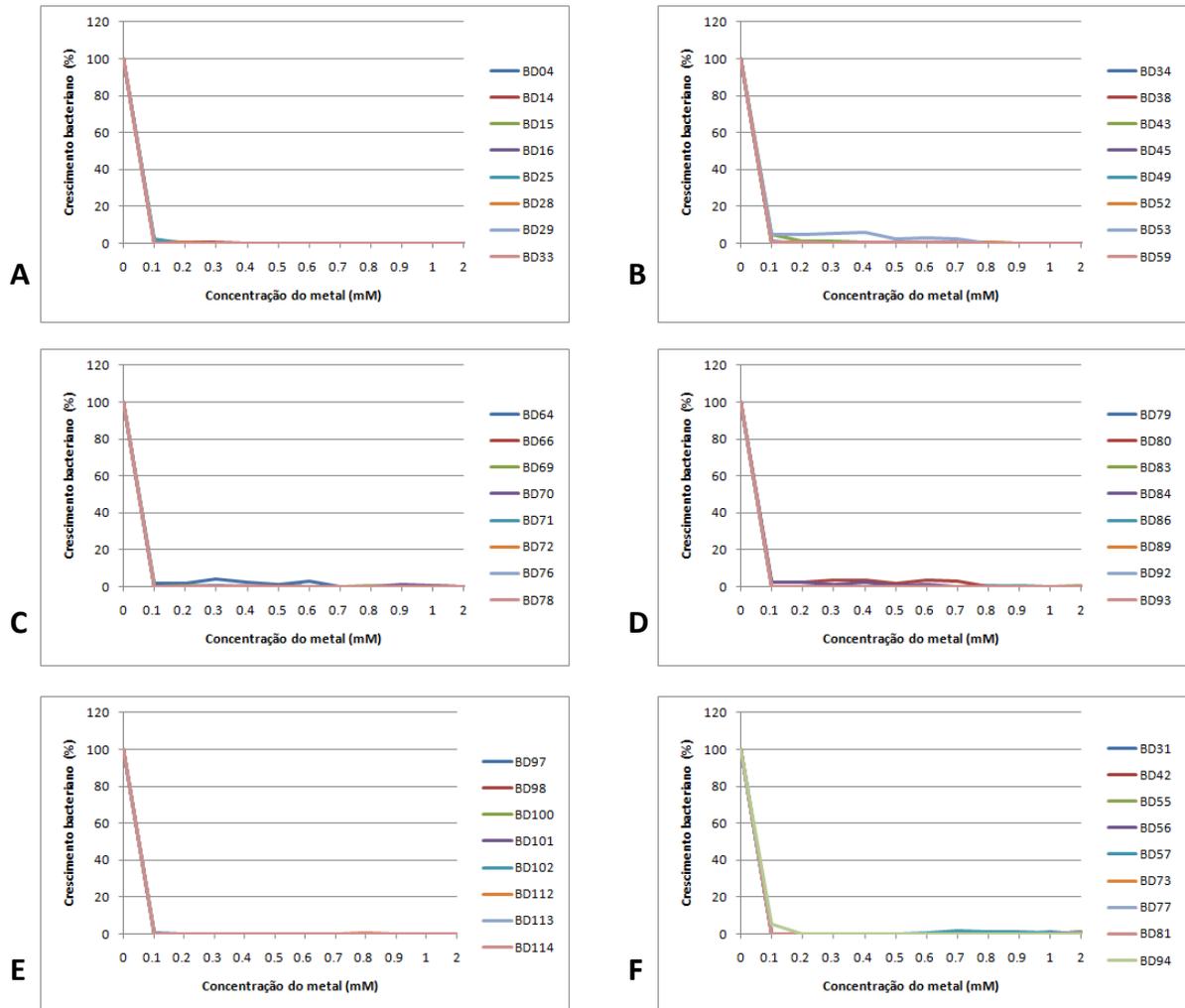
**Figura 63.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.



**Figura 64.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{AsO}_2$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

#### • Mercúrio

O gênero *Acinetobacter* foi sensível ao metal mercúrio. Apenas quatro isolados (BD43, BD53, BD64 e BD80) cresceram em concentrações maiores do que 0,1 mM, sendo o BD53 e o BD80 os mais resistentes, com MICs de 0,7 mM (Figura 65).



**Figura 65.** Crescimento celular dos isolados do gênero *Acinetobacter* frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). A. Isolados BD04, BD14, BD15, BD16, BD25, BD28, BD29 e BD33. B. Isolados BD34, BD38, BD43, BD45, BD49, BD52, BD53 e BD59. C. Isolados BD64, BD66, BD69, BD70, BD71, BD72, BD76 e BD78. D. Isolados BD79, BD80, BD83, BD84, BD86, BD89, BD92 e BD93. E. Isolados BD97, BD98, BD100, BD101, BD102, BD112, BD113 e BD114. F. Isolados BD31, BD42, BD55, BD56, BD57, BD73, BD77, BD81 e BD94.

Os isolados do gênero *Acinetobacter* de torres de transmissão de energia elétrica foram mais resistentes ao arsênio e ao cobre e mais sensíveis ao mercúrio.

Bhadara et al. (2006) isolaram uma bactéria do rio Torsa, na Índia, identificada como *Acinetobacter junii*, que apresentou resistência de 5,5 mM ao zinco, 6 mM ao níquel e 2,5 mM ao cobalto (Bhadra et al., 2006). Mais recentemente, Ali et al. (2009) também isolaram uma linhagem de *Acinetobacter* sp. a partir de efluentes de indústria têxtil no Paquistão cujo MIC foi de 7,8 mM para zinco e apenas de 0,51 mM para níquel (Ali et al., 2009). Alguns isolados das torres foram tão ou mais resistentes do que as duas linhagens descritas acima, quando avaliadas para resistência ao zinco. A maioria dos isolados das torres toleraram entre 3 e 6 mM de níquel, não diferindo muito das linhagens descritas na literatura. Por outro

lado, os isolados das torres variaram bastante quanto a resistência apresentada ao cobalto, com MICs de 0,5 a 10 mM. Destaque deve ser dado ao isolado BD98 (*Acinetobacter junii*) cuja resistência ao zinco foi de 7 mM, juntamente com a resistência ao níquel e cobalto de 6 mM e 10 mM, respectivamente, sendo mais resistente do que as linhagens dessa espécie descritas na literatura.

Em um trabalho sobre diversidade de bactérias endofíticas de plantas tolerantes ao cobre foram encontrados 12 gêneros de bactérias resistentes ao cobre incluindo o gênero *Acinetobacter* (Sun et al., 2010). A espécie *Acinetobacter johnsonii*, isolada de moedas circulantes na Alemanha e Portugal, teve sua resistência testada contra o metal cobre e apresentou um MIC de 3 mM (Santo et al., 2010). Assim como bactérias desse gênero já foram descritas como sendo resistentes ao cobre, os isolados das torres de energia elétrica também apresentaram resistência a esse metal, inclusive foram mais resistentes do que as bactérias encontradas na literatura.

Uma bactéria isolada de efluentes de corantes têxteis contendo cromo foi identificada como *Acinetobacter hemolyticus*, e apesar de isolada de um ambiente contaminado com cromo, tolerou apenas 0,3 mM desse metal (Pei et al., 2009). Já uma linhagem de *Acinetobacter junii*, isolada de amostras de solo, água e sedimento de parques industriais na Nigéria, apresentou um MIC para o cromo de 9 mM (Oyetibo et al., 2009). Assim como na literatura, a resistência ao cromo pelo gênero *Acinetobacter* foi variada nos experimentos com os isolados das torres, com MICs de 0,5 a 10 mM. O isolado BD98, identificado como *A. junii*, foi menos resistente do que a linhagem da Nigéria, apresentando um MIC de 4 mM.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os isolados pertencentes ao gênero *Acinetobacter* foram extremamente resistente ao arsênio. Dados da literatura também confirmam essa resistência. Dentre muitas bactérias isoladas do solo de uma região altamente contaminada com arsênio na China, foram identificados quatro isolados do gênero *Acinetobacter* capazes de resistir a concentrações maiores do que 20 mM de arsenito (Cai et al., 2009).

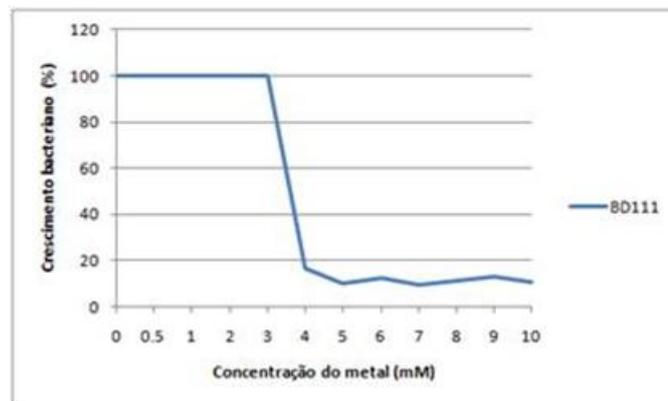
Uma linhagem de *Acinetobacter junii*, isolada de amostras de solo, água e sedimento de parques industriais na Nigéria, apresentou um MIC relativamente alto para mercúrio, de 1 mM (Oyetibo et al., 2009), diferentemente do isolado BD98, da mesma espécie, que não conseguiu crescer nem na menor concentração testada, sendo, portanto muito sensível ao mercúrio. Assim como o isolado BD98, o restante dos isolados do gênero *Acinetobacter* também foram muito sensíveis ao mercúrio, não tolerando concentrações acima de 0,7 mM.

### **5.3.8 Avaliação da resistência a metais pesados: gênero *Chryseobacterium***

Um único isolado, o isolado BD111, identificado como *Chryseobacterium defluvium*, foi avaliado frente às diferentes concentrações dos metais pesados. O isolado BD111 foi o único que não cresceu no meio mínimo TRIS, e, portanto, os testes de resistência a metais foram realizados no meio Luria broth em triplicata.

- **Zinco**

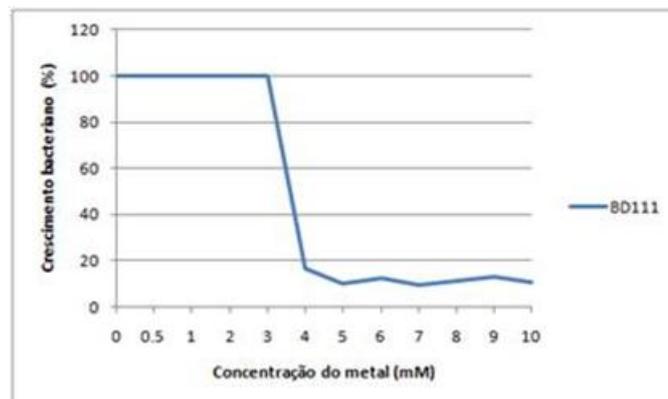
O isolado BD111 tolerou a concentração de 10 mM de zinco, com crescimento celular de 10, 83% (Figura 66).



**Figura 66.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon zinco ( $ZnCl_2$ ).

- **Níquel**

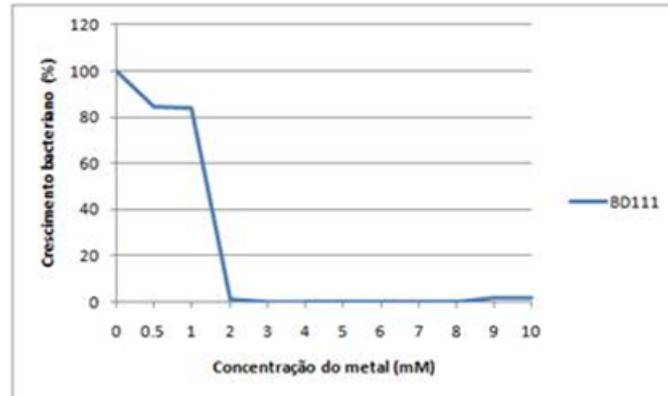
O isolado BD111 não foi resistente ao metal níquel não conseguindo crescer em concentrações maiores do que 1 mM (Figura 67).



**Figura 67.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon níquel ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ).

- **Cobre**

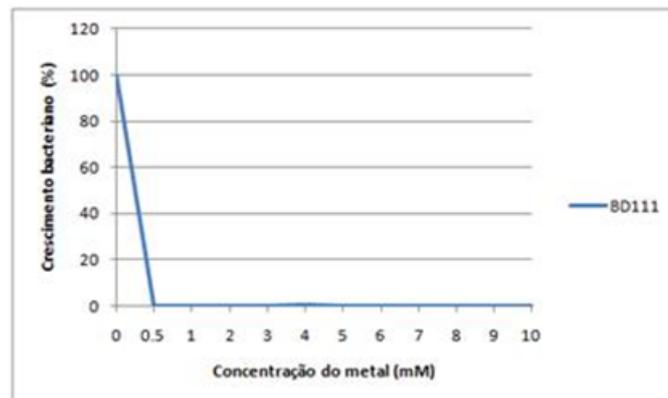
O isolado BD111 também não foi muito resistente ao metal cobre, apresentando MIC de apenas 2 mM (Figura 68).



**Figura 68.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

- **Cobalto**

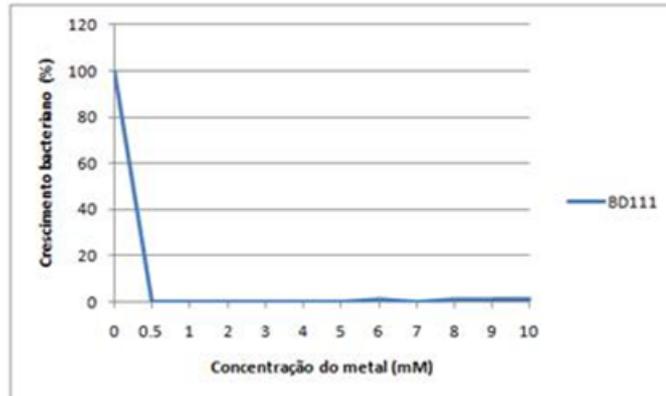
O isolado BD111 não conseguiu resistir nem na menor concentração (0,5 mM) de cobalto, sendo, portanto, considerado sensível a esse metal (Figura 69).



**Figura 69.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).

- **Cromo**

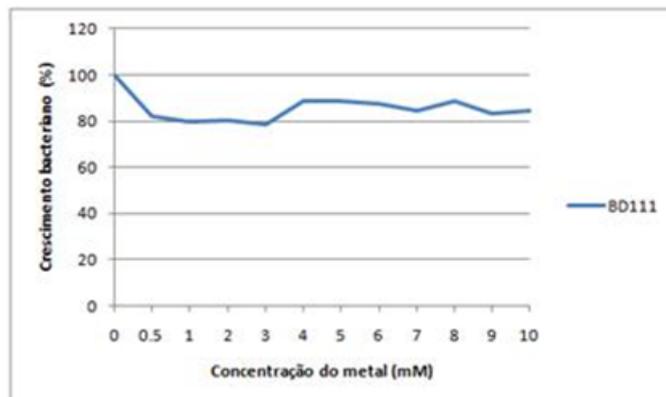
O isolado BD111 foi extremamente sensível ao metal cromo não resistindo nem a menor concentração testada (0,5 mM) (Figura 70).



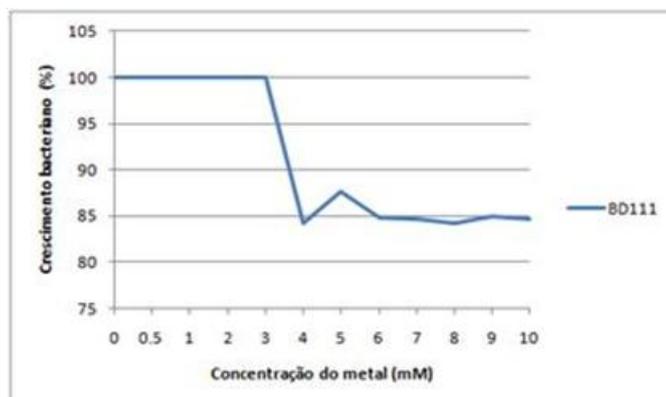
**Figura 70.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ).

- **Arsênio**

O isolado BD111 foi resistente ao semimetal arsênio, tanto na forma de arsenato, quanto na forma de arsenito, com MIC de 10 mM para ambas as formas e crescimento celular maior do que 80% nessa concentração (Figuras 71 e 72).



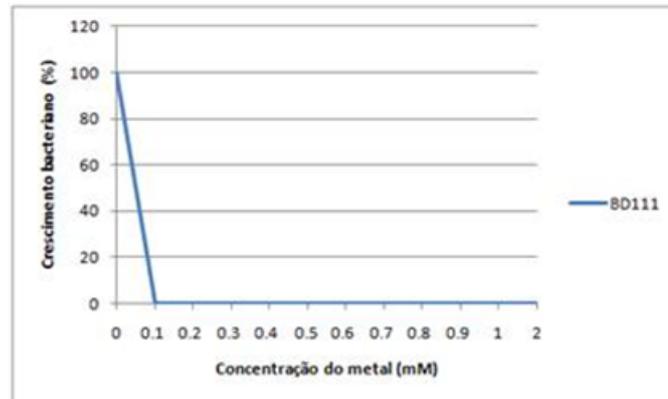
**Figura 71.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do arsenato de sódio ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ).



**Figura 72.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do arsenito de sódio ( $Na_2AsO_2$ ).

- **Mercúrio**

O isolado BD111 foi extremamente sensível ao metal mercúrio não conseguindo crescer nem na menor concentração testada (0,1 mM) (Figura 73).



**Figura 73.** Crescimento celular do isolado BD111, do gênero *Chryseobacterium*, frente às diferentes concentrações do íon mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ).

O gênero *Chryseobacterium*, representado pelo isolado BD111 (*Chryseobacterium defluvium*), apresentou maior resistência ao arsênio, tanto na forma de arsenato, quanto arsenito, seguido pelo metal zinco. Em contrapartida, foi mais sensível ao mercúrio, cobalto e cromo.

Estudos relacionando o gênero *Chryseobacterium* e a resistência a metais pesados não são muito comuns, porém a presença desse gênero em ambientes com alto teor de metais não é rara. Duas novas espécies de *Chryseobacterium* (*C.palustre* e *C.humii*) foram isoladas de sedimentos de uma área industrial de Portugal poluída com metais pesados (Pires et al., 2010), enquanto outra *Chryseobacterium* também foi isolada a partir de solo contaminado com metais pesados na Eslováquia (Karellová et al., 2011).

Em um estudo com bactérias isoladas de solo naturalmente constituído por altas concentrações de metais na Itália, foram isoladas bactérias resistentes ao níquel e entre elas, foi encontrado um representante do gênero *Chryseobacterium*, além de espécies de *Pseudomonas* e *Streptomyces* (Mengoni et al., 2001). A *Chryseobacterium* isolada da torre de transmissão de energia elétrica (BD111) resistiu a apenas 1 mM, porém a comparação com a *Chryseobacterium* isolada na Itália se torna impossível uma vez que não há informação da concentração de níquel que essa bactéria resistiu. No entanto, comparada aos outros gêneros avaliados neste trabalho, a *Chryseobacterium defluvium* (BD111) não pode ser considerada resistente a esse metal.

A resistência ao cobre pelo gênero *Chryseobacterium* também já foi relatada. Uma linhagem de *Chryseobacterium* sp., encontrada em um estudo sobre a diversidade bacteriana de um encanamento de cobre afetado pela corrosão, resistiu a concentração de 1 mM de cobre (Pavissich et al., 2010), assim como a linhagem S2 de *Chryseobacterium*

sp., isolada de efluente de curtume no Egito, que apresentou um MIC para o cobre de 1,5 mM (Zaki e Farag, 2010). A *Chryseobacterium defluvium* (BD111) também apresentou MIC baixo para o cobre (2 mM), corroborando com a pouca resistência encontrada na literatura a esse metal pelos representantes do gênero *Chryseobacterium*.

Diferentemente do cobre, o gênero *Chryseobacterium* apresenta tolerância a maiores concentrações de arsênio, principalmente na forma de arsenato. Uma *Chryseobacterium*, isolada de solo, foi extremamente resistente ao arsenato, resistindo a concentração de 100 mM, porém apresentou MIC de apenas 2 mM para o arsenito (Jackson et al., 2005). O isolado BD111 também foi resistente ao arsênio, tolerando a maior concentração testada, tanto de arsenato quanto de arsenito, porém como essa concentração foi de 10 mM, novos testes deverão ser realizados para descobrir o MIC verdadeiro desse isolado.

Sabe-se que não existem concentrações aceitáveis para determinar se um organismo é sensível ou tolerante a certo tipo de metal. Os estudos envolvendo os gêneros isolados nesse trabalho e a resistência apresentada por eles a determinados metais mostram a dificuldade de se estabelecer o grau de resistência das linhagens isoladas das torres de transmissão de energia elétrica, uma vez que tanto valores mais altos quanto valores mais baixos do que os obtidos neste trabalho são considerados, de alguma forma, resistentes.

No geral, todos os gêneros isolados das torres de transmissão de energia elétrica foram resistentes a mais de um metal. O metal que menos afetou o crescimento dos isolados das torres foi o cromo, um metal altamente tóxico. A maioria dos isolados cresceu na presença de 10 mM. Apenas alguns isolados dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* apresentaram MICs baixos para esse metal, além do gênero *Chryseobacterium* que não resistiu à menor concentração testada (0,5 mM).

O arsênio, na forma de arsenato também foi muito tolerado pelos isolados. Com exceção do gênero *Bacillus* e de alguns isolados do gênero *Lysinibacillus*, todos conseguiram crescer na concentração de 10 mM. Já o arsênio, na forma de arsenito foi bem menos tolerado pelos isolados, o que já era esperado, uma vez que o arsenito é mais tóxico do que o arsenato. Mesmo o arsenito sendo mais tóxico que o arsenato, vários isolados conseguiram crescer na presença de 10 mM. O único gênero que não apresentou resistência nessa concentração foi o *Bacillus*.

Alguns isolados pertencentes aos gêneros *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* também foram muito resistentes ao cobre, apresentando crescimento alto mesmo nas concentrações de 10 e 9 mM. Os metais zinco, níquel e cobalto apresentaram grandes variações quanto a resistência pelos isolados das torres, mesmo dentro de um mesmo gênero. O gênero *Exiguobacterium* foi muito sensível ao zinco, não conseguindo crescer em concentrações maiores do 0,5 mM. Os gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* apresentaram MICs

de 0,5 a 9 mM (apenas um isolado nessa concentração), mas no geral foram menos resistentes do que os outros gêneros.

Para o metal cobalto, com exceção do gênero *Chryseobacterium*, nenhum outro gênero foi extremamente resistente ou totalmente sensível, apresentando dentro de cada gênero, níveis diferentes de resistência. Vários isolados conseguiram crescer na presença de 10 mM, porém nenhum com crescimento celular acima de 8% nessa concentração. A resistência ao níquel também variou muito entre os isolados, tendo destaque o gênero *Serratia*, que no geral foi o mais resistente a esse metal, com MICs iguais ou maiores do que 7 mM para todos os isolados. O mercúrio foi disparado o metal mais tóxico para os isolados das torres, que em sua maioria não conseguiram crescer em concentrações maiores do que 0,1 mM.

Ao longo da evolução, os micro-organismos desenvolveram vários mecanismos de resistência aos metais pesados e alguns deles já foram descritos nos gêneros encontrados neste trabalho. As bactérias encontraram várias formas de transformar o arsênio, incluindo oxidação do arsenito, redução do arsenato (citoplasma e respiração) e metilação do arsenito. Dentre esses mecanismos, a oxidação do arsenito já foi descrita no gênero *Pseudomonas*. Uma bactéria isolada do solo de uma região altamente contaminada com arsênio na China, capaz de tolerar 20 mM de arsenito, possui a capacidade de oxidar arsenito em arsenato. Constatou-se que essa *Pseudomonas* possuía tanto o gene codificante para a enzima arsenito oxidase, quanto os genes que codificam para proteínas de transporte de arsenito (Cai et al., 2009). A presença dos genes *arrA* e *arrB*, que codificam as duas subunidades de uma enzima arsenato redutase, já foi descrita no *Bacillus selenitireducens* MSL10 (Afkar et al., 2003).

As bactérias também desenvolveram diferentes estratégias de resistência ao cromo, incluindo efluxo e redução de cromato. O efluxo de cromato é mediado pela proteína transportadora de cromato, *ChrA*, pertencente a família de proteínas *CHR* (chromate resistance). O gene *chra* que codifica essa proteína já foi encontrado no *Bacillus cereus* SJ1 (He et al., 2010) e no plasmídeo pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes et al., 1990). Muitas bactérias podem reduzir Cr (VI) para a forma menos tóxica Cr (III), como mecanismo de defesa contra os efeitos tóxicos desse ânion. A bactéria *Exiguobacterium* sp. ZM-2, isolada no norte da Índia a partir de amostras de solo irrigado com efluentes de curtume, reduziu completamente 500 µM Cr(VI) em 56 horas (Alam e Malik, 2008). Outra *Exiguobacterium* sp., isolada de solo contaminado com cromo, também foi capaz de reduzir cromato (Sarangi e Krishnan, 2008). Várias espécies de *Bacillus* também possuem essa capacidade. Um *Bacillus megaterium*, isolado de uma área de minério na China, reduziu quase 100% de Cr(VI) em 24 horas (Cheng e Li, 2009), enquanto o *Bacillus* sp. ES29, isolado de solo contaminado com dicromato no Brasil, conseguiu reduzir aerobicamente

90% de Cr(VI) em apenas 6 horas (Camargo et al., 2003). Um *Lysinibacillus fusiformis*, isolado de solo poluído com cromo na Índia, reduziu 95% de Cr(VI) em 30 horas (Desai et al., 2008). No gênero *Pseudomonas* também é freqüente a ocorrência de isolados que reduzem cromato. Uma linhagem de *P. aeruginosa* isolada de efluente de curtume na Índia reduziu 10 mg/l de cromato (Ganguli e Tripathi, 2002). A resistência a mercúrio por bactérias está principalmnete relacionada à redução do  $Hg^{2+}$  para  $Hg^0$  pelo gene *merA* presente no operon *mer*. As bactérias *Pseudomonas* sp., *P. putida* e *Bacillus* sp., já tiveram sua capacidade de reduzir mercúrio relatada (Castein et al., 2002; Vetriani et al., 2005).

Alguns mecanismos encontrados nas bactérias conferem resistência a mais de um metal ao mesmo tempo e estão geralmente associados a sistemas de transporte. A tolerância ao cobre por *Pseudomonas syringae* está associada com o acúmulo de cobre no periplasma e na membrana externa da célula, por proteínas codificadas pelo operon *copABCD* (Cha e Cooksey, 1993). Um estudo com uma *Pseudomonas aeruginosa* mostrou que essa bactéria, quando exposta ao níquel, acumula esse metal na periferia da célula, sugerindo uma estratégia de desintoxicação e resistência (Sar et al., 2001). Em outra *Pseudomonas* (UDG26), o acúmulo de zinco também está envolvido com o aumento da resistência. Com o acúmulo do metal, um mecanismo de desintoxicação interno é desencadeado, resultando na expulsão do excesso de zinco pela célula (Mago e Srivastava, 1994). Alguns desses mecanismos podem estar envolvidos com a resistência à metais nos isolados das torres, porém, estudos complementares são necessários para esclarecer o mecanismos de resistência.

Além de conferir resistência aos micro-organismos, alguns mecanismos utilizados por eles vêm sendo cada vez mais estudados no intuito de serem utilizados na biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados. A bioacumulação e a biotransformação de metais são os mecanismos mais utilizados. O principal foco nos estudos de biotransformação é a conversão de íons metálicos para formas menos tóxicas através de reações de redução, podendo ou não resultar em precipitação (De et al., 2008). Já a bioacumalação é o processo dependente de energia pelo qual os micro-organismos acumulam metal. Os micro-organismos também podem acumular metais através de um processo que não dependa de energia, a biossorção.

A biossorção compreende a ligação de metais à biomassa por um processo que depende da afinidade do metal com os sítios de ligação da parede celular, não dependendo de energia metabólica ou transporte (Cossich, 2000). Estudos feitos com *Bacillus thuringiensis* (Öztürk, 2007), *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Rodríguez et al., 2006) mostraram que estas bactérias são excelentes adsorbentes para os íons de níquel.

A biorremediação é interessante se comparada com métodos físico-químicos de remoção de metais, pois pode apresentar baixo custo e alta eficiência quando as concentrações de metais são baixas (De et al., 2008). Portanto, estudos com esses microorganismos são de suma importância para a recuperação de ambientes contaminados com metais pesados uma vez que eles apresentam um grande potencial como agentes na biorremediação (Castro-Silva, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

O isolamento de bactérias associadas a elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica resultou em 101 bactérias distribuídas em oito gêneros: *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Exiguobacterium*, *Chryseobacterium*, *Bacillus* e *Acinetobacter*, sendo que os gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* foram encontrados nas 4 amostras coletadas.

A amostra A (parafuso corroído), derivada da torre nº 119, NE, revestida com pintura utilizada na proteção de estruturas metálicas contra o ataque de agentes biodeteriogênicos microbianos, apresentou maior diversidade genética (28 ribotipos) com representantes de sete diferentes gêneros, mostrando que a pintura de proteção dessa torre não restringe o crescimento dos micro-organismos e, portanto, não é um método efetivo para evitar a colonização de agentes microbianos.

Os 101 isolados das torres de transmissão de energia elétrica foram avaliados quanto à resistência a diferentes metais pesados e no geral todos os gêneros foram resistentes a mais de um metal. Para a maioria dos isolados e dos metais, o crescimento bacteriano diminuiu conforme o aumento da concentração do metal. O metal que menos afetou o crescimento dos isolados das torres foi o cromo e o que mais afetou foi o mercúrio. Os isolados do gênero *Acinetobacter* BD69, BD76, BD78 e BD79 se destacam por sua resistência ao cobre, enquanto os isolados BD11, BD50, BD65 e BD115 do gênero *Serratia* e os isolados BD10, BD20, BD21 e BD22 do gênero *Lysinibacillus* se destacaram pela resistência ao arsenito. Os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* também se destacaram pela resistência ao arsênio, na sua forma mais tóxica testada. Ambos apresentaram isolados muito resistentes ao arsenito, os quais praticamente não tiveram seu crescimento alterado na concentração de 10 mM. No gênero *Stenotrophomonas* se destacaram os isolados BD82 e BD129 que foram bem mais resistentes do que os isolados BD61 e BD96 desse mesmo gênero em vários metais. Os gêneros *Exiguobacterium* e *Chryseobacterium* não apresentaram uma alta resistência aos metais testados, com exceção do cromo para *Exiguobacterium* e arsênio para ambos.

## REFERÊNCIAS<sup>4</sup>

- Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M, Blake II R, Matin A. Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology*. 2004;6(8):851–60.
- Adaikkalam V, Swarup S. Molecular characterization of an operon, cueAR, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida*. *Microbiology*. 2002;148:2857–67.
- Afkar E, Lisak J, Saltikov C, Basu P, Oremland RS, Stolz JF. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;226: 107-12.
- Alam MZ, Malik A. Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology*. 2008;48:416-20.
- Ali N, Hameed A, Ahmed S. Physicochemical characterization and Bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous Bacteria. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;164:322–8.
- Alisi C, Musella R, Tasso F, Ubaldi C, Manzo S, Cremisini C, Sprocati AR. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*. 2009;407:3024–32.
- Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R Contains a Cluster of Genes from Gram-Positive Bacteria Involved in Antibiotic and Heavy Metal Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(7):1778–82.
- Alvarez AH, Moreno-Sanchez R, Cervantes C. Chromate Efflux by Means of the ChrA Chromate Resistance Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(23):7398–400.
- Alves ANL, Rosa HVD. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2003;39(2).
- Amaral CT, Correia MP, Pereira PT. Corrosão em Estruturas Metálicas: Uma Breve Discussão Acerca da Prevenção em Torres de Telecomunicações. *E-xacta Revista Científica do Departamento de Ciências Exatas e Tecnologia do Uni-BH*. 2008;1(1).
- Anderson CR, Cook GM. Isolation and Characterization of Arsenate-Reducing Bacteria from Arsenic-Contaminated Sites in New Zealand. *Current Microbiology*. 2004;48:341–7.
- Anton A, Große C, Reißmann J, Pribyl T, Nies DH. CzcD Is a Heavy Metal Ion Transporter Involved in Regulation of Heavy Metal Resistance in *Ralstonia* sp. Strain CH34. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(22):6876–81.
- Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. *J Mol Evol*. 1998;46:84–101.
- Babich H, Stotzky G. Heavy metal toxicity to microbe mediated ecologic processes. *Environ Res*. 1985;36:111–37.

---

<sup>4</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Bafana A, Krishnamurthi K, Patil M, Chakrabarti T. Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric salt-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;177:481–6.
- Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, D'Onofrio M, Gonnelli L, Carlos F, Marhuenda-Egea, Ruiz-Duenas FJ. Solution Structure of the N-terminal Domain of a Potential Copper-translocating P-type ATPase from *Bacillus subtilis* in the apo and Cu(I) Loaded States. *J. Mol.Biol.* 2002;317:415-29.
- Barrett EL, Clark MA. Tetrathionate Reduction and Production of Hydrogen Sulfide from Thiosulfate. *Microbiological Reviews*. 1987;June:192-205.
- Bayle D, Wangler S, Weitzenegger T, Steinhilber W, Volz J, Przybylski M, Schafer K, Sachs G, Melchers K. Properties of the P-Type ATPases Encoded by the copAP Operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *Journal of Bacteriology*. 1998;180(2):317–29.
- Beard SJ, Hashim R, Hernandez JM, Hughes MN, Poole RK. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the zntA gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Molecular Microbiology*. 1997;25(5):883-91.
- Beech IB, Gaylarde CC. Recent Advances in the Study of Biocorrosion- An Overview. *Revista de Microbiologia*. 1999;30:177-90.
- Beech IB, Sunner J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004;15:181–6.
- Bentley R, Chasteen TG. Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony, and Bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66(2):250–71.
- Bermont-Bouis D, Janvier M, Grimont PAD, Dupont I, Vallaes T. Both sulfate-reducing bacteria and *Enterobacteriaceae* take part in marine biocorrosion of carbon steel. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;102(1):161-8.
- Bhadra B, Nanda AK, Chakraborty R. Inducible nickel resistance in a river isolate of India phylogenetically ascertained as a novel strain of *Acinetobacter junii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22:225–32.
- Bogdanova ES, Bass IA, Minakhin LS, Petrova MA, Mindlin SZ, Volodin AA, Kalyaeva ES, Tiedje JM, Hobman JL, Brown NL, Nikiforov VG. Horizontal spread of rner operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology*. 1998;144:609-20.
- Boudaud N, Coton M, Coton E, Pineau S, Travert J, Amiel C. Biodiversity analysis by polyphasic study of marine bacteria associated with biocorrosion phenomena. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;109(1):166-79.
- Branco R, Chung AP, Johnston T, Gurel V, Morais P, Zhitkovich A. The Chromate-Inducible chrBACF Operon from the Transposable Element TnOtChr Confers Resistance to Chromium (VI) and Superoxide. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(21):6996–7003.
- Brocklehurst KR, Hobman JL, Lawley B, Blank L, Marshall SJ, Brown NL, Morby AP. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1999;31(3):893–902.
- Cai L, Liu G, Rensing C, Wang G. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*. 2009;9:4.
- Camargo FAO, Bento FM, Okeke BC, Frankenberger WT. Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. *J. Environ. Qual.* 2003;32:1228–33.

Canstein H, Kelly S, Li Y, Wagner-Döbler I. Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing Biofilms under Changing Environmental Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68:2829-37.

Castro-Silva MA, Lima AOS, Gerchenski AV, Jaques DB, Rodrigues AL, Souza PL, Rörig LR. Heavy Metal Resistance of Microorganisms Isolated from Coal Mining Environments of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2003;34(Suppl.1):45-7.

Cervantes C, Ohtake H, Chu L, Misra TK, Silver S. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the Chromate Resistance Determinant of *Pseudomonas aeruginosa* Plasmid pUM5O5. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(1):287-91.

Cha J, Cooksey DA. Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Components of the Copper Resistance Operon. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59(5):1671-4.

Chappell DA, Craw D. Geochemical analogue for circum neutral pH mine tailings: implication for long-term storage, Macraes Mine, Otago, New Zealand. *Appl Geochem*. 2002;17:1105-14.

Chen S, Shao Z. Isolation and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in communities enriched from deep-sea sediments of the Southwest Indian Ocean Ridge. *Extremophiles*. 2009;13:39-48.

Cheng G, Li X. Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. Isolated from soils of iron mineral area. *European Journal of Soil Biology*. 2009;45:483-7.

Chien CC, Hung CH, Han CT. Removal of cadmium ions during stationary growth phase by an extremely cadmium-resistant strain of *Stenotrophomonas* sp. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007;26(4):664-8.

Chien MF, Narita M, Lin KH, Matsui K, Huang CC, Endo G. Organomercurials removal by heterogeneous merB genes harboring bacterial strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010;110(1):94-8.

Cossich ES. Biossorção de Cromo (III) pela Biomassa da Alga Marinha *Sargassum* sp. [dissertação (Doutorado em Engenharia Química)]. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; 2000.

Costa ACA, Duta FP. Bioaccumulation of Copper, Zinc, Cadmium and Lead By *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001;32:1-5.

De J, Ramaiah N, Vardanyan L. Detoxification of Toxic Heavy Metals by Marine Bacteria Highly Resistant to Mercury. *Mar Biotechnol*. 2008;10:471-7.

Desai C, Jain K, Madamwar D. Evaluation of In vitro Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill. *Bioresource Technology*. 2008;99:6059-69.

Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi PR, Bond PL. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*. 2003;149:1959-70.

Ellis PJ, Conrads T, Hille R, Kuhn P. Crystal Structure of the 100 kDa Arsenite Oxidase from *Alcaligenes faecalis* in Two Crystal Forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure*. 2001;9:125-32.

Endo G, Silver S. CadC, the Transcriptional Regulatory Protein of the Cadmium Resistance System of *Staphylococcus aureus* Plasmid pI258. *Journal of Bacteriology*. 1995;177(15):4437-41.

Fang HHP, Xu LC, Chan KY. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*. 2002;36:4709-16.

- Ganguli A, Tripathi AK. Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;58:416–20.
- García-Meza JV. Autotrophic Biofilm Development on Superficial Samples of the Gold–Silver Mine Tailings, Valenciana (Mexico): Pioneers in Tailings Remediation? *Bull Environ Contam Toxicol*. 2008;80:53–7.
- Gayosso MJH, Olivares GZ, Ordaz NR, Ramirez CJ, Esquivel RG, Viveros AP. Microbial consortium influence upon steel corrosion rate, using polarisation resistance and electrochemical noise techniques. *Electrochimica Acta*. 2004;49:4295–301.
- Geiser M, Avci R, Lewandowski Z. Microbially initiated pitting on 316L stainless steel. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2002;49:235–43.
- Gentil V. *Corrosion*. 3ª edição, Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.; 1996.
- Grass G, Große C, Nies DH. Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel Resistance Determinant from *Ralstonia* sp. Strain CH34. *Journal of Bacteriology*. 1999;182(5):1390–8.
- Griffin H G, Foster TJ, Falkiner FR, Carr ME, Coleman DC. Molecular Analysis of Multiple-Resistance Plasmids Transferred from Gram-Negative Bacteria Isolated in a Urological Unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985;28(3):413-8.
- Griffin H G, Foster TJ, Silver S, Misra TK. Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987;84:3112-6.
- Grobe C, Grass G, Santon A, Franke S, Santos AN, Lawley B, Brown N, Nies DH. Transcriptional Organization of the *czc* Heavy-Metal Homeostasis Determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(8):2385–93.
- Grünberg K, Wawer C, Tebo BM, Schüler D. A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(10):4573–82.
- Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*. 2007;47:453-67.
- Hassan SHA, Abskharon RNN, Gad El-Rab SMF, Shoreit AAM. Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *Journal of Basic Microbiology*. 2008;48:168–76.
- He M, Li X, Liu H, Miller SJ, Wang G, Rensing C. Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;185:682–8.
- Herrera LK, Videla HA. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009;63:891–5.
- Holmes A, Vinayak A, Benton C, Esbenshade A, Heinselman C, Frankland D, Kulkarni S, Kurtanich A, Caguiat J. Comparison of Two Multimetal Resistant Bacterial Strains: *Enterobacter* sp. YSU and *Stenotrophomonas maltophilia* ORO2. *Curr Microbiol*. 2009;59:526–31.
- Hunter-Cevera JC, Belt A. *Maintenance Cultures for Biotechnology and Industry*. London: Academic Press; 1996.
- Jackson CR, Dugas SL, Harrison KG. Enumeration and characterization of arsenate-resistant bacteria in arsenic free soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 2005;37:2319–22.

Jan-Roblero J, Posadas A, Díaz de la Serna JZ, García R, Hernández-Rodríguez C. Phylogenetic characterization of bacterial consortia obtained of corroding gas pipelines in Mexico. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24:1775-84.

Jayaraman A, Ornek D, Duarte DA, Lee CC, Mansfeld FB, Wood TK. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of copper and aluminum. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;52:787-90.

Juhnke S, Peitzsch N, Hiibener N, GroBe C, Nies DH. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol.* 2002;179:15-25.

Juzeliunas E, Ramanauskas R, Lugauskas A, Samuleviciene M, Leinartas K. Microbially influenced corrosion acceleration and inhibition. EIS study of Zn and Al subjected for two years to influence of *Penicillium frequentans*, *Aspergillus niger* and *Bacillus mycooides*. *Electrochemistry Communications.* 2005;7:305-11.

Karelová E, Harichová J, Stojnev T, Pangallo D, Ferianc P. The isolation of heavy-metal resistant culturable bacteria and resistance determinants from a heavy-metal-contaminated site. *Biologia.* 2011;66(1):18-26.

Kawanishi S, Oikawa S, Inoue S, Nishino K. Distinct Mechanisms of Oxidative DNA Damage Induced by Carcinogenic Nickel Subsulfide and Nickel Oxides. *Environmental Health Perspectives.* 2002;110 (5).

Kirsop BE, Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures - A Manual of Laboratory Methods. 2nd ed. London: Academic Press; 1991.

Kobayashi M, Shimizu S. Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* 1999;261:1-9.

Korenblum E, Sebastián GV, Paiva MM, Coutinho CMLM, Magalhães FCM, Peyton BM, Seldin L. Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus strains* against biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79:97-103.

Koch GH, Brongers MPH, Thompson NG, Virmani P, Payer JH. Corrosion Cost and Preventive Strategies in the United States. Publication No. FHWA-RD-01-156; 2001. Available from: <http://www.corrosioncost.com/pdf/main.pdf> [2009 May 21].

Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* Chichester: John Wiley e Sons; 1991. p. 115-75.

Lapanje A, Zrimec A, Drobne D, Rupnik M. Long-term Hg pollution-induced structural shifts of bacterial community in the terrestrial isopod (*Porcellio scaber*) gut. *Environmental Pollution.* 2010;158:3186-93.

Lee SW, Glickmann E, Cooksey DA. Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001;67(4):1437-44.

Luo S, Wan Y, Xiao X, Guo H, Chen L, Xi Q, Zeng G, Liu C, Chen J. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum L.* and its potential for remediation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89:1637-44.

Mago R, Srivastav S. Uptake of Zinc in *Pseudomonas* sp. Strain UDG2. *Applied and Environmental Microbiology.* 1994;60(7):2367-70.

Malik A, Aleem A. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ Monit Assess.* 2010. In press. DOI10.1007/s10661-010-1690-2.

Malik A, Jaiswal R. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2000;16:177-82.

- Marrero J, Auling G, Coto O, Nies DH. High-Level Resistance to Cobalt and Nickel but Probably no Transenvelope Efflux: Metal Resistance in the Cuban *Serratia marcescens* strain C-1. *Microbial Ecology*. 2007;53:123–33.
- Mattagajasingh SN, Misra HP. Mechanisms of the Carcinogenic Chromium (VI)-induced DNA-Protein Cross-linking and Their Characterization in Cultured Intact Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(52):33550–60.
- Matyar F, Akkan T, Uçak Y, Eraslan B. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess*. 2010;167:309–20.
- Menezes CBA, Bonugli-Santos RC, Miqueletto PB, Passarini MRZ, Silva CHD, Justo MR, Leal RR, Fantinatti-Garboggini F, Oliveira VM, Berlinck RGS, Sette LD. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*. 2010;165:466-82.
- Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabbrielli R, Bazzicalupo M. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environmental Microbiology*. 2001;3(11):691-8.
- Miller CD, Pettee B, Zhang C, Pabst M, McLean JE, Anderson AJ. Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;49(6):775-83.
- Mulrooney SB, Hausinger RP. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003;27:239-61.
- Nagiub A, Mansfeld F. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition (MICI) with EIS and ENA. *Electrochimica Acta*. 2002;47:2319-33.
- Nies A, Nies DH, Silver S. Nucleotide Sequence and Expression of a Plasmid-encoded Chromate Resistance Determinant from *Akaligenes eutrophus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(10):5648-53.
- Nies DH. CzcR and CzcD, Gene Products Affecting Regulation of Resistance to Cobalt, Zinc, and Cadmium (czc System) in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*. 1992;174(24):8102-10.
- Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51:730-50.
- Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003;27:313-39.
- Nies DH, Silver S. Plasmid-Determined Inducible Efflux Is Responsible for Resistance to Cadmium, Zinc, and Cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*. 1989;171(2):896-900.
- Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86:3544-8.
- Odermatt A, Solioz M. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem*. 1995;270(9):4349-54.
- Okeke BC. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35:1571–9.
- Oyetibo GO, Ilori MO, Adebusoye SA, Obayori OS, Amund OO. Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environ Monit Assess*. 2009;168(1-4):305-14.
- Öztürk A. Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Hazardous Materials*. 2007;147:518–23.

Pages D, Rose J, Sandrine Conrod S, Cuine S, Carrier P, Heulin T, Achouak W. Heavy Metal Tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS ONE. 2008;3(2):e1539. doi:10.1371/journal.pone.0001539.

Park CH, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S, Matin A. Purification to Homogeneity and Characterization of a Novel *Pseudomonas putida* Chromate Reductase. Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(5):1788–95.

Park YJ, Ko JJ, Yun SL, Lee EY, Kima SJ, Kang SW, Lee BC, Kim SK. Enhancement of bioremediation by *Ralstonia* sp. HM-1 in sediment polluted by Cd and Zn. Bioresource Technology. 2008;99:7458–63.

Pavissich JP, Vargas IT, González B, Pastén PA, Pizarro GE. Culture dependent and independent analyses of bacterial communities involved in copper plumbing corrosion. Journal of Applied Microbiology. 2010;109(3):771-82.

Pei QH, Shahir S, Raj ASS, Zakaria ZA, Ahmad WA. Chromium(VI) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25:1085-93.

Phung LT, Ajlani G, Haselkorn R. P-type ATPase from the cyanobacterium *Synechococcus* 7942 related to the human Menkes and Wilson disease gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994;91:9651-4.

Pimentel BE, Moreno-Sanchez R, Cervantes C. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. FEMS Microbiology Letters. 2002;212:249-54.

Pires C, Carvalho MF, DeMarco P, Magan N, Castro PML. *Chryseobacterium palustre* sp. nov. and *Chryseobacterium humi* sp. nov., isolated from industrially contaminated sediments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010;60:402–7.

Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends Genetics. 1995;11(6):217-8.

Raja CE, Anbazhagan K, Selvam GS. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006;22:577–85.

Rajasekar A, Babu TG, Pandian STK, Maruthamuthu S, Palaniswamy N, Rajendran A. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. J Ind Microbiol Biotechnol. 2007;34:589–98.

Rao TS, Sairam TN, Viswanathan B, Nair KVK. Carbon steel corrosion by iron oxidizing and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system. Corrosion Science. 2000;42:1417-31.

Rensing C, Mitra B, Rosen BP. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1997;94:14326–31.

Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. Journal of Bacteriology. 1999;181(19):5891–7.

Rocco F, De Gregorio E, Colonna B, Di Nocera PP. *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: A start-up comparison. International Journal of Medical Microbiology. 2009;299:535–46.

Rodríguez CE, Quesada A, Rodríguez E. Nickel Biosorption by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Industrial Wastewater. Brazilian Journal of Microbiology. 2006;37:465-7.

Rosen BP. Biochemistry of arsenic detoxication. FEBS Letters. 2002;529:86-92.

Ryan RP, Ryan DJ, Dowling DN. Multiple Metal Resistant Transferable Phenotypes in Bacteria as Indicators of Soil Contamination with Heavy Metals. J Soils & Sediments. 2005;5(2):95-100.

- Saitou N & Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4:406-25.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Santo CE, Morais PV, Grass G. Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(5):1341–8.
- Sar P, Kazy SK, Singh P. Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature. *Letters in Applied Microbiology*. 2001;32:257-61.
- Sarangi A, Krishnan C. Comparison of in vitro Cr(VI) reduction by CFE of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. *Bioresource Technology*. 2008;99:4130–7.
- Silver S, Misra TK. Plasmid-Mediated Heavy Metal Resistances. *Ann. Rev. Microbiol.* 1988; 42:717-24.
- Silver S, Phung LT. Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annu.Rev.Microbiol.* 1996;50:753–89.
- Singh SK, Tripathi VR, Jain RK, Vikram S, Garg SK. An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. *Microbial Cell Factories*. 2010;9:59.
- Sivaprakash A, Aravindhan R, Rao JR, Nair BU. Kinetics and equilibrium studies on the biosorption of hexavalent chromium from aqueous solutions using *Bacillus subtilis* biomass. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2009;7(1):45-57.
- Sokolovská S, Wattiau P, Gerin P, Agathos SN. Biodegradation of fluorene at low temperature by a psychrotrophic *Sphingomonas* sp. L-138. *Chem. Pap.* 2001;56(1):36-40.
- Solovieva IM, Entian KD. Investigation of the *yvgW* *Bacillus subtilis* chromosomal gene involved in Cd<sup>2+</sup> ion resistance. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;208:105-9.
- Spada S, Pembroke JT, Wall JG. Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *Escherichia coli* growth under stress conditions. *Extremophiles*. 2002;6:301–8.
- Stanisich VA, Arwas R, Bennett PM, De La Cruz F. Characterization of *Pseudomonas* Mercury - resistance Transposon Tn502, Which Has a Preferred Insertion Site in RP1. *Journal of General Microbiology*. 1989;135:2909-15.
- Starosvetsky J, Starosvetsky D, Armon R. Identification of microbiologically influenced corrosion (MIC) in industrial equipment failures. *Engineering Failure Analysis*. 2007;14:1500–11.
- Sun LN, Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, Sheng XF. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*. 2010;101:501–9.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary genetics analysis. (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24:1596-9.
- Thompson JD, Higgins DJ, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673–80.
- Turpeinen R, Kairesalo T, Haggblom MM. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004;47:39-50.

- Verma T, Garg SK, Ramteke PW. Genetic correlation between chromium resistance and Reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;107(5):1425-32.
- Vetriani C, Chew YS, Miller SM, Yagi J, Coombs J, Lutz RA, Barkay T. Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(1):220–2.
- Vieira RHSF, Volesky B. Biosorption: a solution to pollution? *Internatl Microbiol*. 2000;3:17–24.
- Viti C, Pace A, Giovannetti L. Characterization of Cr(VI)-Resistant Bacteria Isolated from Chromium-Contaminated Soil by Tannery Activity. *Current Microbiology*. 2003;46:1–5.
- Volesky B, Holan ZR. Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnol. Prog*. 1995;11:235-50.
- Xinxian L, Xuemei C, Yagang C, Woon-Chung WJ, Zebin W, Qitang W. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011;27(5):1197-207.
- Wang PC, Mori T, Komori K, Sasatsu M, Toda K, Ohtake H. Isolation and Characterization of an *Enterobacter cloacae* Strain That Reduces Hexavalent Chromium under Anaerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989;55(7):1665-9.
- Wang PC, Mori T, Komori K, Sasatsu M, Toda K, Ohtake H. Membrane-Associated Chromate Reductase Activity from *Enterobacter cloacae*. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(3):1670-2.
- Yilmaz EI. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology*. 2003;154:409–15.
- Zahoor A, Rehman A. Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environmental Sciences*. 2009;21:814–20.
- Zaki S, Farag S. Isolation and molecular characterization of some copper biosorped strains. *Int. J. Environ. Sci. Tech*. 2010;7(3):553-60.
- Zhang HB, Shi W, Yang MX, Sha T, Zhao ZW. Bacterial Diversity at Different Depths in Lead-Zinc Mine Tailings as Revealed by 16S rRNA Gene Libraries. *The Journal of Microbiology*. 2007;45:479-84.
- Zeng X, Tagn J, Jiang P, Liu H, Dai Z, Liu X. Isolation, characterization and extraction of mer gene of Hg<sup>2+</sup> resisting strain D<sub>2</sub>. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. 2010;20:507-12.
- Zuo R. Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;76:1245–53.

**ANEXO A - Bactérias associadas a elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica isoladas neste estudo.**

Isolados <sup>a</sup>	Número de acesso CBMAI <sup>b</sup>	Isolados similares <sup>c</sup>	Morfologia da célula e Coloração de Gram <sup>d</sup>	Identificação <sup>e</sup>
BD01	CBMAI 1156	BD18, BD26, BD30, BD35	Bastonete Gram-positivo	<i>Bacillus</i> sp.
BD02	CBMAI 1157		Bastonete Gram-positivo	<i>Lysinibacillus</i> sp.
BD07	CBMAI 1158	BD03, BD06, BD08, BD09, BD12, BD13	Bastonete Gram-positivo	<i>Bacillus</i> sp.
BD10	CBMAI 1159	BD20, BD21, BD22, BD23, BD37, BD41	Bastonete Gram-positivo	<i>Lysinibacillus</i> sp.
BD11	CBMAI 1160		Bastonete Gram-negativo	<i>Serratia</i> sp.
BD17	CBMAI 1161		Bastonete Gram-positivo	<i>Lysinibacillus</i> sp.
BD25	CBMAI 1162	BD29, BD49, BD56, BD113, BD114	Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
BD38	CBMAI 1163	BD31, BD33, BD34	Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter bereziniae</i>
BD44	CBMAI 1164	BD46, BD48	Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD47	CBMAI 1165	BD39, BD58	Bastonete Gram-positivo	<i>Exiguobacterium profundum</i>
BD50	CBMAI 1166		Bastonete Gram-negativo	<i>Serratia</i> sp.
BD51	CBMAI 1167		Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas fulva</i>
BD57	CBMAI 1168		Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
BD61	CBMAI 1169		Bastonete Gram-negativo	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BD63	CBMAI 1170	BD60	Bastonete Gram-positivo	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
BD66	CBMAI 1171		Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter bereziniae</i>
BD67	CBMAI 1172		Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD68	CBMAI 1173		Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD75	CBMAI 1174		Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD77	CBMAI 1175		Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter</i> sp.
BD86	CBMAI 1176	BD83, BD93	Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter</i> sp.
BD87	CBMAI 1177	BD99	Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD91	CBMAI 1178	BD95	Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD96	CBMAI 1179	BD82, BD129	Bastonete Gram-negativo	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BD98	CBMAI 1184		Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter junii</i>
BD101	CBMAI 1180	BD04, BD14, BD15, BD16, BD28, BD42, BD43, BD45, BD52, BD53, BD55, BD59, BD64, BD69, BD70, BD71, BD72, BD73, BD76, BD78, BD79, BD80, BD81, BD84, BD89, BD92, BD94, BD97, BD100, BD102, BD112	Cocobacilo Gram-negativo	<i>Acinetobacter</i> sp.
BD103	CBMAI 1181	BD54, BD104	Bastonete Gram-negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.
BD111	CBMAI 1182		Bastonete Gram-negativo	<i>Chryseobacterium defluvium</i>
BD128	CBMAI 1183	BD65, BD74, BD85, BD115	Bastonete Gram-negativo	<i>Serratia</i> sp.

<sup>a</sup>Número do isolado

<sup>b</sup>Número de acesso na coleção de cultura - CBMAI

<sup>c</sup>Isolados com 97% de similaridade obtidos a partir da análise de matriz de distância usando o algoritmo Kimura.

<sup>d</sup>Coloração de Gram e morfologia da célula observada em microscópio óptico.

<sup>e</sup>Identificação das bactérias por análise de sequência do gene RNA ribossomal 16S.

**ANEXO B - Bactérias resistentes a metais pesados, isoladas a partir de elementos metálicos de torres de transmissão de energia elétrica.**

Isolados	Número de acesso CBMAI <sup>a</sup>	Zinco		Níquel		Cobre		Cobalto		Cromo		Arsenato		Arsenito		Mercúrio	
		MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>	MIC <sup>b</sup>	Cresc. cel. ≥ 50% <sup>c</sup>
<i>Bacillus</i>	BD01	CBMAI 1156	2 mM	1 mM	4 mM	0 mM	7 mM	0,5 mM	10 mM	10 mM	10 mM	2 mM	3 mM	0,5 mM	0,5 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD03	CBMAI 1252	1 mM	2 mM	4 mM	0 mM	6 mM	2 mM	10 mM	10 mM	10 mM	7 mM	5 mM	1 mM	0,5 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD10	CBMAI 1159	1 mM	0 mM	7 mM	1 mM	10 mM	3 mM	7 mM	1 mM	10 mM	2 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
<i>Lysinibacillus</i>	BD22	CBMAI 1253	1 mM	0 mM	2 mM	0,5 mM	10 mM	4 mM	7 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD37	CBMAI 1254	1 mM	0 mM	7 mM	1 mM	8 mM	3 mM	10 mM	0,5 mM	10 mM	1 mM	0,5 mM	0 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD63	CBMAI 1170	1 mM	0 mM	4 mM	1 mM	7 mM	3 mM	7 mM	7 mM	10 mM	10 mM	6 mM	2 mM	2 mM	< 0,1 mM	0 mM
<i>Serratia</i>	BD11	CBMAI 1160	4 mM	1 mM	7 mM	5 mM	7 mM	3 mM	10 mM	5 mM	10 mM	7 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD50	CBMAI 1166	4 mM	2 mM	8 mM	6 mM	9 mM	4 mM	10 mM	6 mM	10 mM	9 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD65	CBMAI 1255	4 mM	2 mM	8 mM	6 mM	8 mM	4 mM	10 mM	6 mM	10 mM	8 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD115	CBMAI 1256	3 mM	1 mM	8 mM	8 mM	8 mM	3 mM	7 mM	7 mM	10 mM	8 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD47	CBMAI 1165	0,5 mM	0 mM	4 mM	1 mM	6 mM	0 mM	7 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
<i>Stenotrophomonas</i>	BD82	CBMAI 1257	8 mM	7 mM	10 mM	5 mM	9 mM	9 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD129	CBMAI 1258	10 mM	7 mM	10 mM	5 mM	9 mM	9 mM	7 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD44	CBMAI 1164	10 mM	6 mM	7 mM	4 mM	8 mM	7 mM	10 mM	0,5 mM	10 mM	7 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
<i>Pseudomonas</i>	BD46	CBMAI 1259	10 mM	7 mM	9 mM	4 mM	8 mM	8 mM	10 mM	4 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD48	CBMAI 1260	10 mM	6 mM	9 mM	5 mM	8 mM	8 mM	10 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD68	CBMAI 1173	10 mM	6 mM	7 mM	4 mM	8 mM	8 mM	10 mM	4 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD99	CBMAI 1261	2 mM	2 mM	3 mM	2 mM	5 mM	3 mM	10 mM	10 mM	10 mM	4 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD104	CBMAI 1262	1 mM	0,5 mM	1 mM	1 mM	6 mM	5 mM	2 mM	1 mM	2 mM	0 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD31	CBMAI 1263	5 mM	4 mM	2 mM	1 mM	6 mM	5 mM	10 mM	1 mM	1 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
<i>Acinetobacter</i>	BD42	CBMAI 1264	10 mM	1 mM	5 mM	1 mM	10 mM	9 mM	4 mM	3 mM	10 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD55	CBMAI 1265	4 mM	4 mM	4 mM	1 mM	10 mM	5 mM	8 mM	1 mM	1 mM	0 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD56	CBMAI 1266	4 mM	1 mM	4 mM	1 mM	10 mM	3 mM	5 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD57	CBMAI 1168	4 mM	2 mM	4 mM	0,5 mM	8 mM	6 mM	2 mM	2 mM	10 mM	0 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD73	CBMAI 1252	5 mM	2 mM	5 mM	1 mM	9 mM	8 mM	5 mM	3 mM	10 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD77	CBMAI 1267	3 mM	1 mM	5 mM	0,5 mM	10 mM	7 mM	6 mM	6 mM	9 mM	0 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD81	CBMAI 1268	5 mM	1 mM	5 mM	1 mM	10 mM	7 mM	4 mM	4 mM	10 mM	1 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
	BD94	CBMAI 1269	8 mM	7 mM	9 mM	4 mM	10 mM	9 mM	6 mM	5 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM
<i>Chryseobacterium</i>	BD111	CBMAI 1182	10 mM	3 mM	1 mM	0,5 mM	2 mM	1 mM	< 0,5 mM	0 mM	< 0,5 mM	0 mM	10 mM	10 mM	< 0,1 mM	0 mM	

<sup>a</sup>Número de acesso na coleção de cultura - CBMAI

<sup>b</sup>Concentração mínima inibitória (MIC) dos isolados frente aos diferentes metais.

<sup>c</sup>Concentração dos isolados frente aos diferentes metais aonde o crescimento celular foi maior ou igual a 50%.

**ANEXO C - Valores de média e desvio padrão calculados para os isolados nos quais os testes de resistência a metais pesados foram feitos em triplicatas.**

Zinco	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão														
BD01	29,707	8,259	62,020	3,279	39,870	7,411	0,000	0,333	0,195	0,666	0,000	0,000	0,586	1,117	0,551	0,829	0,433	0,260	0,824	0,115	0,000	0,907
BD03	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	20,448	0,000	0,326	0,000	1,504	0,000	0,000	0,000	3,608	0,000	3,007	0,525	3,909	0,000	0,301	0,000	0,618
BD10	14,326	8,455	14,373	3,733	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,476	0,000	0,409	4,869	0,442	3,711	0,335	3,639	0,000	1,009
BD22	18,753	2,474	9,376	2,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,417	0,000	0,333	0,000	0,083	0,739	1,416	0,000	0,583	0,000	8,788
BD37	5,308	1,057	10,402	0,635	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,425	0,000	0,000	0,749	3,304	0,644	0,173	0,767	0,889	0,000	0,000
BD63	5,125	1,195	13,627	1,302	0,000	0,000	0,477	1,403	0,199	1,545	0,000	0,000	0,372	0,278	0,494	0,059	3,869	0,159	0,580	0,000	0,265	
BD11	74,502	2,819	67,261	3,387	42,025	3,170	12,592	4,252	2,571	2,472	0,472	0,138	0,000	0,362	1,102	0,378	1,417	0,379	1,574	0,219	0,787	0,912
BD50	100,000	0,377	96,955	6,028	67,820	1,972	42,768	2,128	31,349	6,606	0,000	0,000	0,900	1,204	0,346	1,851	0,000	1,041	0,761	0,708	0,000	0,776
BD65	95,003	0,200	99,042	1,195	68,720	1,809	42,779	1,331	34,360	5,600	0,000	0,000	0,000	0,398	0,000	0,920	0,000	0,575	0,411	0,940	0,000	0,614
BD115	80,776	13,666	77,373	8,136	44,239	5,771	18,866	2,310	0,000	0,858	0,000	0,000	0,000	0,257	0,000	0,172	0,239	0,724	0,896	0,146	0,000	0,674
BD47	30,103	7,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,307	0,000	0,405	0,000	1,464	0,000	2,379	0,000	0,811
BD82	80,089	2,098	90,670	4,102	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	47,321	43,640	0,625	0,584	0,580	0,861
BD129	88,406	2,932	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	27,141	46,342	12,209	20,723	1,142	0,151
BD44	88,535	10,309	89,538	6,172	95,466	5,576	100,000	7,784	100,000	0,000	100,000	4,325	60,942	31,160	12,249	8,155	3,444	4,222	2,136	0,258	1,264	0,540
BD46	87,580	3,144	98,382	3,922	100,000	0,892	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	86,150	11,967	64,132	14,555	26,948	14,871	4,817	3,742	1,618	0,618
BD48	93,866	5,495	97,637	3,117	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,600	36,256	10,839	4,589	4,167	1,408	0,572	1,363	1,131
BD68	93,291	5,294	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	99,882	1,129	38,161	14,184	2,684	3,519	1,105	0,463	2,841	2,332
BD99	80,188	20,135	84,984	18,016	59,437	54,952	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,521	0,477	0,834	0,396	1,512	0,737	1,981	1,809
BD104	61,851	10,036	29,769	7,872	0,250	0,466	0,000	0,000	0,000	0,000	0,118	0,000	0,000	0,000	0,000	0,186	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,426
BD31	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	82,139	38,395	15,784	30,260	0,000	0,000	0,104	0,716	4,154	4,941	1,661	1,946	3,946	2,336
BD42	69,455	4,611	52,335	2,354	46,109	1,198	38,424	4,336	30,837	4,625	18,385	8,123	4,572	3,124	4,961	5,727	12,646	10,941	6,518	8,743	5,642	3,633
BD55	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	3,945	73,922	35,180	0,631	0,784	0,210	1,687	0,000	0,368	7,150	13,255	0,315	1,125	2,419	1,799
BD56	55,949	1,223	50,901	0,938	45,362	1,519	18,650	1,533	1,213	2,185	0,000	0,230	0,754	1,819	0,818	7,243	0,688	0,807	0,114	0,347	0,000	1,019
BD57	89,133	0,554	76,883	2,437	65,539	4,475	15,825	15,330	2,526	4,593	0,000	0,000	0,000	0,509	0,049	1,310	0,477	0,597	0,144	0,599	0,000	0,810
BD73	60,094	1,350	52,170	12,235	64,528	17,395	36,321	8,207	19,811	7,189	1,226	1,266	0,000	0,162	0,000	0,000	8,679	9,062	1,132	0,965	3,868	5,638
BD77	80,745	3,929	76,541	9,493	26,947	3,811	8,313	2,294	0,096	0,743	0,000	0,661	0,000	0,165	3,106	5,837	4,348	5,860	0,000	0,993	1,768	1,140
BD81	58,447	2,001	50,341	3,701	38,396	0,527	27,901	4,638	24,659	8,253	12,116	19,519	0,000	0,381	0,000	0,624	8,020	12,066	2,304	2,385	0,000	1,552
BD94	86,976	3,587	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	88,826	5,571	74,783	12,704	65,006	4,027	19,592	24,179	0,000	0,000	0,000	0,366
BD111	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	16,335	4,387	10,205	2,713	12,359	7,002	9,675	2,638	11,498	2,444	12,922	1,235	10,835	3,127

Níquel	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão							
BD01	18,657	8,463	10,855	5,716	6,309	6,152	8,005	3,300	7,666	1,036	0,475	1,258	0,000	0,000	0,000	0,339	1,143	0,000	0,163	0,000	0,114	0,475	1,071
BD03	37,621	12,974	20,885	6,694	19,779	1,770	18,949	12,680	9,267	9,091	0,000	0,402	0,000	0,336	0,000	0,336	0,000	0,402	0,415	2,014	0,000	1,678	
BD10	84,232	15,716	69,307	22,311	25,596	11,124	9,864	7,216	8,471	4,394	1,687	1,403	1,320	0,491	1,137	0,628	0,917	0,820	0,440	0,462	0,587	0,653	
BD22	75,212	2,856	41,961	2,479	5,177	3,681	0,000	0,249	0,000	1,246	0,398	1,246	0,896	1,333	0,796	1,173	0,548	1,086	0,149	0,530	0,498	1,122	
BD37	77,567	20,212	63,889	18,326	21,589	7,844	12,236	5,712	10,127	3,698	4,887	1,842	3,376	1,685	1,301	0,776	0,668	0,635	0,422	0,678	0,668	0,362	
BD63	84,472	3,914	67,276	5,746	28,554	5,184	5,123	8,486	7,268	0,403	0,794	1,127	0,199	0,237	0,000	0,000	0,000	0,198	0,000	0,209	0,000	0,475	
BD11	92,100	2,349	88,335	1,896	75,716	2,584	66,384	1,761	64,634	2,387	52,757	2,150	27,306	1,374	6,628	3,254	0,000	0,633	0,000	0,000	0,000	0,000	
BD50	98,592	15,170	100,000	2,264	100,000	5,547	92,870	16,237	84,771	17,808	69,894	24,686	55,370	31,610	33,539	24,319	9,771	10,709	0,000	0,410	0,000	0,000	
BD65	92,962	9,351	84,531	28,279	92,669	9,934	72,361	8,626	67,375	4,271	60,704	7,986	50,073	5,636	34,238	6,580	5,205	1,021	0,000	0,000	0,000	0,115	
BD115	85,827	36,910	92,230	16,304	91,151	11,588	75,683	12,901	69,712	15,279	57,266	10,475	47,986	8,601	26,691	6,060	2,662	2,171	0,000	0,000	0,000	0,000	
BD47	90,213	8,177	82,171	6,283	32,994	1,341	2,277	5,564	1,357	5,895	0,000	0,484	0,000	0,161	0,000	0,000	0,323	0,000	0,000	0,000	0,161		
BD82	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	98,293	4,424	87,062	6,698	61,096	4,876	32,749	4,199	32,749	2,426	10,827	0,704	8,760	1,131	4,987	0,746	
BD129	100,000	0,697	100,000	0,418	100,000	0,837	100,000	8,113	99,589	10,550	69,065	24,969	39,723	20,510	22,713	15,934	14,851	8,330	6,629	4,366	4,162	2,604	
BD44	98,014	1,746	91,065	3,357	87,274	4,264	76,128	5,752	71,616	10,146	47,653	6,608	29,332	13,741	5,415	1,969	0,812	1,945	1,986	1,092	0,000	0,000	
BD46	96,864	0,454	94,134	0,771	89,613	0,634	79,796	1,660	74,949	1,008	48,147	6,075	39,226	5,722	7,413	1,175	5,947	1,531	3,951	1,212	0,122	1,160	
BD48	96,768	2,816	95,060	1,686	94,783	1,325	88,366	1,890	73,407	11,716	60,157	3,397	44,968	4,200	7,433	2,136	5,956	1,981	3,924	1,479	0,000	0,713	
BD68	68,614	5,387	64,785	4,009	83,814	1,226	72,483	0,078	63,600	2,087	27,201	6,977	9,041	2,581	6,672	0,858	0,908	2,367	0,908	0,747	0,000	0,132	
BD99	100,000	0,000	100,000	0,000	53,574	38,513	9,652	20,793	0,000	0,528	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,211	0,000	0,422	0,305	0,950	0,000	0,422	
BD104	75,671	9,633	58,709	8,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
BD31	89,368	4,033	55,579	0,250	34,211	10,074	0,000	0,837	0,000	0,000	0,000	1,673	0,000	0,000	0,632	0,874	1,158	0,854	0,316	0,962	0,316	0,907	
BD42	84,368	1,468	79,401	0,935	33,236	3,299	9,350	2,073	12,783	2,048	2,995	2,399	0,438	1,430	0,073	0,993	0,146	0,745	0,950	0,969	0,438	0,591	
BD55	83,789	7,883	66,105	3,844	42,947	34,306	5,368	10,467	6,632	10,632	0,105	2,003	0,842	2,091	2,842	0,945	2,947	0,497	2,421	0,660	1,368	1,552	
BD56	68,346	20,640	65,031	0,331	9,977	1,235	5,492	4,025	2,437	2,388	0,747	1,279	0,000	0,772	0,000	0,000	0,065	0,097	0,000	0,174	0,195	0,307	
BD57	63,898	8,160	42,571	8,050	16,653	1,265	2,045	1,294	1,483	1,294	1,483	0,125	0,548	0,000	0,279	0,459	0,493	0,501	0,565	0,000	0,459	1,095	
BD73	83,521	4,194	82,535	2,375	47,606	13,654	10,493	1,034	11,972	0,636	4,014	2,669	0,070	1,844	0,634	0,795	0,000	0,394	0,000	0,131	0,000	0,000	
BD77	76,291	4,026	41,983	7,745	11,284	0,517	3,198	1,169	3,061	0,072	1,782	1,122	0,000	0,330	0,411	0,643	0,959	0,245	0,457	0,512	1,553	1,131	
BD81	79,208	7,418	79,934	7,625	30,297	9,532	10,363	1,601	11,155	1,156	8,317	2,622	0,132	1,615	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
BD94	92,538	2,742	82,379	1,616	92,575	2,257	86,849	1,485	81,234	1,096	46,657	1,710	37,274	5,396	5,209	2,110	1,478	0,583	1,108	0,327	0,369	0,496	
BD111	73,664	19,890	2,700	0,372	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,387	0,000	0,110	0,000	0,000	0,000	0,111	

Cobre	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão																		
BD01	85,143	12,068	47,714	4,679	53,600	24,666	24,686	12,287	16,514	7,044	14,629	9,046	8,171	3,934	5,314	8,194	0,514	1,201	0,400	0,608	0,000	0,330
BD03	90,360	19,169	100,000	0,000	100,000	35,660	33,033	8,062	28,278	14,295	16,581	11,945	4,242	4,237	0,000	1,536	0,000	2,150	0,000	1,536	0,000	1,536
BD10	100,000	0,000	100,000	0,000	73,419	7,836	67,324	12,641	49,175	6,643	41,430	5,207	31,164	1,240	13,611	11,478	4,995	4,968	1,650	1,292	1,467	0,515
BD22	54,453	3,223	52,420	14,541	76,621	3,349	58,809	1,714	50,242	2,567	39,497	2,256	31,075	0,490	31,897	22,634	22,556	36,999	1,404	0,233	1,839	0,456
BD37	90,018	12,172	100,000	0,000	100,000	5,892	72,381	15,066	30,476	6,468	20,917	4,016	9,806	1,708	4,268	0,669	1,693	1,892	0,529	0,600	0,587	1,026
BD63	100,000	0,000	100,000	1,315	68,196	10,009	50,282	2,776	40,258	2,946	36,514	1,912	32,810	1,636	21,014	3,919	0,000	0,070	0,000	0,211	0,564	0,465
BD11	84,813	3,213	80,346	5,667	64,042	0,636	55,221	5,067	44,221	4,931	35,232	2,638	31,882	3,490	16,025	3,951	0,279	0,833	0,000	0,000	0,000	0,554
BD50	90,274	5,951	86,866	5,916	78,304	6,230	66,584	9,883	54,115	5,166	39,318	8,952	32,003	3,572	26,018	5,299	9,975	11,202	9,476	3,850	0,000	0,000
BD65	86,849	2,905	84,119	3,826	76,840	0,094	65,343	6,160	54,591	0,199	44,003	8,698	33,830	6,394	27,626	2,790	7,196	8,523	0,000	0,000	0,000	0,148
BD115	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000
BD47	32,851	9,660	36,845	10,119	40,989	7,001	41,687	8,676	36,545	4,328	28,357	9,357	10,834	8,388	0,100	0,676	0,849	0,803	0,799	0,788	0,546	1,312
BD82	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000
BD129	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000
BD44	100,000	0,311	100,000	1,401	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	91,974	9,974	88,874	26,812	24,715	27,519	0,000	0,323	0,000	0,000
BD46	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	75,409	39,585	0,000	0,143	0,000	0,000
BD48	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD68	72,589	6,205	74,619	6,592	76,259	8,196	82,858	6,713	87,934	10,325	96,095	5,993	99,063	3,475	100,000	0,000	66,849	57,053	0,000	0,000	0,000	0,000
BD99	100,000	5,997	100,000	0,000	100,000	2,639	93,529	18,792	9,181	13,306	4,591	4,813	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,320	0,000	0,000	0,000	0,000
BD104	68,998	2,965	72,092	1,063	73,577	5,148	81,188	3,552	78,651	4,500	76,856	3,291	29,641	16,639	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD31	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,743	92,364	7,508	85,460	14,272	22,280	9,366	0,732	0,962	1,255	1,164	0,628	1,155	1,569	1,703
BD42	71,733	7,413	68,395	4,280	65,341	3,912	59,020	5,111	63,849	3,013	68,608	3,360	62,855	4,085	67,685	5,080	58,026	2,336	58,097	16,716	21,449	20,099
BD55	100,000	0,515	100,000	2,062	99,486	1,898	94,450	7,093	87,667	5,822	83,453	6,150	23,844	3,943	3,186	2,142	4,008	1,664	2,467	2,865	3,597	0,561
BD56	90,666	4,090	74,802	19,521	57,520	9,240	53,397	0,938	46,207	1,727	45,449	1,406	44,624	11,819	24,901	1,184	11,840	5,358	3,232	1,594	2,078	0,567
BD57	90,203	4,125	87,282	3,257	78,851	1,457	75,695	2,831	68,629	0,201	70,984	6,183	62,223	14,060	35,374	3,796	6,406	5,209	0,565	0,569	0,460	1,281
BD73	68,380	3,809	71,056	5,169	66,338	0,653	65,282	0,310	67,465	4,865	73,099	0,166	73,592	2,246	71,479	4,007	68,662	13,649	47,113	17,714	0,000	0,617
BD77	91,693	2,247	89,858	5,876	82,790	1,329	78,155	3,091	69,160	2,000	67,646	3,662	64,341	4,165	57,503	10,449	23,268	19,727	7,526	6,085	1,790	0,588
BD81	73,425	10,147	78,675	17,895	63,189	1,422	69,357	5,613	70,866	10,310	70,013	7,585	65,026	7,156	58,268	6,553	35,236	7,234	20,013	7,314	5,840	7,736
BD94	100,000	0,702	100,000	0,388	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000
BD111	84,467	7,065	83,908	6,243	1,149	2,348	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,957	1,158	0,210

Cobalto	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão										
BD01	94,578	10,123	71,233	28,893	27,797	14,091	21,747	8,508	15,411	2,370	14,098	2,475	21,918	6,730	1,941	2,182	3,082	0,748	3,767	0,792	4,737	0,369
BD03	72,398	21,285	44,598	9,372	27,866	5,343	26,482	3,362	33,333	5,658	32,411	5,417	4,480	0,949	3,755	1,773	5,007	1,173	6,588	0,582	7,444	1,618
BD10	79,801	19,337	51,033	18,465	38,982	15,504	25,555	21,361	16,297	4,835	6,695	1,326	2,028	2,219	1,415	0,986	0,000	0,768	0,995	0,995	0,104	1,614
BD22	90,929	11,267	68,743	12,748	47,705	7,119	34,153	3,439	30,601	9,525	24,208	13,786	10,820	3,724	1,475	0,537	0,328	1,293	0,459	0,457	0,574	2,055
BD37	76,916	2,554	35,694	1,411	22,114	1,729	19,916	1,359	15,939	0,229	8,212	1,087	2,005	1,133	1,390	0,759	0,841	1,053	1,552	0,426	1,067	3,118
BD63	89,968	10,628	69,400	24,789	55,108	29,306	44,480	22,972	39,533	21,534	29,867	18,674	13,055	10,839	2,290	3,126	0,000	0,962	0,428	0,627	0,000	0,861
BD11	97,892	1,760	99,280	1,289	96,658	2,428	85,141	1,246	73,213	3,361	59,434	0,596	30,694	8,699	1,337	0,650	1,851	0,582	1,954	0,420	1,234	1,382
BD50	88,990	17,246	87,588	9,265	95,652	2,738	89,902	4,176	94,600	5,274	95,302	5,991	86,466	3,213	29,383	10,624	29,102	52,065	5,259	2,793	6,031	1,547
BD65	91,412	7,258	87,080	7,851	94,025	5,881	91,934	3,160	93,503	2,585	100,000	0,000	92,905	2,966	32,263	15,772	4,108	3,774	4,929	5,303	6,871	3,535
BD115	100,000	3,721	90,396	12,485	86,178	10,704	82,803	14,135	80,337	11,885	83,842	13,218	75,406	8,157	36,989	13,405	0,000	3,222	1,882	3,609	1,038	3,100
BD47	72,529	1,318	61,074	2,182	47,243	1,242	42,538	2,500	38,165	2,464	34,268	7,985	29,468	2,453	0,000	1,443	0,856	0,768	0,000	1,322	0,606	5,378
BD82	90,926	3,963	88,280	7,504	100,000	1,208	100,000	0,000	100,000	0,725	100,000	3,382	90,690	2,973	60,491	29,594	5,435	1,360	6,947	1,665	6,096	0,291
BD129	85,484	16,003	84,295	8,784	100,000	1,314	100,000	1,175	100,000	0,000	100,000	2,973	93,718	9,391	61,121	27,090	0,000	1,245	0,000	1,860	0,000	2,443
BD44	69,722	5,048	43,499	2,425	31,247	34,855	9,431	0,196	12,472	4,965	7,492	1,685	3,217	1,540	2,248	0,649	3,173	0,364	4,187	0,307	3,438	1,558
BD46	93,598	4,274	84,254	2,013	55,507	1,943	59,006	3,768	50,497	6,377	38,847	8,141	20,040	12,078	3,340	1,014	3,181	1,128	3,777	0,459	2,505	0,426
BD48	89,281	2,679	71,773	1,368	42,430	0,800	29,790	4,356	32,604	5,982	18,758	3,448	10,674	0,162	3,305	1,115	3,126	0,838	4,020	0,379	3,484	1,292
BD68	77,388	3,009	61,194	4,605	43,769	5,990	61,604	9,239	49,925	3,704	32,313	5,105	2,761	0,617	1,343	0,606	2,537	0,094	2,910	0,364	2,500	0,778
BD99	84,804	16,309	83,254	15,702	41,455	16,796	32,587	7,990	14,550	5,780	1,033	1,276	0,732	1,174	1,248	1,129	1,894	1,045	2,497	0,829	1,421	1,689
BD104	78,637	5,474	63,659	5,972	35,666	9,003	0,000	0,104	0,000	0,520	0,000	0,416	0,000	0,624	0,614	1,195	0,000	0,624	0,000	0,936	1,351	1,910
BD31	80,513	11,725	78,802	24,663	7,700	7,723	1,046	1,235	1,521	1,407	2,567	1,118	3,042	1,556	1,616	0,804	2,567	1,688	3,612	3,044	3,042	4,571
BD42	91,654	9,031	92,996	4,489	86,662	1,936	87,183	7,495	22,876	4,043	0,596	0,992	2,161	1,541	1,118	1,069	1,416	1,842	0,185	1,964	0,867	3,671
BD55	94,193	9,127	100,000	4,121	21,260	7,834	1,673	1,657	1,772	1,999	1,870	0,878	3,051	1,499	2,264	1,443	3,543	2,495	0,984	4,477	0,449	1,635
BD56	90,817	0,842	61,364	0,141	43,850	1,411	34,438	2,058	31,158	0,667	21,548	2,576	0,590	0,356	0,098	0,601	0,000	0,685	0,328	1,624	0,493	2,631
BD57	95,181	1,800	48,146	3,319	6,024	5,097	0,741	0,682	0,602	0,692	0,880	0,480	1,066	0,926	0,324	0,503	0,000	0,000	0,574	0,875	0,641	3,895
BD73	90,909	6,129	88,281	2,022	86,506	4,310	79,474	11,134	23,864	2,743	2,841	4,988	0,213	0,499	0,000	0,242	1,562	1,116	0,753	1,508	0,321	1,472
BD77	89,566	9,249	31,711	15,380	6,073	1,556	5,007	3,863	2,133	1,157	1,159	0,294	3,060	0,464	0,464	0,554	0,093	0,933	0,523	1,376	0,331	0,795
BD81	87,566	9,321	86,569	3,303	76,197	1,040	80,253	4,892	49,867	8,947	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,918	0,000	2,940	0,122	2,258
BD94	96,991	4,096	73,712	4,450	88,229	12,761	66,717	13,654	77,736	6,125	57,052	21,510	4,325	3,106	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,242
BD111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,324	0,926	0,000	0,830	0,054	0,634	0,135	0,736	0,000	0,000	0,216	1,105	0,135	0,487

Cromo	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM	
	Média	Desvio Padrão																				
BD01	93,192	15,845	100,000	7,640	91,804	15,065	40,093	42,939	41,176	29,423	36,352	22,039	17,118	26,497	16,656	16,483	16,457	17,103	7,072	7,405	5,221	3,828
BD03	57,420	19,683	61,820	16,203	45,861	13,727	59,359	9,393	52,722	10,581	55,705	6,626	48,844	13,194	51,454	10,803	39,150	9,792	43,922	12,984	39,523	14,831
BD10	77,945	16,175	72,187	14,204	58,939	16,018	48,476	7,569	40,798	10,583	33,459	9,026	33,308	5,640	37,825	6,950	40,836	10,335	41,475	7,141	41,852	9,640
BD22	75,944	6,406	84,940	3,202	76,491	1,491	65,010	5,341	66,252	11,190	56,660	15,136	57,356	4,994	57,505	7,894	66,948	3,193	79,076	3,170	77,883	14,559
BD37	45,041	4,843	55,084	2,691	33,094	12,978	28,322	3,920	28,571	9,152	20,493	2,734	18,653	1,672	16,875	0,742	18,559	0,843	28,041	23,756	20,306	2,736
BD63	69,352	13,303	72,874	7,823	61,296	7,018	57,692	8,058	61,174	5,626	57,652	7,927	54,251	2,955	50,486	4,191	53,401	3,065	56,437	4,172	50,202	7,489
BD11	86,510	1,340	75,933	3,377	69,085	3,253	67,399	2,013	66,530	0,898	67,041	1,812	62,443	0,926	55,595	2,005	48,288	1,843	36,995	3,292	25,192	1,865
BD50	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	87,500	5,565	73,428	7,997	65,344	3,493	56,138	2,872	50,225	3,130	43,039	5,633
BD65	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	98,242	2,279	86,697	6,606	82,875	13,319	57,187	7,528	44,419	5,379	42,355	7,466
BD115	100,000	5,590	100,000	3,373	92,318	8,257	93,894	8,583	90,348	9,812	86,671	10,571	79,842	8,783	68,286	7,571	65,292	24,151	44,123	7,950	47,275	3,246
BD47	100,000	0,000	100,000	1,552	98,631	4,577	97,995	4,738	98,484	6,097	96,137	6,038	95,452	7,460	94,377	6,731	94,034	6,777	87,090	19,404	86,161	18,875
BD82	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	4,174	95,662	4,482	84,840	7,920
BD129	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,271	100,000	2,778	100,000	8,326	91,735	7,923	75,508	13,541
BD44	100,000	0,000	100,000	0,150	100,000	1,660	97,717	3,124	94,442	2,193	82,723	3,340	74,752	4,763	70,099	13,250	48,557	4,361	39,681	2,795	30,633	1,223
BD46	100,000	0,988	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	2,285	94,243	3,739	83,701	5,189	68,486	3,999
BD48	100,000	4,242	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	26,943	100,000	40,689	100,000	6,991	100,000	42,889	98,850	1,807	89,920	4,182	79,690	11,751	77,520	13,517
BD68	96,896	3,882	100,000	0,832	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	2,764	99,520	3,071	96,896	6,839	68,551	15,669
BD99	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	82,932	26,684	43,070	16,463	25,315	7,522	25,344	0,957	18,213	1,737	16,037	1,615	15,464	1,880
BD104	9,868	2,318	9,156	7,869	8,224	0,731	0,000	0,000	0,000	0,000	2,138	1,669	0,000	0,000	0,000	0,202	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD31	15,713	9,721	4,475	4,707	0,937	1,105	0,104	0,763	0,728	1,274	0,937	1,363	1,145	0,551	0,000	0,194	0,937	0,806	0,832	1,179	1,145	0,571
BD42	90,480	9,880	69,892	17,505	22,059	5,793	14,319	0,147	15,015	2,015	15,093	1,227	17,105	1,033	14,783	1,941	16,563	1,562	16,099	1,631	28,638	15,358
BD55	22,211	2,224	28,296	11,512	0,203	0,462	0,000	0,774	1,420	0,980	1,521	1,283	2,028	1,764	0,710	1,341	2,535	0,339	1,420	1,396	2,028	1,425
BD56	86,388	9,226	83,726	8,786	98,484	3,452	72,675	1,363	72,372	1,350	71,462	2,109	70,485	2,950	68,093	2,664	63,713	9,881	69,373	2,161	71,631	3,535
BD57	26,600	13,213	42,306	23,119	32,547	2,642	16,568	7,679	1,770	1,226	1,634	1,202	1,180	1,048	1,180	0,788	1,226	0,796	0,999	0,775	1,135	0,338
BD73	80,758	13,064	71,245	10,488	31,187	8,122	15,451	4,496	16,953	3,049	19,528	2,216	18,884	8,192	14,235	3,851	15,236	3,925	17,024	3,996	25,751	5,295
BD77	16,983	1,551	16,034	2,440	10,484	7,311	15,560	1,878	10,199	6,848	9,345	6,393	7,685	9,725	3,605	5,325	3,890	3,496	1,613	0,558	0,949	0,777
BD81	82,061	3,874	75,452	21,292	33,124	9,911	25,098	3,446	25,806	9,907	26,436	9,901	21,243	6,284	18,804	6,589	18,017	2,519	27,065	15,942	28,167	2,748
BD94	97,719	2,232	98,786	2,006	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	13,166
BD111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,856	0,394	0,207	0,504	1,388	0,221	1,358	1,518	1,303	1,136

Arsenato	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM	
	Média	Desvio Padrão																				
BD01	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	2,750	5,244	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,084	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD03	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	29,241	32,509	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD10	100,000	19,044	100,000	9,358	92,324	18,716	93,278	19,318	92,281	22,711	93,018	26,017	77,363	22,826	76,756	21,401	76,886	19,706	80,312	22,837	72,290	21,359
BD22	87,905	10,339	77,429	7,653	82,619	10,038	83,238	3,970	76,143	11,286	61,667	30,619	68,000	24,367	71,286	51,435	71,190	21,711	62,810	43,350	55,333	46,753
BD37	10,285	3,386	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,090	0,000	0,000	0,386	0,690	0,000	0,405
BD63	81,168	0,850	86,365	11,721	79,768	1,349	72,851	1,755	75,890	1,293	71,132	6,143	7,997	17,218	0,000	0,000	0,478	0,000	0,068	0,600	0,902	0,000
BD11	86,959	8,570	89,202	2,095	89,984	2,521	90,975	3,291	89,724	3,674	91,288	4,603	88,419	4,758	86,176	5,819	86,959	5,302	81,742	4,634	84,977	1,084
BD50	96,904	1,882	96,053	4,156	90,944	3,668	90,325	4,369	87,461	5,149	85,217	6,398	84,598	8,225	84,598	1,710	84,598	4,838	83,901	4,128	88,158	5,545
BD65	92,785	3,064	90,535	2,340	88,596	4,617	88,363	4,110	83,863	7,640	85,493	5,054	84,329	7,487	81,769	1,580	82,700	3,721	81,458	2,861	83,708	2,370
BD115	100,000	0,336	100,000	14,560	85,834	6,615	78,576	4,906	70,202	4,129	68,597	6,905	63,922	5,501	63,154	3,104	65,108	2,937	63,433	1,696	64,131	1,841
BD47	94,727	2,370	89,223	2,245	80,574	3,161	76,735	3,183	70,768	5,847	75,439	2,518	81,452	1,367	81,175	2,268	81,452	12,229	85,245	1,760	73,127	6,463
BD82	98,376	2,267	97,322	5,235	96,005	5,156	96,049	4,451	93,766	4,033	93,196	4,835	94,952	5,539	93,766	2,017	93,020	5,797	93,766	3,594	95,698	4,755
BD129	92,944	7,216	89,144	8,441	90,104	10,685	88,894	10,147	90,021	9,572	91,441	13,421	88,142	10,232	85,511	10,041	84,551	9,383	85,219	9,969	86,180	7,418
BD44	100,000	1,699	95,952	4,460	92,829	4,746	93,841	5,980	89,265	5,492	89,837	3,442	86,274	3,222	86,802	4,095	88,341	2,827	83,062	3,618	92,037	5,648
BD46	99,156	1,955	97,774	2,166	94,589	1,960	93,054	1,773	92,978	1,470	91,827	1,843	90,944	2,742	89,908	1,955	89,870	1,807	85,342	3,297	93,170	1,060
BD48	100,000	17,209	100,000	15,447	100,000	5,172	100,000	4,811	100,000	6,186	100,000	7,026	100,000	6,720	100,000	7,637	100,000	7,866	100,000	9,241	100,000	3,742
BD68	100,000	0,000	100,000	0,510	100,000	0,510	100,000	0,191	100,000	1,499	100,000	1,601	100,000	2,039	100,000	3,215	100,000	2,771	100,000	2,833	100,000	2,201
BD99	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	1,711	100,000	1,982	100,000	3,873	100,000	3,152	100,000	2,432	100,000	3,873	97,716	5,855
BD104	100,000	4,131	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000
BD31	97,792	4,122	100,000	2,865	91,134	6,988	91,546	5,950	84,948	5,701	85,773	5,330	84,742	2,712	83,814	1,563	85,876	0,882	87,629	10,571	75,567	20,475
BD42	93,384	3,384	87,521	3,247	82,496	2,421	81,407	2,435	85,176	0,708	81,742	3,571	77,889	2,139	80,067	2,618	81,407	4,243	86,013	5,657	80,318	15,749
BD55	97,701	5,522	92,268	1,759	94,671	0,249	94,775	2,577	100,000	7,971	87,356	3,744	92,163	2,438	92,476	4,279	91,641	0,509	100,000	2,657	82,968	17,983
BD56	94,676	0,958	86,987	2,224	75,353	13,709	82,320	2,037	74,860	3,600	73,053	4,909	74,565	3,803	71,443	4,013	73,184	4,953	74,466	4,384	74,433	4,037
BD57	97,038	3,047	94,973	2,613	91,517	3,722	90,844	2,073	87,388	4,766	87,837	5,888	84,022	6,639	83,079	3,201	85,323	3,070	86,445	5,252	93,806	5,245
BD73	83,426	2,155	85,170	3,819	81,047	3,181	79,144	2,608	75,099	0,991	79,857	1,004	77,320	2,078	71,372	0,980	70,182	1,062	74,941	8,021	78,668	19,113
BD77	98,938	1,521	95,509	2,870	89,039	3,571	93,385	2,251	89,908	2,858	88,943	2,556	88,653	5,159	88,073	1,231	90,150	0,626	95,171	3,980	88,363	15,140
BD81	85,973	6,407	81,222	4,747	77,074	3,630	77,300	3,650	72,247	4,097	72,549	3,629	74,811	15,541	68,627	3,191	73,454	2,382	73,906	11,580	74,057	12,233
BD94	100,000	0,000	100,000	0,331	98,582	0,183	98,467	0,065	99,003	2,297	99,502	0,545	97,815	0,751	97,317	0,644	94,941	0,704	99,732	2,390	87,083	15,283
BD111	82,106	8,770	79,807	10,970	80,573	7,703	78,441	10,854	88,504	12,068	88,637	8,017	87,704	9,425	84,605	11,278	88,371	10,350	83,439	8,978	84,372	12,510

Arsenito	0.5 mM		1 mM		2 mM		3 mM		4 mM		5 mM		6 mM		7 mM		8 mM		9 mM		10 mM	
	Média	Desvio Padrão																				
BD01	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,713	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD03	100,000	0,000	15,358	14,324	0,000	0,000	0,000	0,000	2,139	0,000	11,447	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
BD10	100,000	2,739	100,000	0,000	100,000	0,000	5,204	100,000	2,136	100,000	0,767	100,000	5,501	100,000	5,149	100,000	3,780	100,000	0,931	97,668	10,987	
BD22	95,641	5,230	94,289	4,405	95,291	0,248	73,046	1,114	94,739	2,362	89,078	2,816	77,355	14,000	74,349	15,943	65,080	15,794	59,820	12,335	66,182	7,125
BD37	17,660	1,113	9,135	0,423	0,000	0,243	0,000	0,000	0,487	0,000	0,261	0,000	0,110	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,978	1,052	0,244	0,515
BD63	92,385	0,768	100,000	11,685	54,950	38,849	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,561	0,458	0,361	0,214
BD11	100,000	2,331	100,000	0,000	100,000	0,000	96,064	2,474	95,426	3,484	97,340	2,502	97,074	2,723	97,128	1,706	98,404	3,227	97,340	1,869	100,000	1,963
BD50	98,511	3,092	100,000	0,000	100,000	0,000	99,060	6,254	97,100	5,659	96,003	7,572	95,455	6,483	91,536	5,994	91,379	5,394	100,000	2,772	100,000	4,639
BD65	94,182	4,069	98,742	4,419	100,000	2,665	86,557	18,757	87,107	7,870	90,409	8,210	89,780	6,654	86,635	6,508	89,623	6,774	98,664	4,006	97,013	6,728
BD115	85,948	3,205	80,915	2,047	78,301	0,540	68,824	9,672	71,961	4,483	69,935	1,366	66,928	1,319	65,425	0,306	65,098	1,578	84,248	18,460	67,190	5,297
BD47	93,871	3,374	83,410	1,672	79,954	5,234	76,267	5,951	76,083	5,638	84,839	3,015	88,848	8,496	81,567	10,237	77,235	4,181	70,922	5,945	76,866	3,548
BD82	97,727	1,356	97,913	3,250	93,738	1,683	90,213	2,484	98,933	2,623	97,032	1,829	98,377	2,172	95,640	1,592	98,145	2,302	100,000	1,074	96,521	2,769
BD129	91,649	4,821	90,573	7,412	88,894	4,557	87,731	7,588	90,099	4,932	90,013	6,876	89,066	6,498	87,172	4,377	87,000	5,208	90,917	6,818	88,549	6,423
BD44	96,906	1,046	91,547	1,586	81,656	1,953	75,163	0,596	88,932	4,203	89,542	2,155	87,669	2,664	89,586	0,929	89,194	2,164	88,976	1,617	95,251	2,133
BD46	100,000	0,564	100,000	0,914	97,190	2,315	86,721	13,421	82,756	20,753	94,034	2,301	94,881	2,392	93,880	1,802	94,342	2,283	94,996	1,879	90,531	9,443
BD48	100,000	2,218	95,136	1,310	89,273	1,620	82,409	1,608	92,909	1,929	84,727	13,474	88,864	2,748	87,955	6,264	90,182	2,391	89,545	0,864	94,364	3,464
BD68	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	1,431	100,000	0,995	100,000	0,995	100,000	0,995	100,000	1,555	100,000	0,311	100,000	2,489
BD99	90,846	16,109	92,766	15,567	89,715	16,036	84,990	17,264	92,618	15,432	91,043	16,380	88,829	18,478	89,961	18,139	89,173	18,613	88,041	19,290	89,469	18,884
BD104	96,435	11,878	96,295	10,497	98,546	11,119	99,437	10,359	100,000	8,633	100,000	6,837	97,373	10,359	100,000	9,945	100,000	7,873	100,000	9,945	100,000	9,185
BD31	100,000	2,690	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	1,509	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,377	100,000	0,943	100,000	0,000
BD42	86,012	5,208	86,428	4,123	84,097	5,258	80,683	4,379	82,848	3,572	82,598	5,229	80,100	6,114	84,430	3,218	92,590	12,161	87,760	4,069	96,253	4,473
BD55	100,000	0,177	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	1,810	99,176	2,869	99,176	3,731	100,000	1,421	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000
BD56	95,997	4,348	88,545	3,966	80,735	3,315	81,451	2,048	79,011	1,392	78,425	2,522	77,904	2,364	78,620	2,580	80,312	3,625	79,336	2,423	79,824	3,863
BD57	96,789	5,191	93,804	4,914	90,819	2,616	92,085	3,639	90,231	1,312	91,045	3,919	90,954	3,871	90,366	4,007	94,527	6,633	97,196	7,714	100,000	4,987
BD73	81,745	5,082	86,469	4,778	81,906	2,389	78,943	4,068	77,822	2,032	84,227	3,162	80,705	1,220	79,584	6,825	83,026	8,556	77,662	4,123	89,191	3,656
BD77	99,228	1,082	97,009	1,859	95,369	0,900	91,848	1,721	90,642	2,637	90,642	2,415	94,115	2,585	90,883	1,521	92,378	0,643	93,970	1,447	100,000	0,931
BD81	80,350	1,432	85,072	3,861	76,771	4,498	77,913	6,183	81,417	10,393	80,198	10,605	77,913	5,577	73,343	0,134	78,675	3,067	71,744	1,028	81,569	2,276
BD94	99,549	1,828	97,667	2,685	97,103	1,130	96,501	3,156	97,178	2,819	96,727	2,613	99,059	3,093	95,899	2,121	96,200	3,502	95,260	1,826	96,953	2,934
BD111	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000	84,158	5,029	87,569	2,253	84,818	3,493	84,635	2,913	84,268	1,901	85,002	2,524	84,635	3,293

