
Dissertação de Mestrado

**OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A METAIS
PESADOS EM SEDIMENTOS DA BAÍA DO ARAÇA, SÃO SEBASTIÃO (SP)**

Bruna Del Busso Zampieri

**RIO CLARO / SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO



Bruna Del Busso Zampieri

**OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A
METAIS PESADOS EM SEDIMENTOS DA BAÍA DO ARAÇA, SÃO
SEBASTIÃO (SP)**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio
Claro, da Universidade
Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em
Microbiologia Aplicada.**

Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira

**Rio Claro – SP
2015**

589.9 Zampieri, Bruna Del Busso
Z26o Ocorrência e distribuição de bactérias resistentes a metais
 pesados em sedimentos da Baía do Araça, São Sebastião (SP)
 / Bruna Del Busso Zampieri. - Rio Claro, 2015
 78 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira

 1. Bacteriologia. 2. Resistência. 3. Porto. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais Cláudio e Rosana, meus grandes incentivadores que sempre me fizeram acreditar no meu potencial e tornar meus sonhos realidade. Esse trabalho só foi possível graças a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Ana Julia Fernandes, que não mediu esforços para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

Agradeço ao Micromar e a todos seus integrantes, especialmente Aline Bartelochi Pinto por seus conselhos e sua contribuição neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos de Oliveira que possibilitou a realização das análises moleculares e sempre teve a maior disposição em me ajudar. Também aos integrantes do laboratório LABIMES, especialmente ao Leonardo Schultz pela sua paciência e amizade.

Agradeço aos meus pais, meus principais incentivadores, a quem este trabalho é dedicado.

Agradeço as minhas queridas amigas que sempre estiveram do meu lado, e me faziam companhia nas horas de alegria e de frustração.

Agradeço ao meu namorado, Gabriel Leleko, que sempre me escutou contar todos os passos e atividades desse mestrado e por todo seu apoio nas horas difíceis.

Agradeço à UNESP – Campus de Rio Claro e a UNESP- Campus do Litoral Paulista e a todos seus mestres que me fizeram a bióloga que sou hoje.

Agradeço a Capes e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Agradeço a Profa Cecília Amaral, coordenadora do projeto Biota Araça, projeto qual este mestrado é vinculado.

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.

Cora Coralina

Ocorrência e distribuição de bactérias resistentes a metais pesados na Baía do Araça, São Sebastião (SP)

RESUMO

Uma das grandes preocupações ecológicas atuais refere-se ao impacto ambiental causado pela liberação antrópica de metais pesados em ambientes naturais, uma vez que esses poluentes são extremamente ubíquos e persistentes. Em altas concentrações metais pesados são extremamente tóxicos a bactérias, sendo capazes de influenciar na sua densidade e atividade metabólica. Por sua vez, bactérias são capazes de desenvolver mecanismos de resistência a metais pesados sendo importantes em estudos de biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a ocorrência e distribuição de bactérias resistentes a metais pesados na Baía do Araça em São Sebastião, SP. Do total de cepas isoladas, 12% foram sensíveis a todos os metais. Foi possível observar que a maior porcentagem de cepas resistentes se encontravam na região de sublitoral que é mais próxima ao canal de São Sebastião onde se concentra a atividade portuária. As cepas isoladas foram mais resistentes ao Cr, seguido de Zn, Cd e Cu. Em relação a concentração mínima inibitória, para o Cd foram poucas as cepas que resistiram a concentrações maiores que 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já para o Cr, 36% das cepas cresceram mesmo na concentração de 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para Zn e Cu, poucas cepas (4% e 2%, respectivamente) cresceram na concentração 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e nenhuma conseguiu resistir à maior concentração (3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). *Bacillus* sp foi o genero com maior frequência de isolados, o que pode sugerir dominância em áreas contaminadas por metais pesados, especialmente as espécies *Bacillus cereus* e *Bacillus pumilus*. *Staphylococcus* sp, *Planococcus maritimus* e *Vibrio alginoticus* também foram isolados sugerindo potencial para utilização em processos de biorremediação.

Palavras-chave: resistência; metais pesados; São Sebastião; porto; bactérias; *Bacillus* sp.

Occurrence and distribution of heavy metal resistant bacteria from Araça Bay, São Sebastião (SP).

ABSTRACT

One of the major ecological concerns, nowadays, refers to anthropogenic environmental impact caused by heavy metals release in diverse natural environments, since these pollutants are extremely persistent and pervasive. At high concentration heavy metals are extremely toxic to bacteria, being able to influence the density and metabolic activity. However, bacteria are capable to develop heavy metal resistance mechanisms in the environment, being important in bioremediation of contaminated areas. Therefore, the purpose of the study was to assess the occurrence and distribution of heavy metal resistance bacteria in Araça Bay, São Sebastião - SP. 12% of the isolated bacteria were sensitive to all metals. It was observed that the highest percentage of resistant strains were in the subtidal region that is closest to the São Sebastião channel, where port activity are concentrated. Bacterial isolates were more resistant to Cr, followed by Zn, Cd and Cu. Regarding the minimum inhibitory concentration, a lower number of strains resisted levels greater than 200 mg L⁻¹ for Cd. While for Cr, 36% of the strains grew even at a concentration of 3200 mg L⁻¹. For Zn, Cu, few strains (4% and 2%, respectively) grew in higher concentrations like 1600 mg L⁻¹ and none could withstand the highest concentration (3200 mg L⁻¹). *Bacillus* sp was the most isolated genera and may be a dominant genre in heavy metal contaminated areas, especially species *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus*. *Staphylococcus* sp, *Planococcus maritmus* and *Vibrio aginoliticus* were also isolated and have potential for use in bioremediation of contaminated sites.

Keywords: resistance, heavy metals, *Bacillus* sp, port activity, contamination.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Contaminação por metais pesados	11
2.2. Bactérias resistentes a metais pesados	12
2.3. Mecanismos de resistência	14
2.3.1. Exclusão de metais por barreiras permeáveis	14
2.3.2. Transporte ativo de metais	15
2.3.3. Sequestro intracelular de metais.....	16
2.3.4. Sequestro extracelular	17
2.3.5. Redução da sensibilidade de alvos celulares	18
2.3.6. Detoxificação enzimática	18
2.4. Potencial para biorremediação	19
2.5. Potencial de bactérias de origem marinha.....	20
3.OBJETIVO.....	21
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Área de estudo	21
4.2. Coleta de amostras.....	23
4.3. Isolamento de bactérias.....	25
4.4. Armazenamento	26
4.5. Identificação	27
4.6. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	28
4.7. Análises dos metais pesados	29
4.8. Análise do sedimento	30
4.9. Análises estatísticas	31
5.RESULTADOS	31
5.1. Dados físico-químicos	31
5.2. Densidade bacteriana.....	34
5.3. Resistência aos metais pesados	36
5.4. Identificação de bactérias	47
6.DISSCUSSÃO	52
6.1. Dados físico-químicos	52
6.2. Densidade bacteriana.....	53
6.3. Bactérias resistentes aos metais pesados.....	54
7.CONCLUSÃO.....	59
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações ecológicas atuais refere-se ao impacto ambiental causado pela liberação antrópica de metais pesados nos diversos ambientes naturais e naqueles de maior interação com populações humanas (JESUS et al., 2004). Esse tipo de poluição gera grande preocupação, pois metais pesados são poluentes ubíquos e persistentes no ambiente (ANDRADE et al., 2001).

O ambiente marinho é usado como local de despejo de efluentes contaminados de inúmeras indústrias, como local de exploração de petróleo e como vias de transporte de embarcações de grande porte, cuja atividades podem gerar contaminação por metais pesados (TEITEZEL & PARSEK, 2003). Dessa maneira, a preocupação com os impactos gerados por metais pesados no ambiente marinho é crescente, pois no mar esses contaminantes são acumulados principalmente no sedimento, e sua deposição gera toxicidade à biota aquática (YANG & ROSE, 2003).

As indústrias estão entre as principais geradoras de contaminação por metais pesados, especialmente a indústria siderúrgica que por utilizar os metais pesados como matéria prima acaba liberando para o meio ambiente ampla variedade de produtos poluentes (TEITEZEL & PARSEK, 2003).

As atividades portuárias também podem causar forte impacto ambiental em áreas estuarinas. Os metais traço, tanto essenciais como não essenciais, encontram-se entre os principais constituintes dos aportes de atividades portuárias (HORTELLANI et al., 2008). Perdas durante as cargas/descargas, armazenamento, transferências de produtos químicos, lavagens de “isocontainers” assim como atividades de manutenção com lavagem de porões e lixiviação de cascos e tintas constituem-se fontes de materiais poluentes para águas do sistema estuarino em questão (HORTELLANI et al., 2008).

Os metais são tidos como poluentes críticos no ambiente marinho devido sua capacidade de se acumular, ser tóxico e de se incorporar na cadeia alimentar (ANDRADE et al., 2001; MASHIATULLAH et al., 2013).

Além disso, esse tipo de contaminante pode alterar a qualidade de águas de consumo e de habitats marinhos e estuarinos, alterando comunidades macro e microbiológicas (IVORRA et al., 2000). Como sedimentos são capazes de incorporar e acumular elementos contaminantes tem sido amplamente utilizados como indicadores ambientais.

Como sedimentos são capazes de incorporar e acumular elementos contaminantes tem sido amplamente utilizados como indicadores ambientais, podendo apresentar também grande abundância de microrganismos, que representam o primeiro passo para transferência desses compostos tóxicos aos níveis tróficos superiores da cadeia alimentar (GILLAN et al., 2005).

É importante destacar que metais pesados apresentam papel importante nos processos que envolvem microrganismos. Metais como cálcio, zinco, níquel, ferro, potássio, magnésio, manganês, cobalto são nutrientes essenciais em baixas concentrações. Esses elementos participam de reações bioquímicas de catálise, estabilizadores de proteínas e da parede celular bacteriana, além de manter o balanço osmótico da célula (HUGHES & POOLE, 1989; POOLE & GADD, 1989; JI & SILVER, 1995).

Em contrapartida, metais em altas concentrações são tóxicos aos microrganismos pois podem causar alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas, além de interferir na fosforilação oxidativa e balanço osmótico (POOLE & GAD, 1989).

Portanto, metais pesados podem mudar o tamanho, a composição e a atividade da comunidade microbiana (GILLER, 1998). O estresse abiótico causado por metais, nas suas formas orgânica e inorgânica, pode afetar o crescimento, morfologia e metabolismo de bactérias (DOELMAN, 1985; DUXBURY, 1985).

Apesar disto, microrganismos apresentam papel importante na manutenção e equilíbrio de qualquer ambiente, também sendo capazes de se ajustar rapidamente a diferentes modificações ambientais (DASH et al., 2013), inclusive à presença de metais.

Bactérias desenvolveram mecanismos para combater o estresse causado pelos metais pesados. Esses mecanismos incluem a formação e fixação desses metais em complexos, redução de um metal a uma espécie menos tóxica ou efluxo direto de metais pesados para fora da célula (NIES,

1999; OUTTEN et al., 2000). Portanto, bactérias que crescem em ambiente contaminado por esses poluentes desenvolvem sistemas de tolerância, podendo ser utilizadas como indicadoras de contaminação por metais pesados (DIAZ-RAVINA & BAATH, 1996).

Como esses microrganismos são capazes de transformar tais compostos tóxicos em compostos menos tóxicos ou atóxicos, apresentam grande potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação de solos e sedimentos contaminados (RAINBOW, 1995).

Pesquisas com objetivo de identificar bactérias resistentes a metais pesados tem se desenvolvido desde 1970 (BRUINS et al., 2000). Essas pesquisas incluem muitos microrganismos aeróbios, tendo como os principais *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Bacillus* sp. (NAKAHARA et al., 1977; MARQUES et al., 1979; SCHWARZ & HOBEL, 1989; BELLIVEAU et al., 1991).

Entretanto, existe um grande obstáculo para realização de biorremediações *in situ*, como as condições adversas encontradas em ambientes naturais tais como baixa ou elevada temperatura, pH ácido ou alcalino, pressão alta ou alta concentração de sais (DASH et al., 2013).

As bactérias de origem marinha são microrganismos adaptados a viverem nessas condições extremas e de grande variação, apresentando, portanto, grande potencial para realização de biorremediação *in situ* de ambientes contaminados por metais pesados (DASH et al., 2013).

No Brasil, quando se trata de isolamento e monitoramento de bactérias resistentes a metais pesados pouquíssimos estudos são realizados no ambiente marinho. Esse fator torna mais relevante os estudos em áreas costeiras e estuarinas, pois grande parte do esgoto brasileiro é despejada diretamente nesses locais sem tratamento. O problema ainda é maximizado por essas áreas serem atrativos turísticos e onde se encontram grande adensamento populacional, além da presença de rica e importante biodiversidade. Portanto, são necessários estudos para o isolamento e monitoramento de bactérias resistentes a metais pesados no ambiente marinho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminação ambiental por metais pesados

Metais pesados são elementos químicos que apresentam massa específica elevada, sendo maior ou igual a um determinado valor de referência que varia entre 3,5 e 7,0 g/cm³, sendo associado como uma substância tóxica, geralmente proveniente de um descarte inadequado de um rejeito no meio ambiente. Definições mais recentes nomeiam esses elementos químicos como elementos traços, por se apresentarem em concentrações muito baixas no meio ambiente (DUFFUS, 2002).

Os metais pesados ocorrem naturalmente nos solos e alguns deles, tais como cobre (Cu), zinco (Zn) e cobalto (Co), desempenham importante papel na nutrição de plantas e animais, enquanto outros, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As) e selênio (Se), exercem efeitos deletérios sobre vários componentes da biosfera (ALLOWAY, 1995). Mas aumentos da sua concentração no ambiente devido atividades poluidoras vem se destacando no cenário de poluição ambiental.

A poluição por metais pesados consiste, atualmente, como uma das grandes preocupações ecológicas. Ela está relacionada a atividades antrópicas e tem maior relevância quando ocorre em ambientes de maior interação com populações humanas (PHILLIPS, 1977).

Diversas atividades geram poluentes como os metais pesados. As indústrias estão entre as principais, especialmente a indústria siderúrgica que por utilizar os metais pesados como matéria prima, acabam liberando para o meio ambiente ampla variedade de produtos poluentes, dentre os quais se destacam os metais pesados como manganês e chumbo (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Outras indústrias que produzem efluentes com metais pesados dissolvidos por consequência de seus processos são as indústrias de mineração e de galvanoplastia, termoelétricas e os curtumes.

Muitas dessas indústrias estão situadas próximas a bacias hidrográficas e regiões estuarinas, áreas que acabam recebendo grande carga de efluentes contaminados com metais pesados.

As atividades portuárias acabam causando forte impacto ambiental em áreas estuarinas. Os metais traço, tanto essenciais como não essenciais, encontram-se entre os principais constituintes dos aportes de atividades portuárias (HORTELLANI *et al.*, 2008).

Perdas durante as cargas/descargas, armazenamento, transferências de produtos químicos, lavagens de “isocontainers” assim como atividades de manutenção com lavagem de porões e lixiviação de cascos e tintas constituem-se fontes de materiais poluentes para águas do sistema estuarino em questão (HORTELLANI *et al.*, 2008).

Como sedimentos são capazes de incorporar e acumular elementos contaminantes têm sido amplamente utilizados como indicadores ambientais. Como podem ser lavados pelos rios para outro curso d’água ou para o mar, as análises de vários pontos de uma região de interesse servem para rastrear fontes de contaminação e/ou monitorar esses contaminantes (PEREIRA *et al.*, 1998).

Dessa maneira, sedimentos costeiros marinhos têm sido considerados o maior depósito de metais pesados, o que leva a uma consequência ecológica pela sua alta persistência e toxicidade, mesmo em concentrações traço (CHAPMAN *et al.* 1998; DELL’ANNO *et al.*, 2003).

2.2. Bactérias resistentes aos metais pesados

O surgimento de bactérias resistentes a metais pesados se deu devido a uma pressão seletiva em ambientes contaminados por metais em que micro-organismos que apresentassem mecanismos de resistência, acabavam por apresentar vantagens sobre outros (ROUCH *et al.*, 1995).

Pesquisas com objetivo de identificar bactérias resistentes a metais pesados tem se desenvolvido desde 1970 (BRUINS *et al.*, 2000). Essas pesquisas incluem muitos micro-organismos aeróbios, tendo como os principais *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Bacillus* sp.

(NAKAHARA *et al.*, 1977; MARQUES *et al.*, 1979; HARNETT & GYLES, 1984; SCHWARZ & HOBEL, 1989; BELLIVEAU *et al.*, 1991).

Além disso, muitos mecanismos de resistência aos metais como mercúrio, arsênio, ferro, cádmio, zinco, cobalto, níquel entre outros metais pesados presentes em algumas bactérias já foram descritos na literatura (SILVER, 1996; MISRA, 1992; ROSENTEIN *et al.*, 1992; COOKSEY, 1994; SOLIOZ *et al.* 1995).

A sobrevivência microbiana em ambientes poluídos depende de suas propriedades bioquímicas e estruturais, fisiológicas, e/ou adaptações genéticas que incluem modificações morfológicas, assim como modificações ambientais na especiação de metais (WUERTZ & MARGEAY, 1997). Microrganismos apresentam vários tipos de mecanismos de resistência em resposta às concentrações de metais pesados (NIES, 2003). Esses mecanismos podem ser codificados através de genes cromossomais, mas usualmente o loci que confere resistência está localizado nos plasmídeos (CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994).

Atualmente, o uso de técnicas da biologia molecular permitem acessar genes que conferem resistência à bactérias e investigar as respostas bacterianas para o estresse ambiental e revelar os mecanismos moleculares para a adaptação (ABOU-SHANAB *et al.*, 2007).

Estudos com objetivo de identificar bactérias resistentes a metais pesados bem como seus mecanismos de resistência tem se intensificado. Existem dois fatores principais que motivam diversas pesquisas. O primeiro é que existe grande potencial de que esses microrganismos testados sejam capazes de realizar biorremediação *in situ* de solos contaminados, sendo capazes de solucionar problemas de poluição ambiental muito importantes.

Mas existe também o fator ecológico, pois a contaminação por metais pesados pode alterar toda dinâmica da comunidade microbiana. Por exemplo, em sedimentos marinhos, bactérias apresentam papel importante na reciclagem de nutrientes inorgânicos e orgânicos, bem como na transferência de energia e matéria para níveis tróficos mais altos (OSINGA *et al.*, 1996; FABIANO & DANOVARO, 1998). Dessa maneira, o impacto de metais pesados em bactérias bênticas pode ter consequências importantes tanto nos ciclos biogeoquímicos quanto na trofodinâmica bentica (FORD, 1994).

Mas é importante destacar que esses efeitos ainda são tão pouco estudados que ainda é difícil extrapolar essa investigação em cepas específicas para os efeitos na comunidade microbiana no ambiente natural (FORD, 2000; DEL'ANNO *et al.*, 2003).

2.3. Mecanismos de resistência

Uma célula pode desenvolver uma série de sistemas de resistência a metais na tentativa de proteger componentes celulares mais sensíveis, limitando o acesso a metais ou alterando componentes celulares, existindo, assim, uma diminuição na sensibilidade (BRUINS *et al.*, 2000).

Diversos fatores determinam a extensão da resistência nos microrganismos: o tipo e o número de mecanismos para absorção de metais, o papel que cada metal tem no metabolismo e a presença de genes localizados nos plasmídeos, cromossomos ou transposons que controlam a resistência a metais (BRUINS *et al.*, 2000).

A seguir são descritos alguns desses mecanismos.

2.3.1. Exclusão de metais por barreiras permeáveis

Alterações na parede celular, membrana ou qualquer outro envelope de microrganismos são exemplos desse tipo de mecanismos de resistência que tem por objetivo proteger componentes celulares essenciais que sejam sensíveis a metais. Um exemplo é a exclusão de Cu^{2+} (II) resultante de uma alteração na produção de uma proteína porina de um canal de membrana pela *E. coli* B (Rouch *et al.*, 1995). Isso consiste de uma mutação de um único gene, o que diminui a permeabilidade da membrana a íons metálicos (JI & SILVER, 1995).

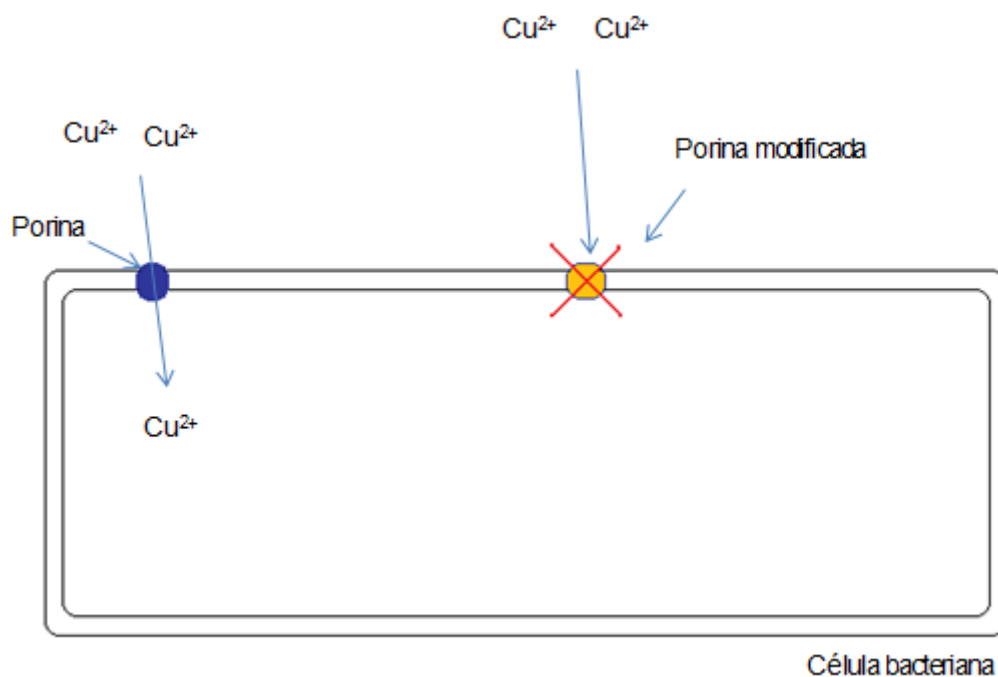


Figura 1 - Esquema simplificado do mecanismo de resistência por exclusão de barreiras permeáveis, em que uma porina modificada impede a passagem de metais para dentro da célula.

2.3.2. Transporte ativo de metais

O transporte ativo ou sistemas de efluxo representam uma grande categoria de sistemas de resistência a metais, pois microrganismos usam transporte ativo para exportar metais tóxicos para fora de seu citoplasma (BRUINS *et al.*, 2000).

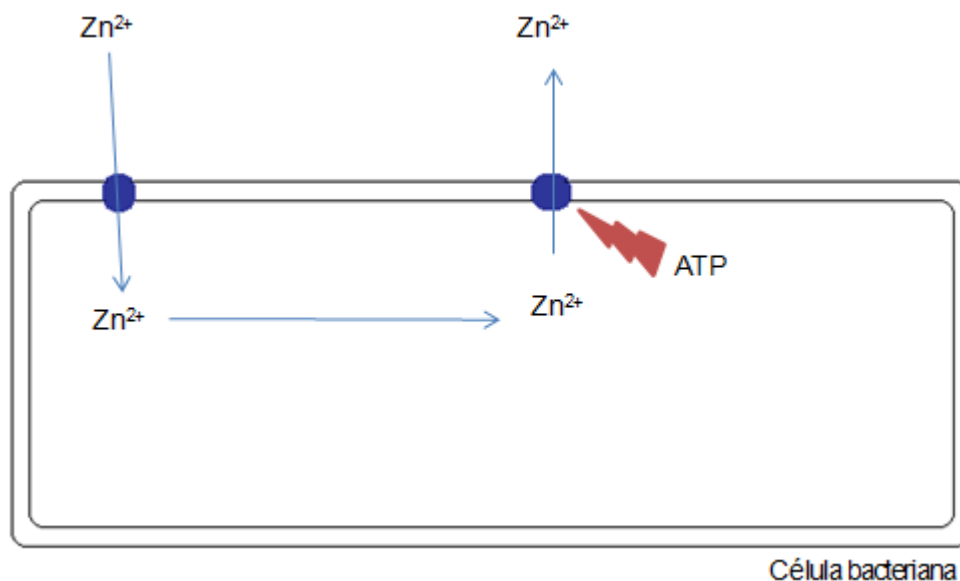


Figura 2- Esquema simplificado do mecanismo de resistência por transporte ativo de metais para fora do microrganismo.

2.3.3. Sequestro intracelular de metais

O sequestro intracelular é o acúmulo de metais no citoplasma da célula bacteriana para prevenir a exposição de componentes celulares essenciais (BRUINS *et al.*, 2000). Um exemplo desse tipo de mecanismo de resistência está presente no gênero *Synechococcus*, em que existe a produção de metalotioneína expresso por dois genes *smt A* e *smt B*. Essa proteína apresenta forte ligação com $Zn(II)$ e $Cd(II)$ (SILVER, 1992).

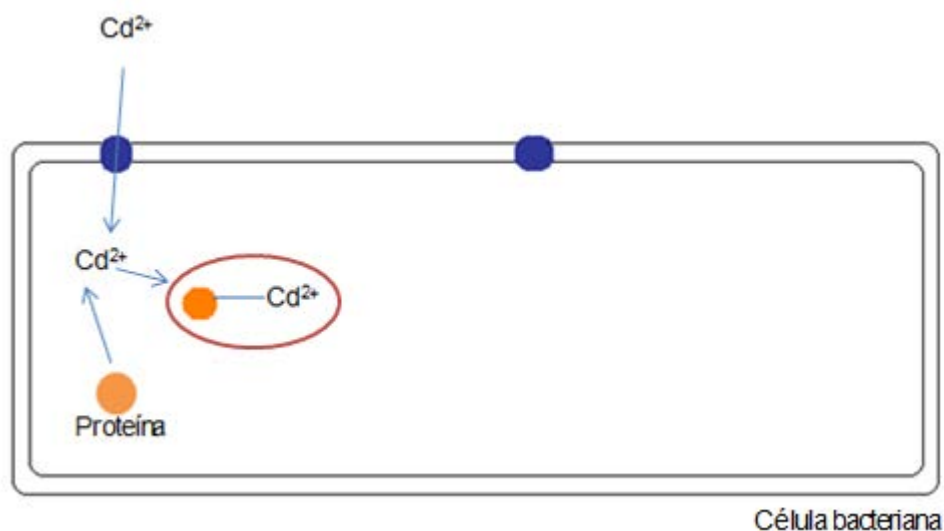


Figura 3 - Esquema simplificado do mecanismo de resistência por sequestro intracelular de metais por proteínas de ligação.

2.3.4. Sequestro extracelular

Esse mecanismo de resistência consiste na produção e excreção de proteínas que são capazes de se ligar fortemente a alguns tipos de metais. Esse tipo de mecanismo foi hipotetizado em bactérias, mas também tem sido encontrado em diversos tipos de fungos e leveduras (JOHO *et al.*, 1995). *Saccharomyces cerevisiae* pode reduzir a absorção de Ni (II) pela excreção de grandes quantidades de glutathiona, proteína com grande afinidade a esse metal (MURATA *et al*, 1985).

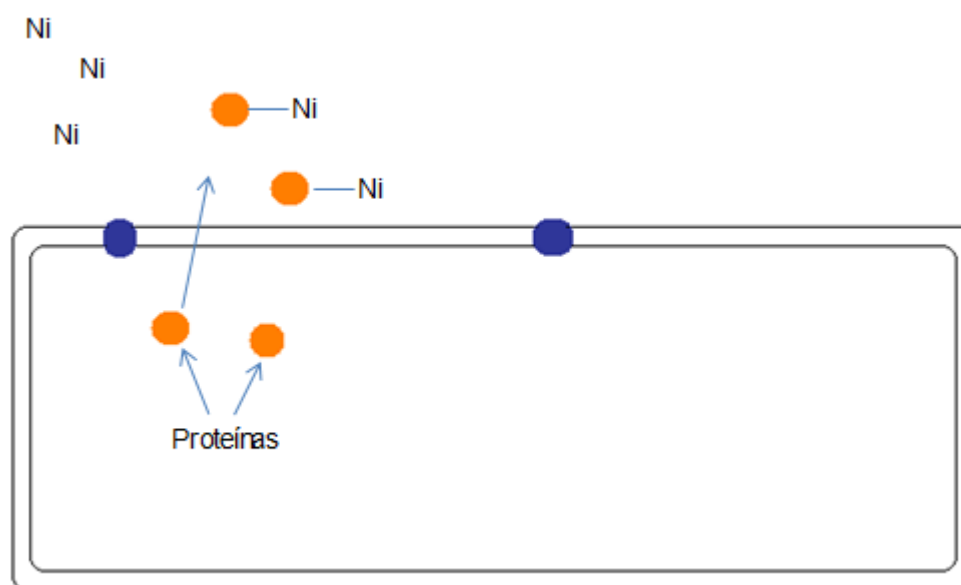


Figura 4 - Esquema simplificado do mecanismo de resistência por sequestro extra-celular.

2.3.5. Redução da sensibilidade de alvos celulares

Alguns microrganismos se adaptaram à presença de metais tóxicos através da alteração da sensibilidade de componentes celulares essenciais (ROUCH *et al.*, 1995). Isso se deve ao fato de ocorrerem mutações nesses componentes que alteram sua sensibilidade a metais mas não comprometem sua função básica. Um exemplo desse tipo de adaptação foi encontrado em cepas de *E. coli* expostas à Cd (II) no trabalho de Mergeay (1991), em que as bactérias desenvolveram mecanismos de reparo do DNA.

2.3.6. Detoxificação enzimática de metais para formas menos tóxicas

Esse mecanismo consiste na transformação de formas tóxicas de metais pesados para suas formas menos tóxicas, realizado por enzimas presentes em alguns microrganismos. Dessa maneira as bactérias conseguem transformar os metais em formas que sejam menos agressivas ao meio ambiente e que causam danos menores na biota.

Resistência ao mercúrio é um exemplo muito estudado de sistema de detoxificação enzimática em microrganismo. Bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp) e gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Thiobacillus ferrooxidans*) demonstram essa resistência (MISRA, 1992).

Essas bactérias contêm um conjunto de genes que formam um operon de resistência à Hg(II) (*mer*). Esse operon não apenas detoxifica o Hg(II) como também transporta e auto-regula a resistência (JI & SILVER, 1995; MISRA, 1992). Esse mesmo conjunto de genes é capaz de codificar proteínas periplasmáticas de ligação e proteínas de transporte associadas a membrana. Essa proteína periplasmática de ligação coleta Hg(II) no ambiente ao redor da célula e as proteínas de transporte levam o metal para o citoplasma para a detoxificação.

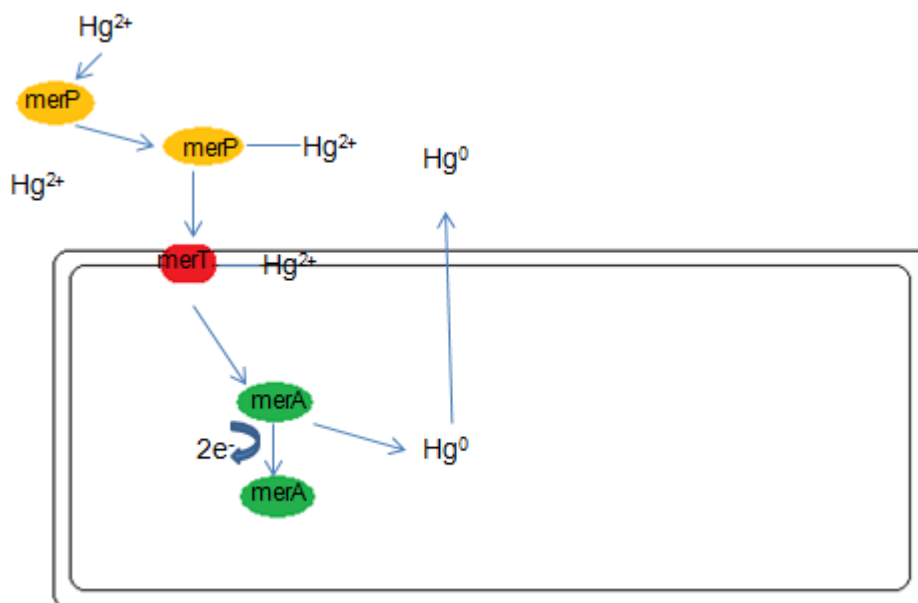


Figura 5 - Esquema simplificado do mecanismo de resistência por detoxificação enzimática de metais para formas menos tóxicas (Modificado de Madigan et al. (2010)).

Esse tipo de mecanismo de resistência é muito estudado em bactérias por terem potencial na realização de biorremediação de ambientes contaminados por metais pesados. Tendo a finalidade de solucionar problemas ambientais causados por esse tipo de poluição e fazer com que a biota não sofra com a toxicidade dessas substâncias.

2.4. Potencial para Biorremediação

Existe uma série de aplicações para os mecanismos de resistência a metais pesados desenvolvidos por bactérias: recuperação de metais através do sequestro ou precipitação bacteriana no esgoto e efluentes industriais, bioacumulação de metais valiosos (ouro, prata) e uso de mecanismos de detoxificação enzimática para fazer com que alguns metais [Hg(II), Ar (V)] se tornem menos tóxicos ou biodisponíveis (BRUINS *et al.*, 2000). Sendo esse último uma aplicação muito importante na microbiologia ambiental na tentativa de recuperar ambientes contaminados por metais pesados.

O processo de biorremediação é muito atrativo quando comparado com métodos físico-químicos para remoção de metais por ter um custo menor e

uma maior eficiência quando a concentração de metais no ambiente não chega a níveis muito altos (GADD & WHITE, 1993).

Têm sido investigadas maneiras de tornar os ambientes ora contaminados em ambientes livres da contaminação por meio do uso de microrganismos capazes de metabolizar metais tóxicos presentes no ambiente, e transformá-los em uma forma cujo potencial de dano à saúde humana ou à fauna e flora seja reduzido (CHEN & WILSON, 1997; GOMES *et al.*, 1998; ESSA *et al.*, 2002; DÖBLER, 2003).

Como exemplo desse potencial existe o estudo de Vaxevanidou *et al.* (2008) que demonstrou taxas de remoção de 90% de solo contaminado por As através do uso de *Desulfuromonas palmitatis*.

2.5. Potencial de bactérias de origem marinha

Mecanismos de resistência a metais são bem representativos em bactérias marinhas que demonstram um enorme potencial para serem utilizadas para biorremediação de ambientes contaminados por metais pesados (DASH *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstraram a capacidade de bactérias marinhas como *Vibrio haveyi* que consegue bioacumular cobre, *Enterobacter cloacae* capaz de remover contaminantes como cobre, cobalto e cádmio (IYER *et al.* 2005).

Apesar de todo esse potencial existente em bactérias presentes no oceano, poucos estudos têm sido desenvolvidos para identificar bactérias resistentes a metais pesados no ambiente marinho, principalmente no Brasil.

Alguns trabalhos realizados em diferentes países mostram a importância desses estudos, como o trabalho de Santhiya *et al.* (2011) que demonstra a importância da análise de bactérias presentes na água e areia de praias para acessar e monitorar a qualidade desse ambiente. Além disso, outros estudos demonstram a importância no monitoramento da existência de bactérias resistentes a metais pesados em ambientes contaminados pois esse fator predispõe que essas bactérias sejam resistentes a antibióticos, sendo um problema de saúde pública (SPAIN & ALM, 2003).

Apesar disso, no Brasil, esse tipo de pesquisa ainda é focado em áreas terrestres, principalmente onde existe contaminação de solos por indústrias e

agricultura, como pode ser visto nos trabalhos de ANDREAZZA *et al.* (2010, 2011), VOSS & THOMAS (2001) e CAMARGO *et al.* (2007).

No Brasil, quando se trata de isolamento e monitoramento de bactérias resistentes a metais pesados alguns estudos focam no esgoto doméstico e hospitalar como fonte desses microrganismos na tentativa de utilizar técnicas para biorremediação de metais pesados.

Esse fator torna mais relevante os estudos em áreas costeiras e estuarinas, pois grande parte do esgoto brasileiro é despejada diretamente nesses locais sem tratamento. O problema ainda é maximizado por essas áreas serem atrativos turísticos e onde se encontram grande adensamento populacional, além da rica e importante biodiversidade presente.

Portanto, são necessários estudos para o isolamento e monitoramento de bactérias resistentes a metais pesados no ambiente marinho.

3. OBJETIVO

Objetivo do presente trabalho consiste em analisar a ocorrência de bactérias resistentes aos metais: cobre, cromo, cádmio e zinco na região estuarina da Baía do Araçá, município de São Sebastião (SP), identificando-as através de métodos biomoleculares. Além de analisar a relação das cepas resistentes aos metais pesados com a concentração de metais no sedimento, e identificar a distribuição de cepas resistentes na região de estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

A Baía do Araçá está situada na cidade de São Sebastião –SP, em uma área adjacente ao porto de São Sebastião (Figura 1). A Baía do Araçá é representativa na costa brasileira, pois reúne ecossistemas como costões rochosos, manguezais e praias arenosas, em continuidade a uma região de sublitoral que se estende para o interior do canal de São Sebastião – SP. Além disso, possui representativa diversidade biológica (AMARAL *et al.*, 2010).

O Araçá pode ser classificado como uma baía muito protegida, com hidrodinâmica dominada pela maré, mas que também sofre a ação de ondas de baixa amplitude (MIRANDA & CASTRO-FILHO, 1995). Devido à proximidade da malha urbana, esse conjunto de diferentes biótopos está, há muitos anos, exposto a diferentes tipos de ação antrópica, como ocupações irregulares, despejo de efluentes domésticos, além de ser próxima ao Porto de São Sebastião e ao Terminal Aquaviário da Petrobras, onde ocorrem constantes vazamentos de óleo, além de outras perturbações (AMARAL *et al.*, 2010).



Figura 6 – Vista panorâmica de São Sebastião, destaque para Baía do Araçá e Porto de São Sebastião.

Foto: <http://www.panoramio.com/photo/28738490>

Existem algumas áreas no canal de São Sebastião onde a influência antrópica é destacada. Em sua região central está localizado um dos maiores terminais petrolíferos do Brasil, o terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR) da Companhia Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS). O terminal é constituído de um oleoduto que interliga um conjunto de 40 tanques de

armazenamento, na parte terrestre e duas plataformas situadas no meio do canal de São Sebastião (NEIVA, 1993).

O TEBAR, além do píer de atracação de navios, possui tanques para armazenamento de petróleo e seus derivados (gasolina, óleo diesel, nafta e querosene de aviação, metanol e lastro). Próximo ao TEBAR há o porto de São Sebastião, para navios de pequeno e médio calado (GUBITOSO, 2010).

Ainda, localizado na Baía do Araça existe um emissário submarino, que transporta e lança no canal quase todo esgoto doméstico da cidade de São Sebastião (GUBITOSO, 2010) (Figura 7).

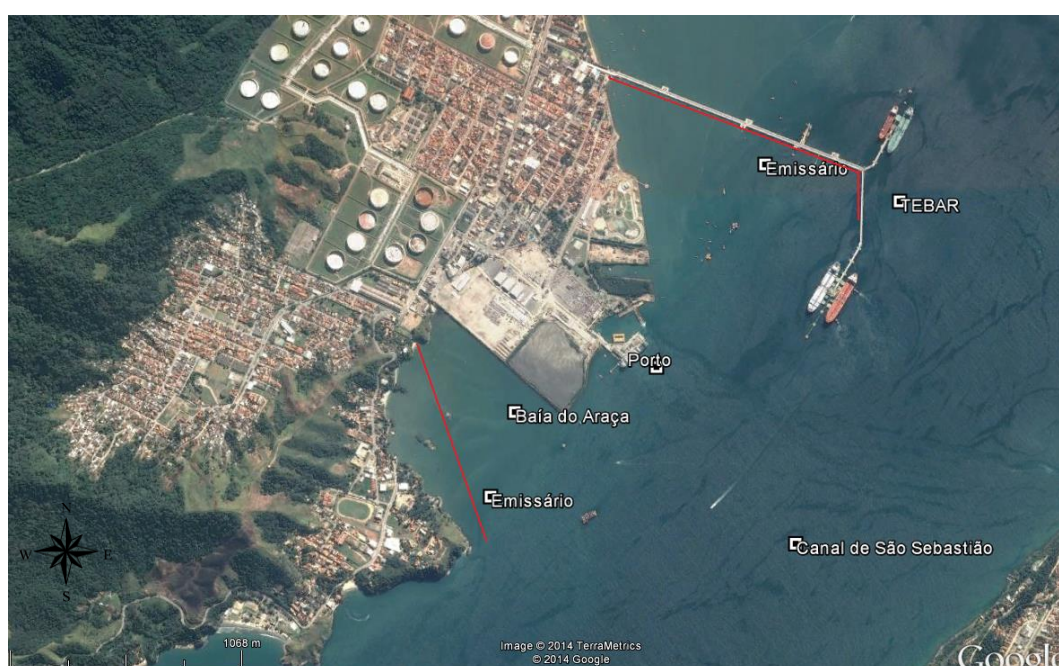


Figura 7 - Esquema da localização dos emissários submarinos (linha vermelha), porto de São Sebastião, e o Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR), próximos à Baía do Araça. Fonte: Google Earth.

4.2. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de sedimento em 37 pontos distribuídos ao longo da Baía do Araça e georreferenciados por GPS (Garmin) (Figura 8). Foram realizadas 4 coletas que ocorreram trimestralmente entre julho de 2013 à julho de 2014, totalizando 148 amostras de sedimento coletadas. As coletas foram realizadas desde as praias até a isóbata de 20 m de profundidade.

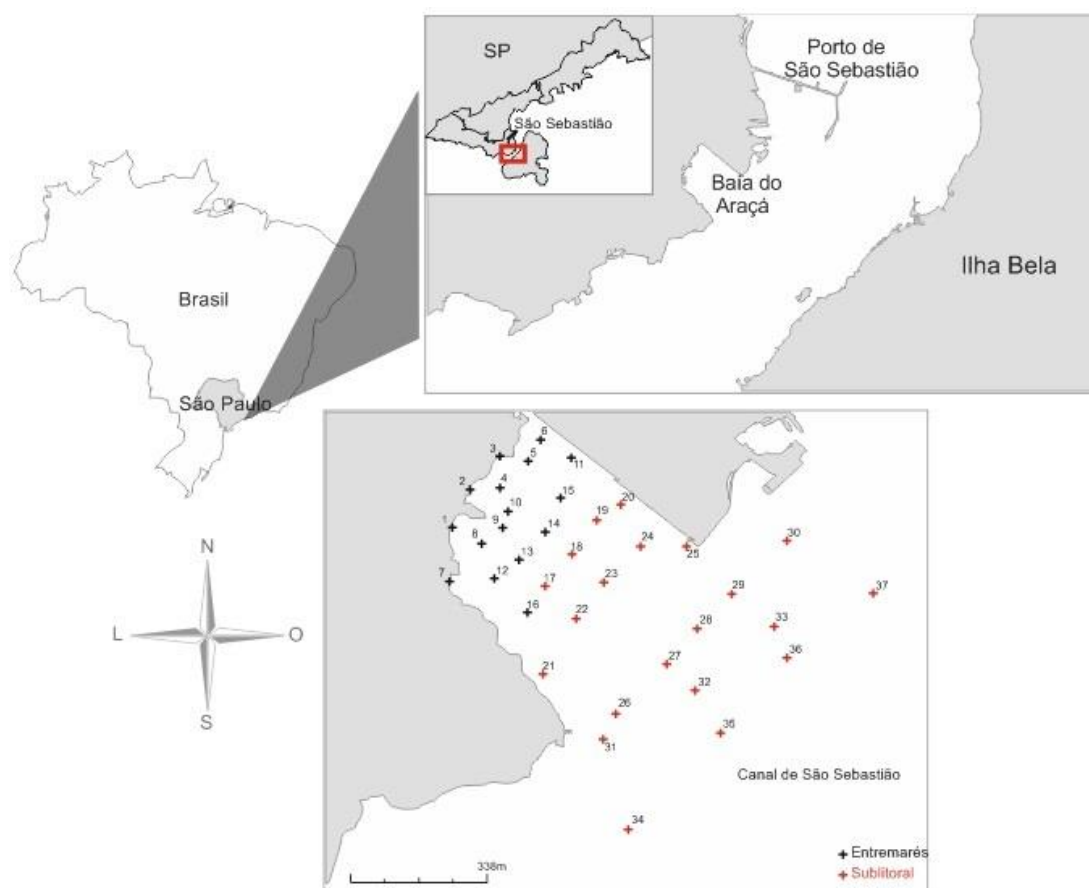


Figura 8- Mapa da região de São Sebastião mostrando a localização do Canal de São Sebastião e em detalhe a Baía do Araçá com os pontos de coleta na região do sublitoral (1-16) e na região de Entremarés (17-37).

As coletas foram feitas com amostradores cilíndricos, em alguns pontos da região entremarés e com multicorer (Figura 9 a-c) nas regiões do entremarés e do sublitoral, dependendo da profundidade dos pontos de amostragem. Em cada estação de coleta, foram retiradas amostras até a 20 cm de profundidade no sedimento.

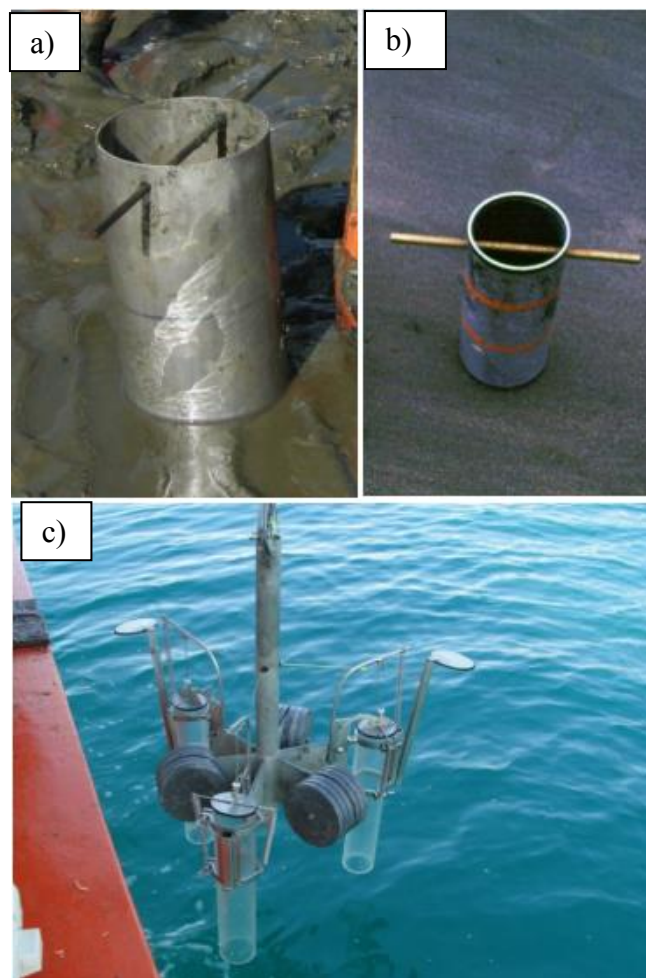


Figura 9- Tipos de equipamentos utilizados durante as coletas na Baía do Araçá: Amostrador cilíndrico (a –b) utilizado no entremarés e multicorer (d) no entremarés e sublitoral.

As amostras de sedimento foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e levadas ao Laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus do Litoral Paulista.

4.3. Isolamento de bactérias

Para cada amostra, 10 g de sedimento foram homogeneizados em 90mL de solução salina (NaCl 0,9%) e colocados no agitador por 5 min para que houvesse desprendimento das bactérias aderidas aos grãos de areia. Após esse processo foi realizada uma diluição seriada até a concentração de 10^{-5} .

As diluições foram plaqueadas em placas de petri contendo meio de cultura Marine Agar 2216E (Difco), através da técnica de “Pour- Plate” e incubadas à 28°C, durante de 24-72h.

Após esse período, procedeu-se a contagem de colônias crescidas em cada placa com auxílio de contador de colônias Tipo Quebec (Figura 10) e os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônia por grama de areia (UFC g⁻¹). A partir de cada placa colônias com aspectos diversos foram selecionadas e isoladas, através da técnica de esgotamento, nos mesmos meios de cultura.



Figura 10 – Utilização de contador de colônias Tipo Quebec para contagem das colônias das amostras de sedimento marinho.

Para o isolamento, foram selecionadas 100 colônias as quais foram submetidas a uma sucessão de cinco esgotamentos, para obtenção de colônias puras.

4.4. Armazenamento

As cepas isoladas foram transferidas para Eppendorfs contendo caldo nutriente preparado com água do mar esterilizada (filtrada em filtros 0,22µm e autoclavada), e acrescido de 20% de glicerol. Os tubos foram armazenados em ultra freezer à temperatura de -80°C.

4.5. Identificação

Para realização da identificação molecular foi feita extração do DNA genômico das colônias armazenadas utilizando o PureLink® Genomic DNA Kit de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 0,8% e quantificado (SOUZA, 2013).

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S rDNA através de reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram utilizados oligonucleotídeos para o domínio Eubacteria fD1 “forward” (5’ -17AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) e rD1 “reverse” (5’ AAGGAGGTGATCCAGCC-3’) (WEISBURG et al., 1991).

As reações foram realizadas em volume final de 50 µl contendo 20 pmols de oligonucleotídeos, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão da enzima, 2 U da enzima Taq DNA polimerase (FERMENTAS), 1,5 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti-96 well thermal cycler (Applied Biosystems), dentro do programa 94°C/3 minutos, 30 ciclos de amplificação (94°C/1 minuto, 55°C/30 segundos, 72°C /30 segundos), 72°C/10 minutos.

A avaliação dos amplificados foi feita por eletroferese em gel de agarose 0,8%. O tamanho do fragmento esperado era de, aproximadamente, 1500 pares de base.

O DNA amplificado foi purificado através do PureLink® Quick Gel Extraction and PCR purification Combo Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, foram retirados 5 µl do produto final, para avaliação por eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificação do DNA para realização da reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Sequencing- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 – Life Technologies. Cada reação de sequenciamento foi ajustada para um volume final de 10 µl, utilizando 20ng dos fragmentos de interesse, 3,2 pmols de oligonucleotídeos iniciadores rD1 ou fD1, 2,0 µl de tampão 2,5x e 0,5 µl dos terminadores Big Dye. As condições de reação foram: 96°C/1 min; 25 ciclos (96°C/1 min., 50°C/5s., 60°C/ 4 min.) (SOUZA, 2013).

Após a reação foi realizada a precipitação adicionando-se 2,5 µl de EDTA 125mM, 30 µl de etanol 100%. A solução foi misturada por inversão e centrifugada por 20 min. A 13.4000 rpm a 4°C. Depois o sobrenadante foi descartado, foi adicionado 30µl de etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado, a amostra seca a temperatura ambiente e depois armazenada a 4°C.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL), no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), através de sequenciador ABI, modelo 3130 (Applied Biosystems).

As sequências encontradas foram alinhadas utilizando o programa Clustal W 1.8. Posteriormente as sequencias foram ajustadas com o auxílio do programa BioEdit, de forma que todas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas.

Foi utilizado a ferramenta BLASTn da base de dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) para identificação das cepas isoladas.

A análise de distância foi feita com base na região 16S rDNA, utilizando o programa Mega6. Cada sequência obtida neste trabalho foi alinhada às sequências semelhantes (selecionadas pela busca no BLAST), em um alinhamento múltiplo, o qual foi gerado automaticamente pelo Mega6. Em seguida, foi gerada a árvore pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei (SOUZA, 2013).

4.6. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Para determinar se as cepas isoladas eram resistentes aos metais pesados ou não, foi realizada a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) (Figura 11).

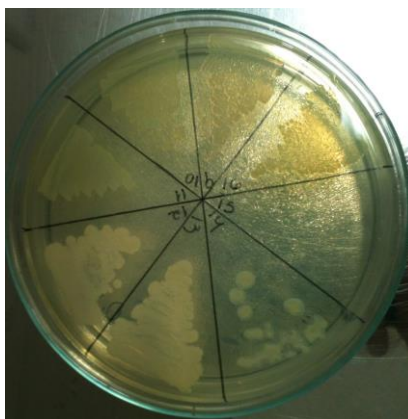


Figura 11 – Teste de resistência das cepas isoladas aos metais pesados.

Cada colônia isolada foi inoculada em 1 mL de solução salina, com o controle de turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland (1×10^6 UFC mL⁻¹).

Os inóculos preparados foram reinoculados em placas de petri contendo meio Agar Muller Hinton (Difco™ 225250) com as seguintes concentrações de metais 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600; 3200 µg mL⁻¹. Quatro diferentes metais pesados foram testados mediante uso dos seguintes compostos: CdSO₄.8/3H₂O; ZnSO₄.7H₂O; CuSO₄.5H₂O; K₂CrO₄. Os testes foram realizados em triplicatas (MATYAR *et al.*, 2008).

Os isolados foram considerados resistentes quando o valor da CMI excedeu o de *Escherichia coli* K-12 que foi usada como controle (AKINBOWALE *et al.*, 2007)., como nos trabalhos de Trevors *et al.* (1985), Ahmad & Yadava (1988) e Malik & Jaiswal (2000).

4.7. Análise dos metais pesados

A análise dos elementos metálicos cromo, cobre, cádmio e zinco foi realizada no Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO– USP) em amostras de sedimento superficial congeladas e liofilizadas, segundo a metodologia SW 846 US EPA 3051 (USEPA, 1994), a qual consiste em uma digestão ácida capaz de dissolver a maior parte dos elementos de origem antrópica. As estruturas silicáticas não são dissolvidas por esse procedimento.

Foram adicionados 10 mL de HNO₃ a 300mg de sedimento seco e essa solução foi submetida a ação de microondas por 30 minutos em diferentes

potenciais, de 250W a 890W. Em seguida a amostra foi filtrada em papel filtro Whatman 41 e a solução resultante teve seu volume elevado a 45 mL.

Os elementos Cr, Cd, Cu e Zn foram quantificados por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES).

Para verificação da metodologia analítica foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs), EnviroMAT SS-1 e EnviroMAT SS-2 da SCP Science.

Como no Brasil ainda não existe legislação que indique concentrações no sedimento que sejam capazes de prejudicar a biota e a saúde do ecossistema, no presente estudos foi utilizado os valores de referência da *Canadian Sediment Quality Guidelines* (SQG) para sedimentos marinhos (CCME 2002) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de referência para concentração de metais em sedimentos estuarinos de acordo *Canadian Sediment Quality Guidelines* (SQG). TEL – *Threshold Effect Level* – Nível limiar abaixo do qual não ocorre efeito adverso à comunidade biológica; PEL – *Probable Effect Level* – Nível provável de efeito adverso à comunidade biológica (frequentemente associados a efeitos biológicos).

Metais	TEL (mg kg ⁻¹)	PEL (mg kg ⁻¹)
Zn	123	315
Cr	37,3	90
Cu	35,7	197
Cd	0,6	3,5

4.8. Análise do sedimento

A análise granulométrica foi feita aplicando o método tradicional de peneiramento e pipetagem descrito por Suguio (1973).

A análise do percentual de carbono orgânico no sedimento foi realizada a partir da oxidação com dicromato de potássio, ataque com ácido sulfúrico e posterior titulação do dicromato excedente da oxidação com sulfato ferroso amoniacal, conforme descrito em Gaudette *et al.* (1974).

O método baseia-se na oxidação (exotérmica) com dicromato de potássio e ácido sulfúrico concentrado. A quantidade de dicromato consumido na oxidação do carbono orgânico é determinada titulando-se o excesso de dicromato com sulfato ferroso amoniacal.

O carbono orgânico total (COT) foi determinado segundo a Equação 1:

$$[\%COT] = V \times [1-(T/T_{Br})] \times 0,003 \times N \times (100/m) \quad (1)$$

onde:

V = volume de dicromato utilizado, em ml;

N = normalidade do dicromato;

T = volume de sulfato ferroso gasto na amostra, em ml;

T_{Br} = volume de sulfato ferroso gasto no branco, em ml;

m = massa da amostra de sedimento, em gramas.

4.9. Análises Estatísticas

Foi realizado teste de homocedasticidade para confirmação de dados heterogêneos, e então utilizados testes estatísticos não paramétricos.

Aos resultados obtidos para concentração de metais pesados, densidades de bactérias, matéria orgânica e carbono orgânico total foi aplicado o teste estatístico não paramétrico de Mean-Whitney para verificar as diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Para verificar a diferença estatística entre a porcentagem de resistência das cepas aos metais testados nas duas regiões de amostragem foi utilizado Chi-quadrado. Por fim foi aplicada a correlação de Spearman entre as concentrações de metais e porcentagens de resistência.

5. RESULTADOS

5.1. Dados físico-químicos

O metal que apresentou maior concentração no sedimento foi o Zn com concentração média de 38,84 mg kg⁻¹, seguido do Cr com 19,8 mg kg⁻¹, Cu com 5,47 mg kg⁻¹ e Cd com 0,25 mg kg⁻¹ (Figura 12).

Para todos os metais testados as concentrações foram significativamente maiores na região de sublitoral (Cd: $p=0,0088$; Cr: $p=0,002$; Cu: $p=0,037$ e Zn: $p=0,049$).

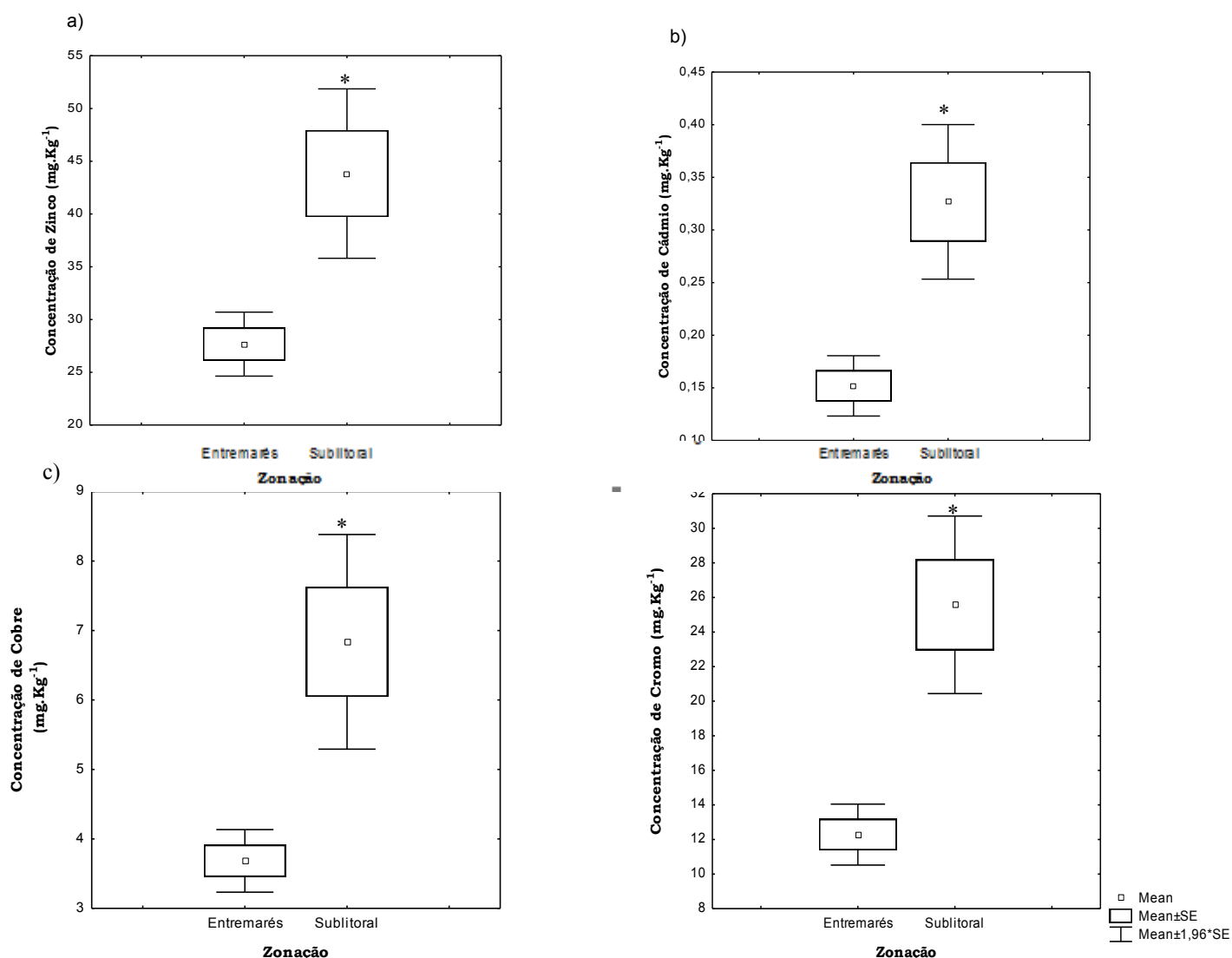


Figura 12 - Gráfico com as concentrações (mg kg⁻¹) dos metais pesados: zinco (a), cádmio (b), cobre (c) e cromo (d) nas duas regiões de amostragem (entremarés e sublitoral). (*) representa diferença estatística ($p < 0,05$).

A análise granulométrica demonstrou que grande parte dos sedimentos da baía são dominados por areias finas e muito finas, com pouca quantidade de silte e argila. Mas em média, o sedimento do sublitoral apresentou sedimentos mais finos que o entremarés (Figura 13).

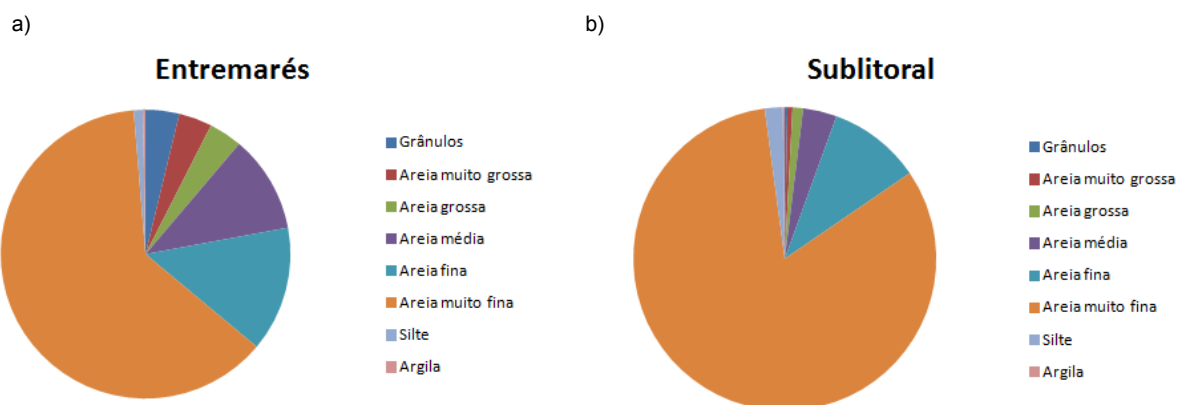


Figura 13- Composição granulométrica do sedimento da Baía do Araça na região do entremarés (a) e do sublitoral (b).

A porcentagem de matéria orgânica (MO) do sedimento variou de 4,9 a 14,8%, sendo que os maiores picos foram registrados no sublitoral e os menores no entremarés. Na região do sublitoral a porcentagem de matéria orgânica foi significativamente maior em relação a região de entremarés. No sublitoral a MO teve porcentagem média de 13,7%, enquanto que no entremarés a média foi de 6,5% (Figura 14).

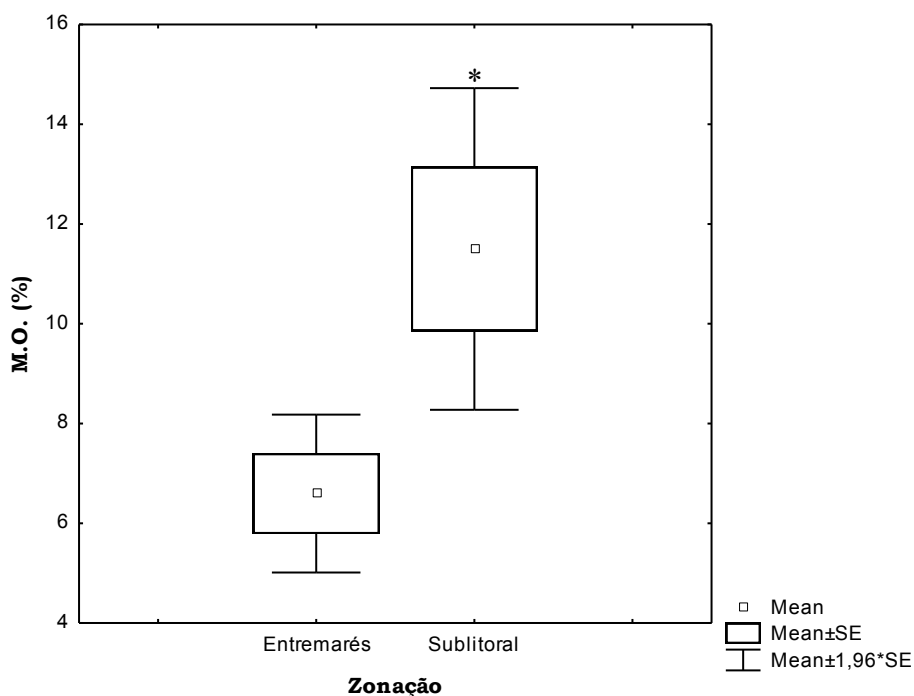


Figura 14- Porcentagem média da matéria orgânica (M.O.) dos sedimentos da região do entremarés e do sublitoral. (*) representa diferença estatística.

Em relação ao carbono orgânico total (COT), a variação foi menor que a observada para matéria orgânica. As porcentagens foram de 0,43 a 1,15% , sendo que os maiores valores foram encontrados na região de sublitoral e os menores no entremarés. No sublitoral houve porcentagem média de 0,82% e no entremarés de 0,72%. Não houve diferença estatística para COT nas duas regiões de amostragem (Figura 15).

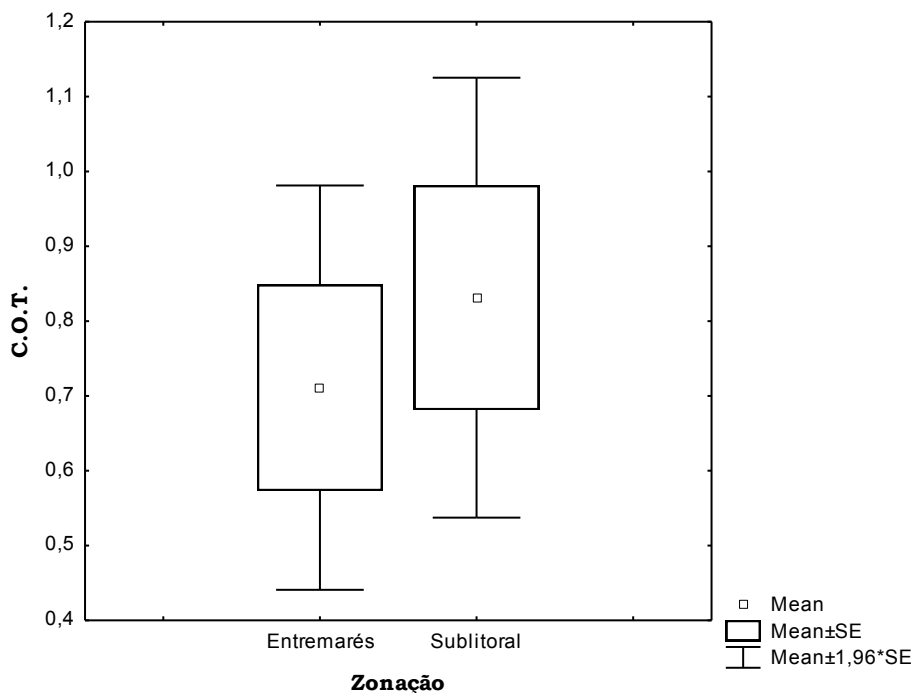


Figura 15 - Porcentagem de carbono orgânico total (C.O.T.) dos sedimentos do sublitoral e no entremarés.

5.2. Densidade de bactérias

A densidades bacteriana variou nos pontos de coleta, especialmente no sublitoral, com máximos valores chegando a 85 UFC 10^4 g⁻¹. Os valores menores estiveram entre 7 e 10 UFC 10^4 g⁻¹. Não foi observada diferença estatística entre os valores de densidade para as duas regiões de amostragem ($p=0,605$), entretanto, os maiores valores de densidade ocorreram na região do entremarés com média de 46 UFC 10^4 g⁻¹, enquanto que o sublitoral obteve apresentou valores médios de 34 UFC 10^4 g⁻¹ (Figura 16).

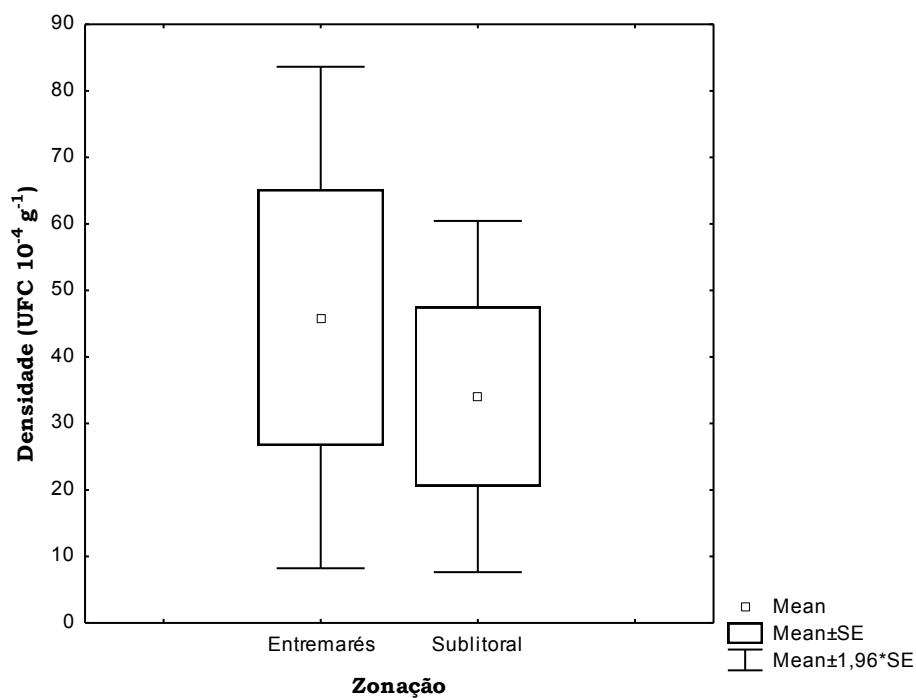


Figura 16- Densidade média de bactérias no sublitoral e no entremarés.

A influência da concentração dos metais nas densidades bacterianas pode ser inferida a partir da observação da figura 12. Apesar da correlação fraca, pode ser observada uma tendência de diminuição da densidade de acordo com o aumento da concentração de todos os metais (Figura 17).

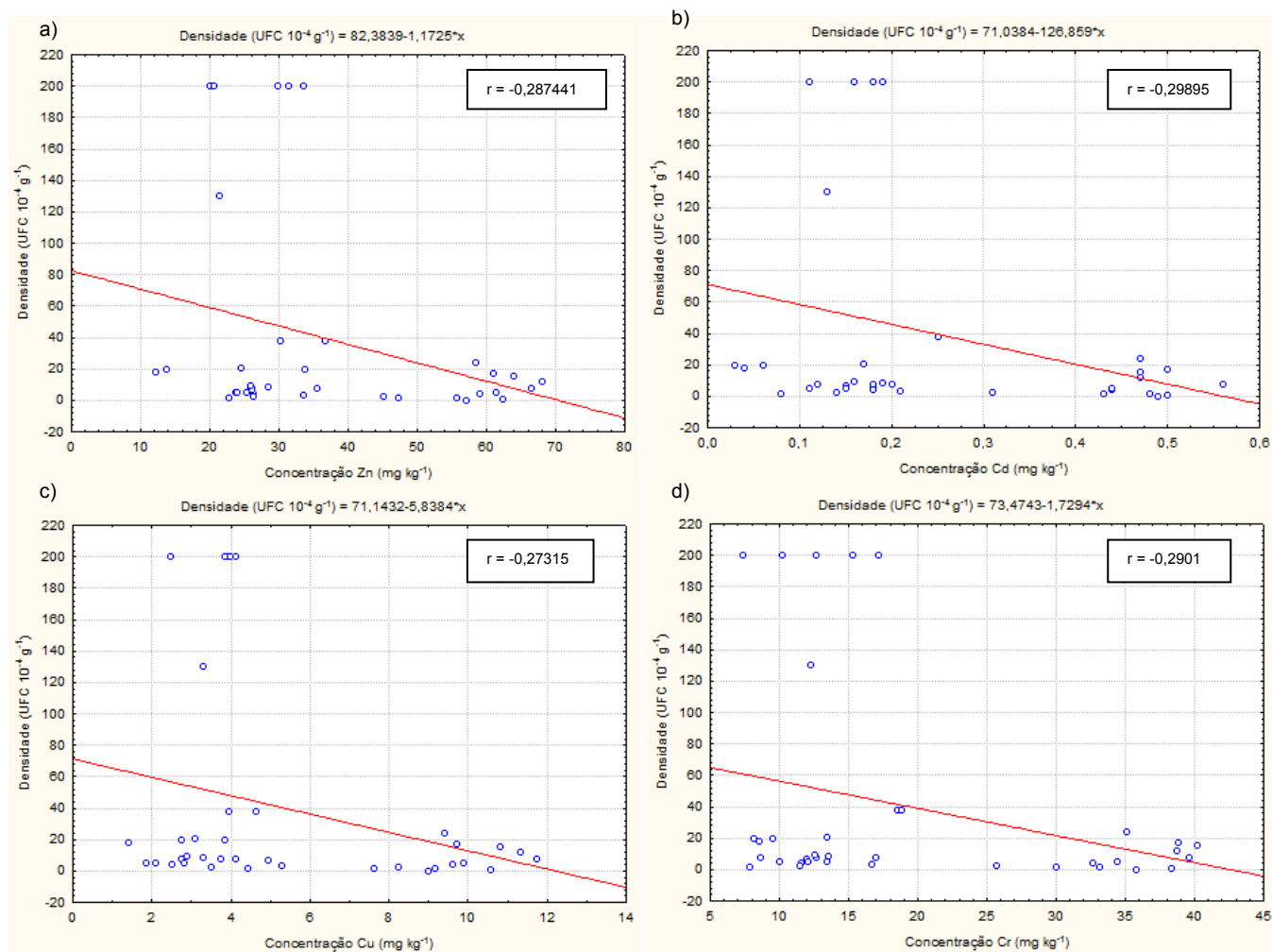


Figura 17 - Correlação entre as densidades médias de bactérias e as concentrações de Zn (a), Cd (b), Cu (c) e Zn (d) (n=37).

5.3. Resistência aos metais

De um total de 100 cepas bacterianas isoladas, 53% foram resistentes ao cromo, 52% ao zinco, 38% ao cádmio e 10% ao cobre (figura 18). As bactérias foram mais resistentes aos metais que apresentaram maiores concentrações (Cr e Zn). Em relação ao Cd, apesar da baixa concentração no sedimento, houve porcentagem significativa de cepas resistentes.

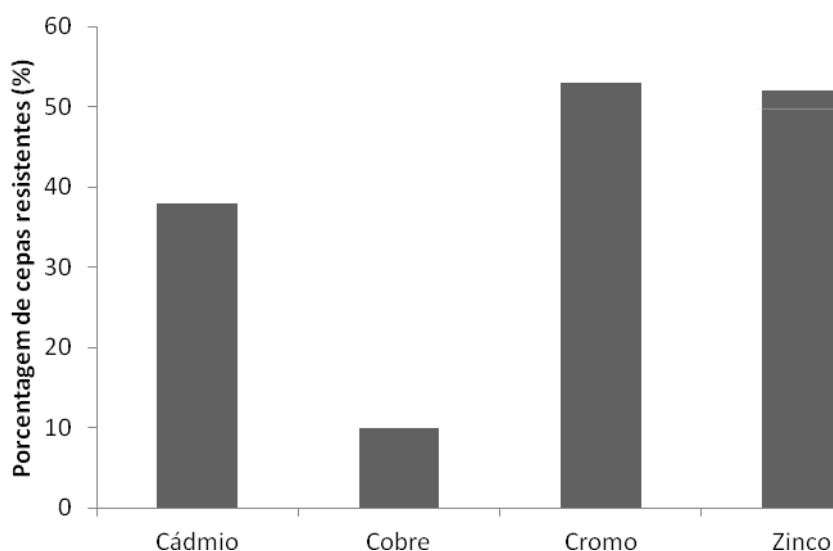


Figura 18- Porcentagem de cepas resistentes ao Cobre (Cu), Cádmiu (Cd), Cromo (Cr) e Zinco (Zn), isoladas do sedimento.

O perfil de resistência em cada concentração de metal pesado testado pode ser visualizado na tabela 2. Para o Cd foram poucas as cepas que resistiram a concentrações maiores que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o Cr, 36% das cepas cresceram mesmo na concentração de $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para Zn e Cu, poucas cepas (4% e 2%, respectivamente) cresceram na concentração $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ e nenhuma conseguiu resistir à maior concentração ($3200 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 2 – Porcentagem de resistência das cepas testadas em diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr e Zn.

Metais	Porcentagem (%) de cepas tolerantes a cada concentração de metais ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										% cepas resistentes
	12,5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	>3200	
Cádmiu	54,0	51	49	38*	22	7	0	0	0	0	38
Cobre	100	95	94,1	86	42	25	10*	2,0	0	0	10
Cromo	100	100	100	100	100	97,0	65,8	53*	36,0	0	53
Zinco	100	96,0	94,0	93,0	72,0	52*	42	4	0	0	52

* Concentração mínima inibitória da cepa padrão *Escherichia coli* K12.

Quando analisado o perfil de multi-resistência das cepas testadas observou-se que apenas 23% das cepas não foram resistentes a nenhum metal pesado, sendo que 49% foram resistentes a mais de dois metais pesados ao mesmo tempo e 7% das bactérias testadas foram resistentes concomitantemente ao Cd, Cu, Cr e ao Zn, apresentando multi-resistência (Figura 19).

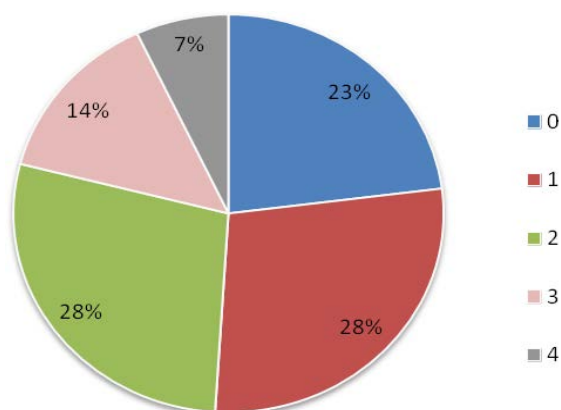


Figura 19 - Porcentagem de cepas resistentes a diferentes quantidades de metais pesados testados. 0 – representa as cepas que não foram resistentes a nenhum metal; 1 - cepas resistentes a apenas 1 metal pesado; 2- cepas resistentes a dois tipos de metal; 3- cepas resistentes a 3 diferentes tipos de metal; 4 – cepas resistentes a todos metais pesados testados.

Quando comparadas as duas regiões de amostragem (entremarés e sublitoral) observou-se que a a prevalência de cepas resistentes acompanha diretamente os padrões encontrados para as concentrações de metais. No sublitoral as bactérias apresentaram maior porcentagem de resistência, onde também foram encontradas as maiores concentrações de metais, apenas para o cádmio essa relação foi inversa. Já no entremarés, houve menor concentração de metais e menor porcentagem de cepas resistentes.

No sublitoral as bactérias foram mais resistentes ao Zn, Cu e Cr enquanto que no entremarés, as cepas foram mais resistentes ao Cd e ao Cr (figura 20). Além disso, as porcentagens de bactérias resistentes foram significativamente maiores no sublitoral tanto para Zn ($p= 0,0077$; $\chi^2= 7,1$; $gl=1$) quanto para o Cu ($p= 0,0003$; $\chi^2=13,31$; $gl=1$).

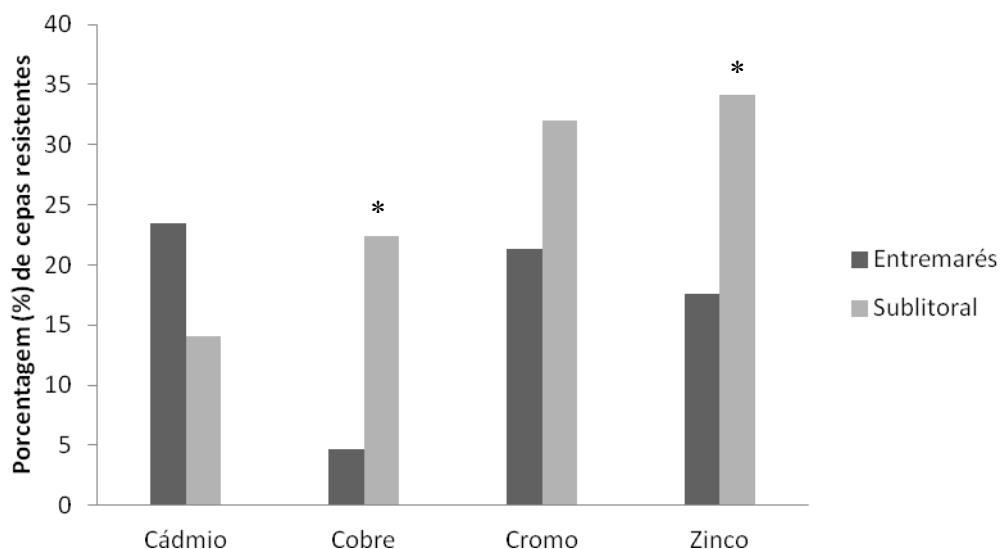


Figura 20- Porcentagem de cepas resistentes aos metais pesados (cádmio, cobre, cromo e zinco) nas duas regiões de amostragem: entremarés e sublitoral. (*) representa diferença estatística entre o entremarés e o sublitoral.

As concentrações dos diferentes metais pesados testados e as porcentagens de cepas resistentes a cada um dos metais, em cada ponto de coleta, são mostradas na figura 21. Destaca-se a presença de maiores concentrações e porcentagens de resistência nos pontos do sublitoral, especialmente para Zn, Cr. Para o Cd as maiores concentrações estão no sublitoral, mas as maiores porcentagens de resistência estão no entremarés.

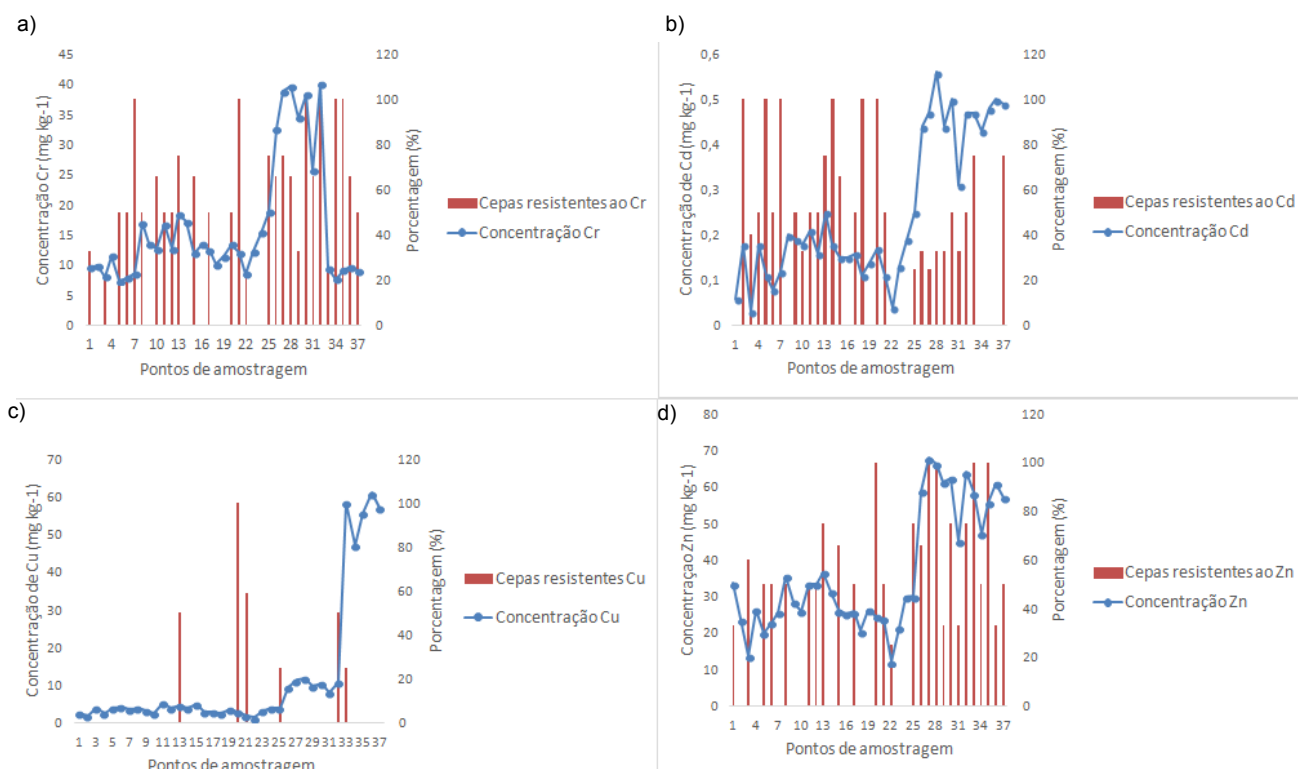


Figura 21- Gráficos das concentrações de metais e porcentagem de cepas resistentes para Cr(a), Cd (b), Cu (c) e Zn (d) em cada ponto de amostragem (1-37).

Esse fator pode ser observado através de mapas de interpolação da contração de metais ao longo da Baía do Araça, em que as maiores porcentagens estão concentradas nas regiões mais próximas ao porto e ao canal de São Sebastião (Figura 22-25).

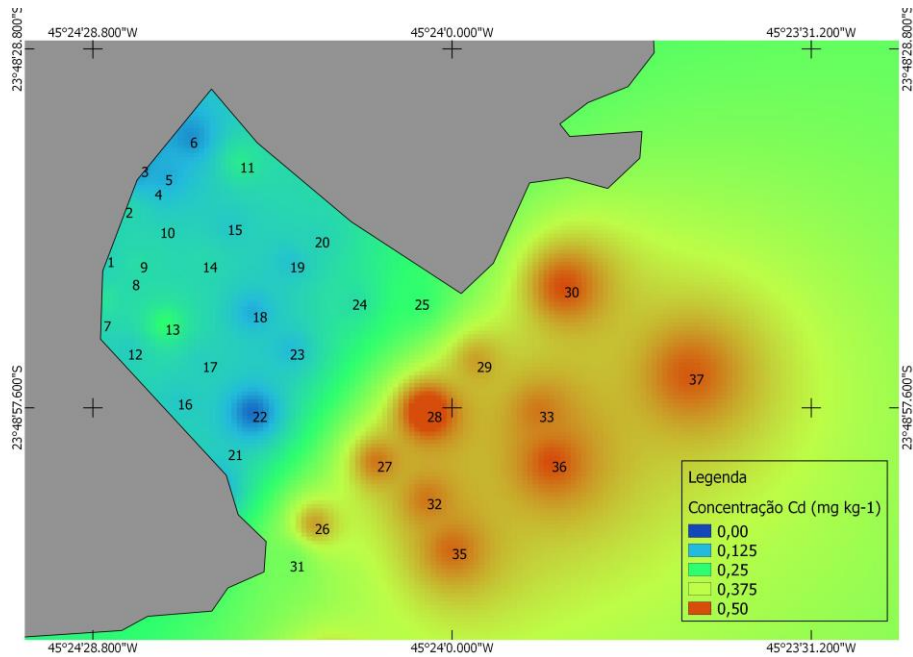


Figura 22 – Mapa com as concentrações de Cd nos pontos de coleta de 1-37.

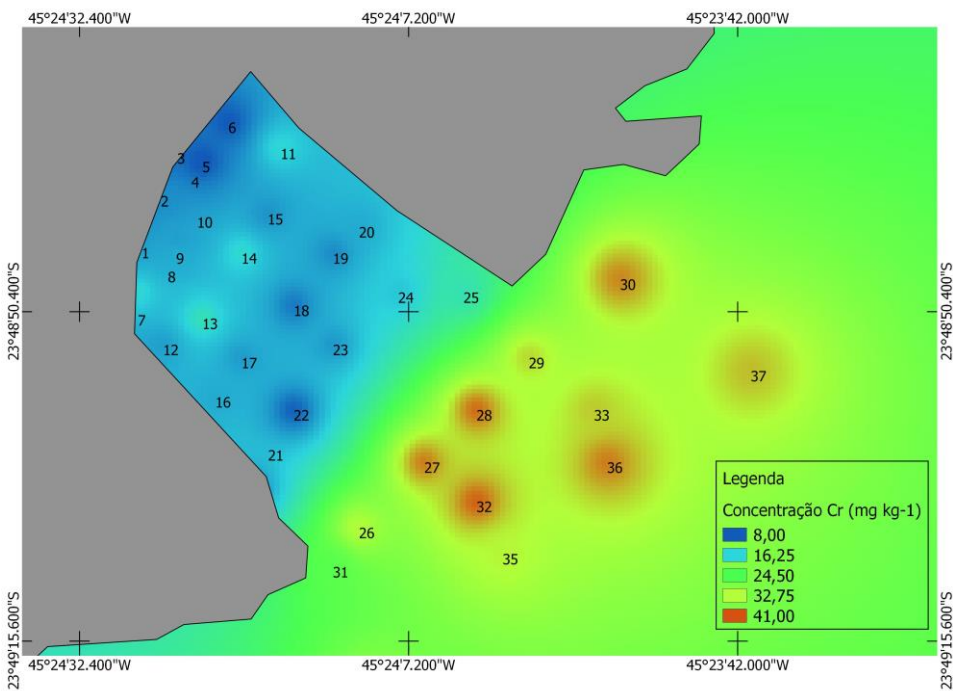


Figura 23 – Mapa com as concentrações de Cr nos pontos de coleta de 1-37.

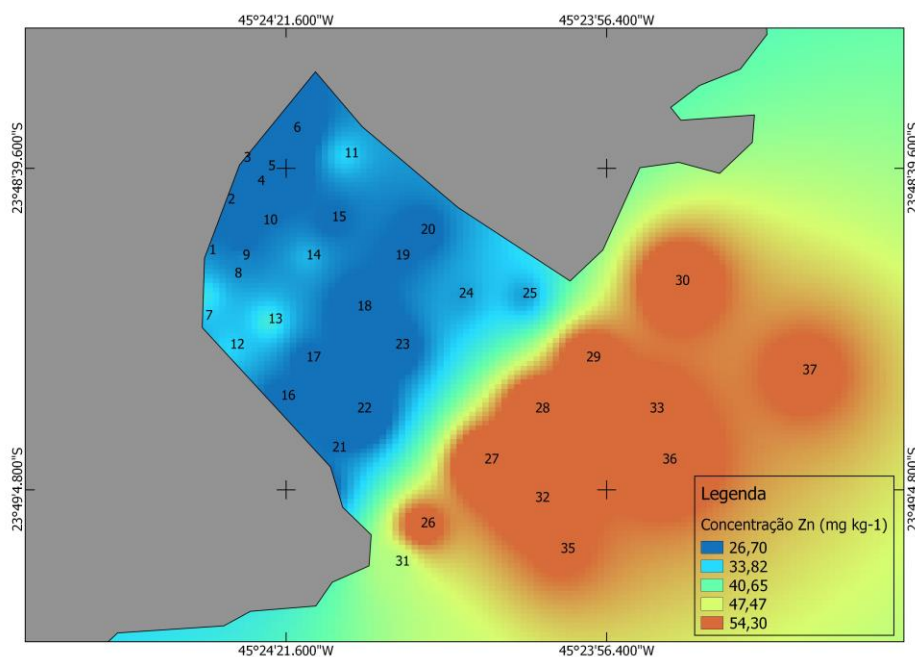


Figura 24 - Mapa com as concentrações de Zn nos pontos de coleta de 1-37.

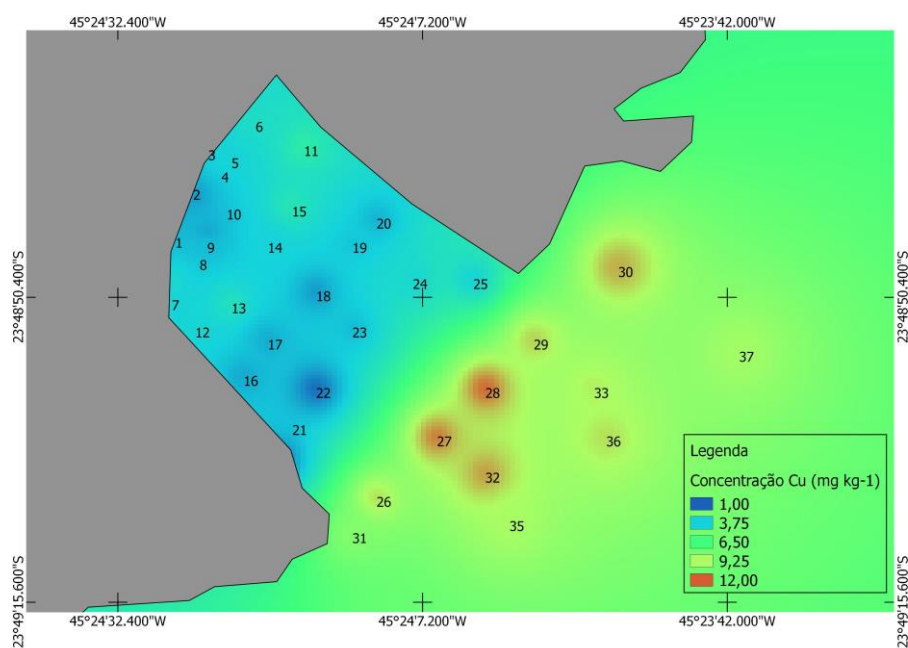


Figura 25 - Mapa com as concentrações de Cu nos pontos de coleta de 1-37.

Um padrão parecido para as porcentagens de cepas resistentes aos metais pesados pode ser observado para Zr e Cu. Para Cu nenhum padrão pode ser observado pois foram poucas cepas resistentes isoladas e em muitos pontos de coleta não houveram cepas resistentes isoladas. Para Cd o padrão

oposto ao da concentração de metais pode ser observado, em que as maior porcentagem de cepas resistentes se concentrou na região de entremarés que também apresentou menor concentração de metais pesados (Figuras 26-29).

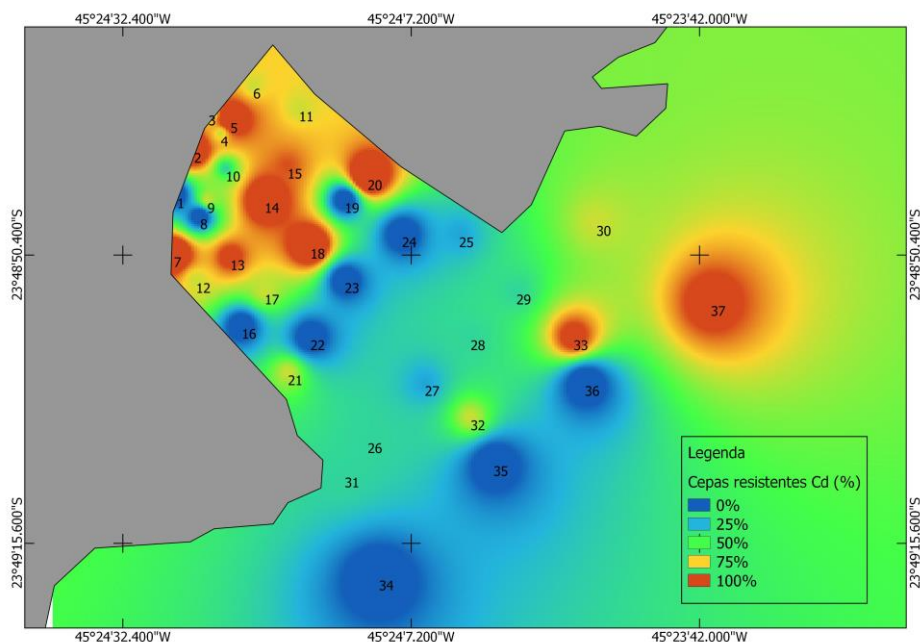


Figura 26 – Mapa com as porcentagens de bactérias resistentes ao Cd nos pontos de coleta 1–37.

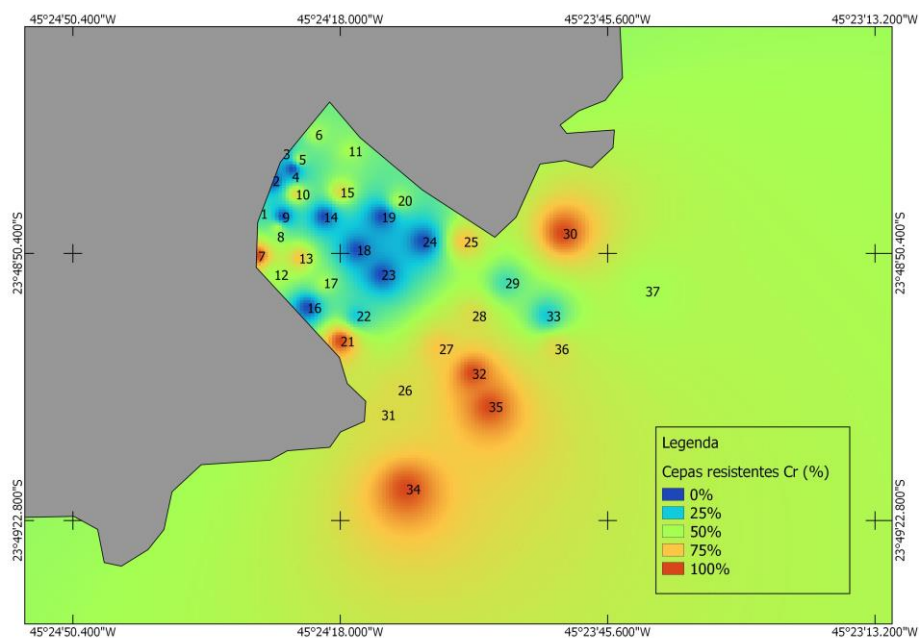


Figura 27– Mapa com as porcentagens de bactérias resistentes ao Cr nos pontos de coleta 1–37.

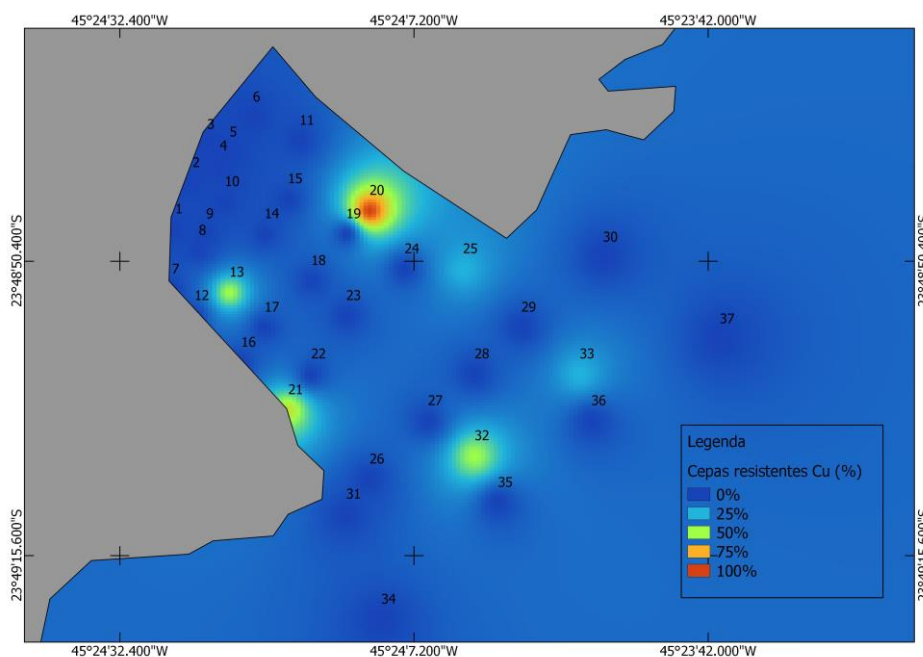


Figura 28- Mapa com as porcentagens de bactérias resistentes ao Cu nos pontos de coleta 1–37.

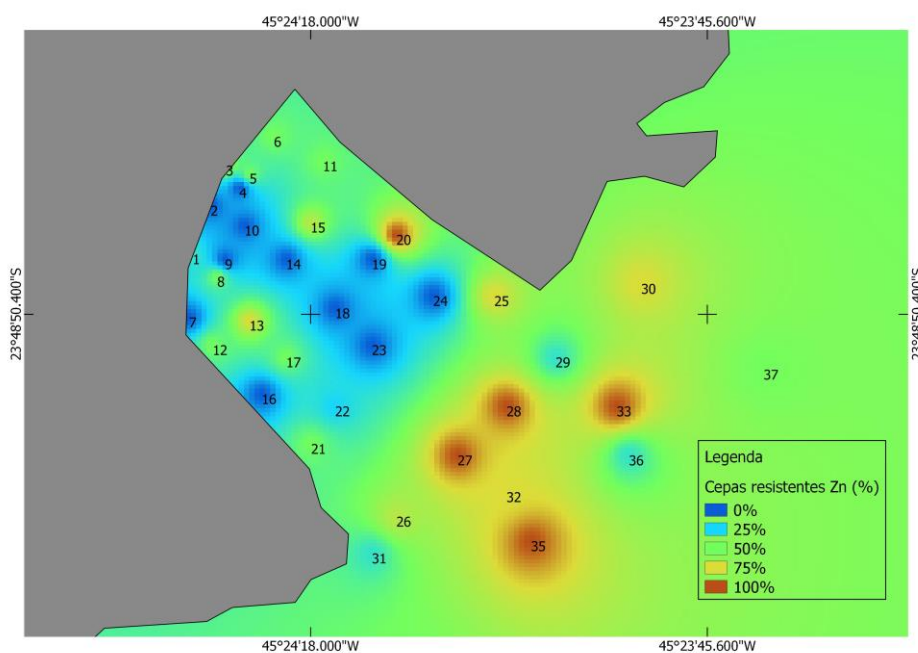


Figura 29 - Mapa com as porcentagens de bactérias resistentes ao Zn nos pontos de coleta 1–37.

O teste de correlação de Spearman mostrou que não houve correlação elevada entre as concentrações de metais pesados e porcentagem de cepas resistentes nos pontos de amostragem (Figuras 30-33). Mas para Zn e Cr houve uma correlação positiva que apesar de fraca indica aumento de cepas resistentes de acordo com o aumento da concentração de cada metal.

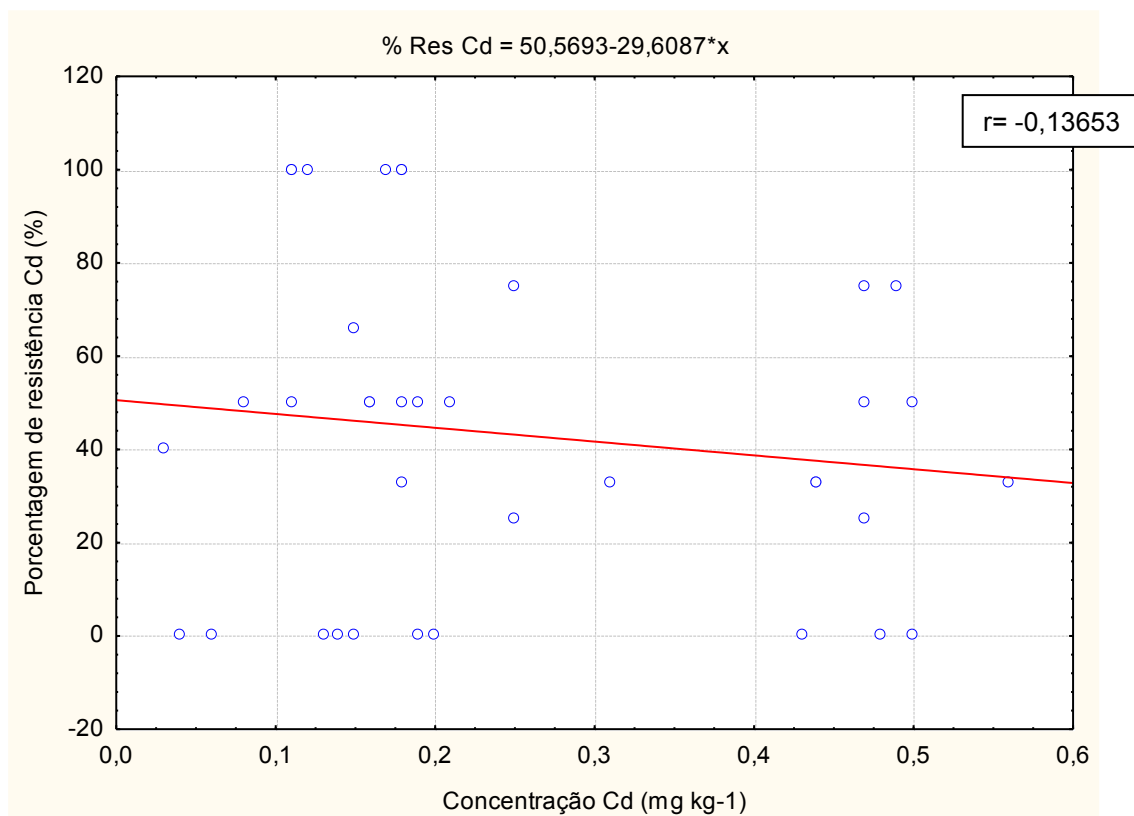


Figura 30 - Correlação entre a porcentagem de cepas resistentes ao cádmio e a concentração de cádmio no sedimento (n=37).

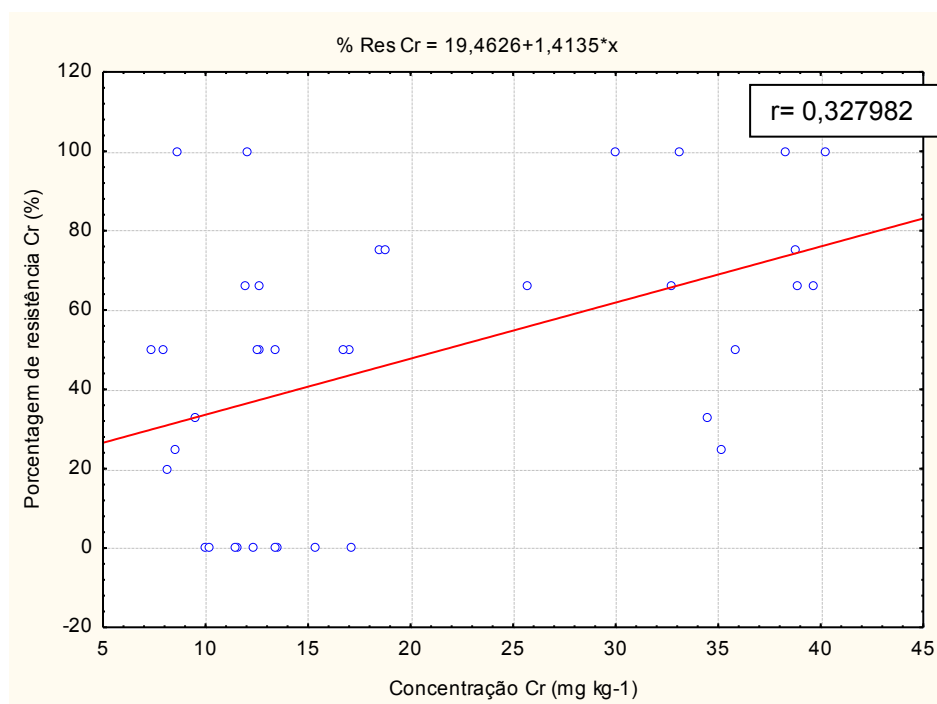


Figura 31 - Correlação entre a porcentagem de cepas resistentes ao cromo e a concentração de cromo no sedimento (n=37).

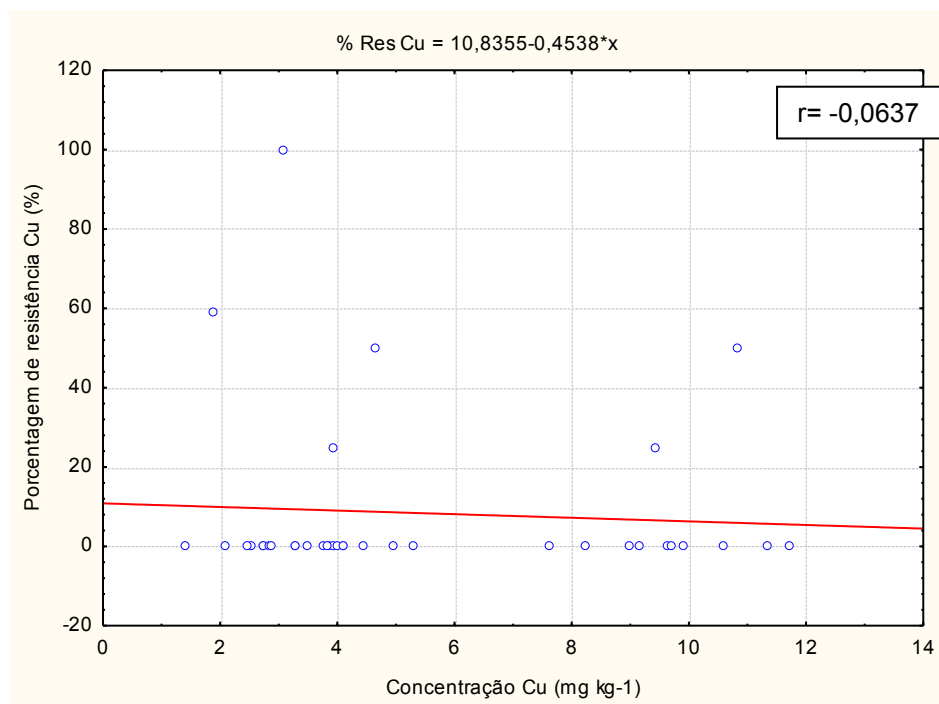


Figura 32- Correlação entre a porcentagem de cepas resistentes ao cobre e a concentração de cobre no sedimento (n=37).

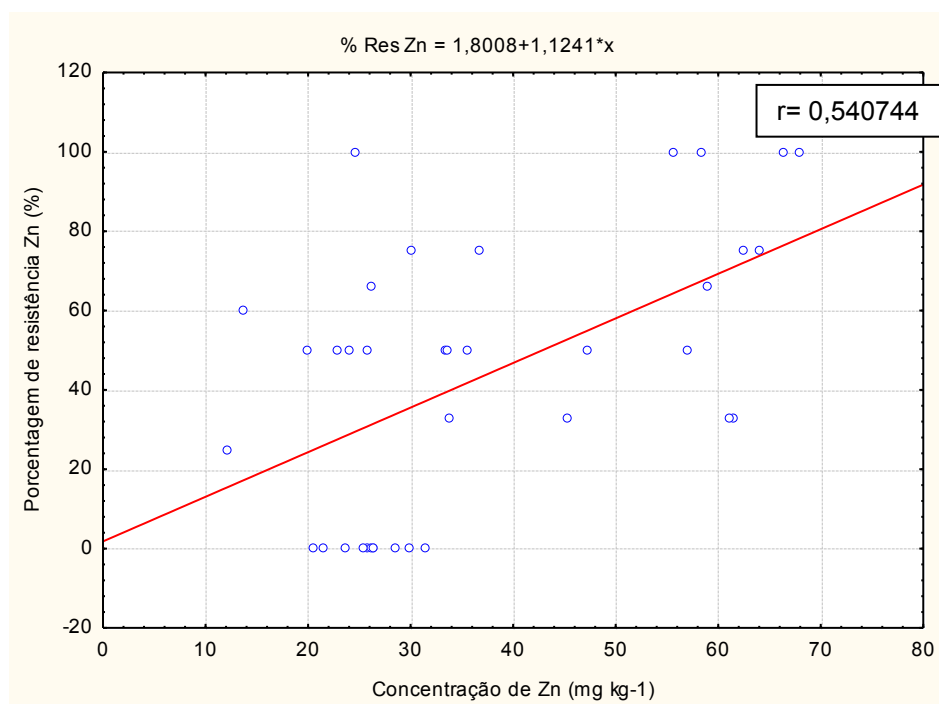


Figura 33- Correlação entre a porcentagem de cepas resistentes ao zinco e a concentração de zinco no sedimento (n=37).

5.4. Identificação das bactérias

Entre as cepas bacterianas que apresentaram resistência aos metais, 50 foram selecionadas e submetidas a técnicas de identificação molecular.

A imagem do resultado da corrida de eletroforese depois de algumas extrações de DNA genômico pode ser visualizada na figura 34.

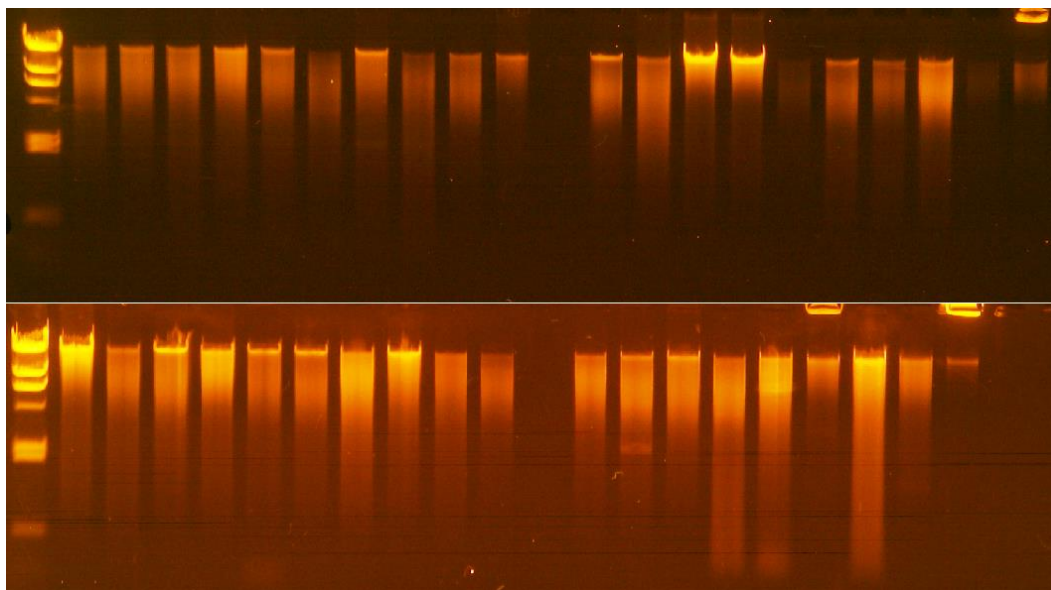


Figura 34 - Resultado da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% de algum dos DNAs genômicos extraídos das cepas isoladas.

A imagem do resultado da corrida de eletroforese depois da amplificação dos DNAs extraídos pode ser visualizada na figura 35.

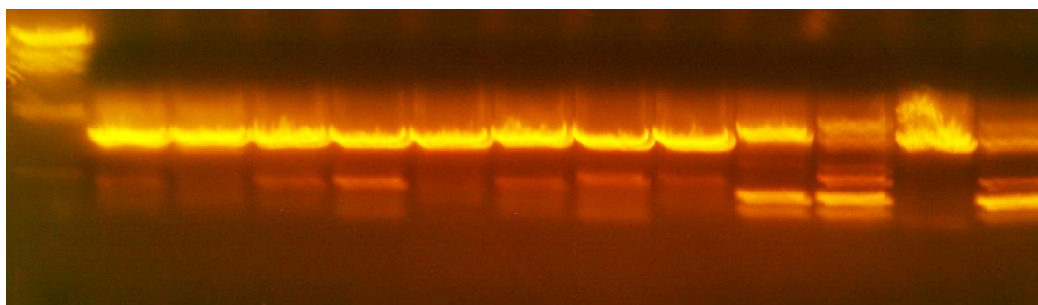


Figura 35– Resultado da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% depois da reação de polimerização em cadeia (PCR) dos DNAs genômicos extraídos das cepas isoladas.

A qualidade dos eletroferogramas pode ser visualizada na figura 36.

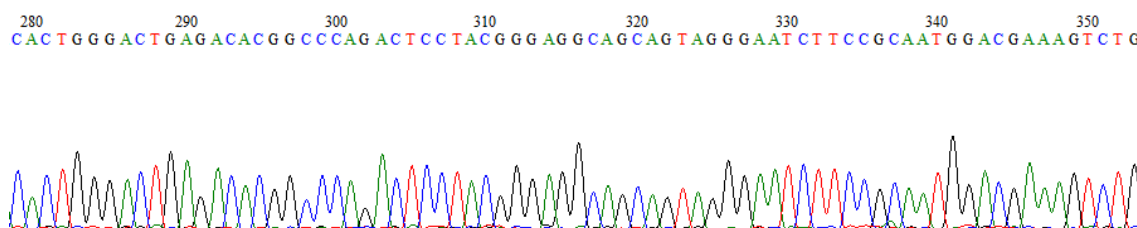


Figura 36 - Exemplo da qualidade do eletroferograma gerado a partir do BioEdit para identificação de uma das cepas isoladas.

A partir das análises moleculares foram identificadas as espécies de bactérias descritas na tabela 3, juntamente com suas respectivas concentrações mínimas inibitórias. Dez cepas ainda não puderam ser identificadas por apresentarem baixa porcentagem de identidade com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Tabela 3- Cepas isoladas da Baía do Araça e suas respectivas concentrações mínimas inibitória (CMI).

Cepa (ID)	Espécies	Código NCBI	% de identidade	CMI (µg/mL)			
				Zn	Cu	Cr	Cd
5	<i>Bacillus cereus</i>	KC895904.1	99%	800	1600	>3200	400
10	<i>Bacillus cereus</i>	KJ801586.1	99%	1600	1600	>3200	400
12	<i>Bacillus cereus</i>	FJ393304.1	99%	1600	800	>3200	200
36	<i>Enterobacter asburiae</i>	KJ877656.1	98%	1600	1600	1600	200
41	<i>Exiguobacterium sp</i>	HM489971.1	98%	1600	400	>3200	12,5
55	<i>Vibrio alginolyticus</i>	CP006718.1	98%	200	800	3200	400
8	<i>Bacillus cereus</i>	JX155762.1	99%	1600	1600	>3200	400
11	<i>Bacillus pumilus</i>	GU991855.1	99%	1600	800	>3200	400
13	<i>Bacillus pumilus</i>	GU991855.1	99%	1600	800	>3200	200
16	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ526891.1	99%	1600	800	>3200	12,5
19	<i>Bacillus cereus</i>	KC441781.1	99%	1600	400	>3200	12,5
25	<i>Bacillus pumilus</i>	CP007436.1	99%	1600	400	3200	12,5
33	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ526883.1	98%	1600	400	3200	12,5
35	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ526886.1	98%	1600	200	3200	12,5
37	<i>Bacillus aerophilus</i>	KF436709.1	99%	1600	1600	>3200	400
38	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ526883.1	99%	1600	1600	>3200	200
39	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ526886.1	99%	1600	800	>3200	100

40	<i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i>	CP006719.1	99%	1600	200	>3200	100
49	<i>Bacillus pumilus</i>	CP000813.1	98%	12,5	800	1600	100
50	<i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i>	CP006718.1	98%	800	200	3200	200
52	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i>	KF993669.1	98%	12,5	200	1600	400
53	<i>Bacillus pumilus</i>	CP007436.1	99%	12,5	200	1600	200
58	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	HG813242.1	99%	200	200	3200	12,5
61	<i>Bacillus</i> <i>boroniphilus</i>	EU620409.1	98%	3200	400	3200	200
92	<i>Bacillus</i> <i>thurigiensis</i>	CP005935.1	98%	1600	25	>3200	50
93	<i>Bacillus safensis</i>	KJ542764.1	99%	1600	100	>3200	25
94	<i>Bacillus cereus</i>	KC895904.1	99%	1600	100	>3200	800
67	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	HG813242.1	99%	800	200	3200	400
68	<i>Planococcus</i> <i>maritimus</i>	JN128243.1	99%	200	200	1600	12,5
69	<i>Planococcus</i> <i>maritimus</i>	KF933638.1	98%	800	200	800	800
77	<i>Bacillus pumilus</i>	JX437066.1	98%	800	200	3200	50
80	<i>Bacillus pumilus</i>	JX437066.1	99%	1600	400	>3200	400
81	<i>Bacillus pumilus</i>	GU991855.1	99%	1600	400	>3200	12,5
34	<i>Bacillus cereus</i>	KC441781.1	99%	1600	200	>3200	12,5
67	<i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i>	CP006718.1	99%	800	200	3200	400
68	<i>Planococcus</i> <i>maritimus</i>	KF933638.1	99%	200	200	1600	12,5
87	<i>Bacillus</i> <i>thurigiensis</i>	KC178607.1	98%	3200	200	>3200	800
96	<i>Staphylococcus</i> <i>sp</i>	KJ741211.1	99%	1600	200	>3200	50
97	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	KJ888944.1	98%	3200	800	>3200	400
98	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	KJ702704.1	99%	400	400	1600	50

A partir da análise da tabela 2 é possível verificar o predomínio do gênero *Bacillus* entre os isolados. Entre as 50 cepas testadas, 7 foram identificadas como *Bacillus cereus*, 13 *Bacillus pumilus*, 2 *Bacillus thurigiensis*, 1 *Bacillus boroniphilus*, 1 *Bacillus safensis*, 1 *Bacillus aerophilus*, 1 *Staphylococcus aureus*, 1 *Staphylococcus sp*, 2 *Staphylococcus epidermis*, 1 *Staphylococcus warneri*, 4 *Vibrio alginolyticus*, 3 *Planococcus maritimus*, 1 *Micrococcus luteus*, 1 *Enterobacter asburiae*, 1 *Exiquobacterium sp* (figura 37). Destas apenas os gêneros *Vibrio* e *Enterobacter* pertencem ao grupo de bactérias gram-negativas, o restante das bactérias isoladas pertencem ao grupo de bactérias gram-positivas.

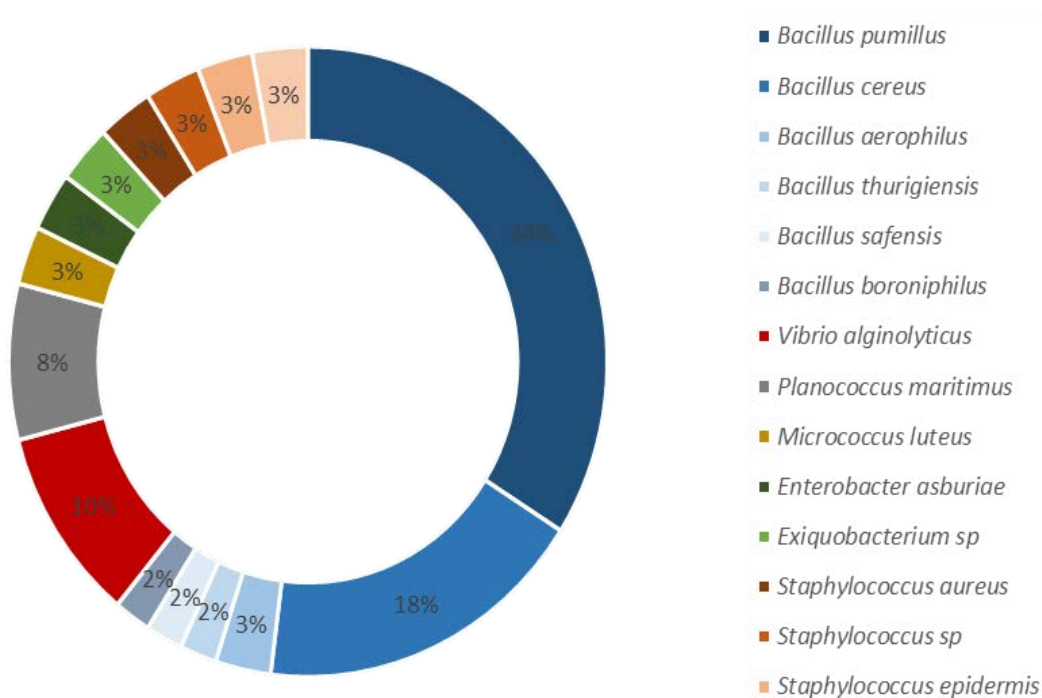


Figura 37 - Porcentagens das espécies de bactérias isoladas e identificadas através de técnicas de biologia molecular.

A resposta de cada gênero, em relação à resistência aos metais testados, foi diferente de acordo com os valores de CMI (figura 38).

Para o zinco os gêneros *Enterobacter* e *Exiquobacterium* foram os que apresentaram maiores CMI com média de 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O menor valor de CMI foi 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentado pelo gênero *Micrococcus* (figura 38- a).

Em relação ao cromo todos os gêneros apresentaram valor alto de CMI, especialmente *Exiguobacterium* sp que chegou a 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de *Bacillus* sp, *Vibrio* sp e *Staphylococcus* sp apresentaram valores de CMI bem próximos variando de 2400 à 2614 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 38 – b).

Enterobacter sp foi o gênero que apresentou maior CMI para o cobre, chegando a 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os outros gêneros apresentaram valores bem abaixo, variando a média de 250 à 568 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 38 – c).

Cádmio foi o metal em que cepas apresentaram menores valores de CMI. O pico mais alto foi obtido pelo gênero *Micrococcus* (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o mais baixo pelo *Exiguobacterium* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), os outros gêneros variaram de 200 à 249 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 38 – d).

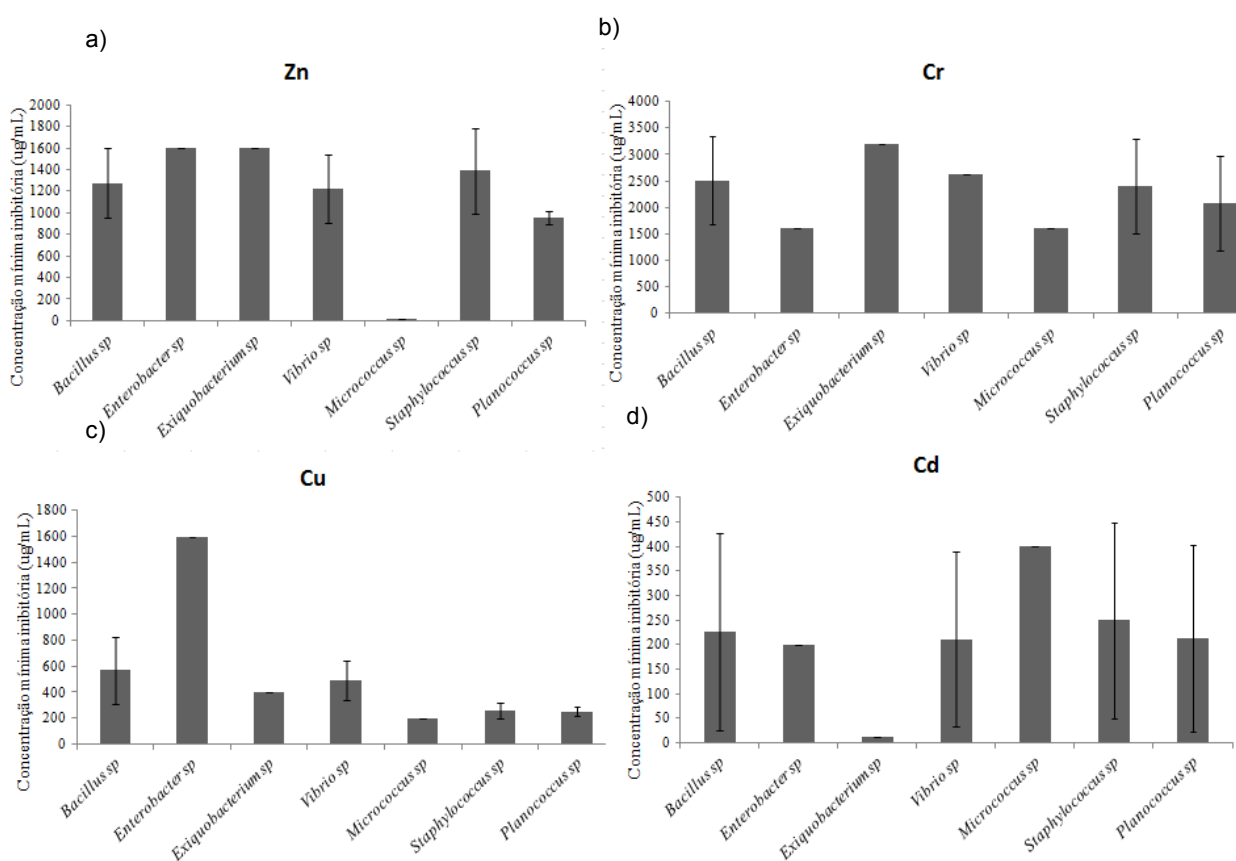


Figura 38 - Média da concentração mínima inibitória para zinco (a), cromo (b), cobre (c) e cádmio (d) para cada gênero de bactéria isolado.

6. DISCUSSÃO

6.1. Dados físico-químicos

Os sedimentos têm sido considerados como um compartimento de acumulação de poluentes, devido tanto à alta capacidade de sorção quanto a capacidade de acumulação, onde as concentrações tornam-se várias ordens de grandeza maiores do que as concentrações encontradas na água, o que possibilita o uso dos sedimentos com um bom indicador de poluição aguda e crônica (FÖSTNER & WITTMANN, 1981).

Em relação aos valores de matéria orgânica encontrados na Baía do Araça, vale destacar sua influência nas densidades bacterianas encontradas. Gubitoso *et al.* (2008) demonstrou em seu trabalho que de acordo com os valores obtidos pelas razões C/P observou-se que a matéria orgânica em grande maioria é de origem da decomposição bacteriana, o que pode estar relacionada à decomposição da matéria orgânica existente na região.

No presente estudo foi possível observar as maiores concentrações de metais presentes na região de sublitoral, bem como as maiores porcentagens de matéria orgânica. Através da análise granulométrica foi possível determinar o predomínio de sedimentos finos na região de sublitoral o que indica uma área de baixa energia para que seja possível a deposição desses sedimentos (BELÚCIO, 1995).

Além desse fator geomorfológico, as maiores concentrações de metais no sublitoral podem ser explicadas pela maior proximidade do canal de São Sebastião onde existe o predomínio de poluição vinda através do porto e de efluentes domésticos e industriais.

A hidrodinâmica local também possibilita o maior acúmulo de metais e matéria orgânica no sublitoral. Estudos de Castro-Filho (1990) e Fontes (1995) demonstraram que a circulação do canal de São Sebastião caracteriza-se por movimentos de norte e sul, com periodicidade de dias, pouco influenciada pelas correntes de maré. Isso indica que parte da poluição vinda da parte norte do canal onde se localiza o porto e o TEBAR pode influenciar na deposição de metais pesados nos sedimentos da Baía do Araça, especialmente nos pontos 37, 30, 29, 33, 36, 28 e outros pontos da região do sublitoral.

As maiores concentrações obtidas para zinco, cromo, cobre e cádmio, podem, em parte, ser explicadas pela presença de fontes de contaminação de metais. As possíveis fontes de contaminação desses metais no sedimento, de acordo com estudos de Lone *et al.* (2008), para zinco são: galvanoplastia, fundição e refino, mineração, biossólido; para cromo: galvanoplastia, lodos, resíduos sólidos, curtumes; para cobre: galvanoplastia, fundição e refino, mineração, biossólido; e para cádmio: atividades antrópicas, fundição e refino de metais, queima de combustíveis fósseis, aplicação de fertilizantes fosfatados, lodo de esgoto.

Em São Sebastião provavelmente atividades relacionadas a refinarias, queima de combustíveis fósseis, despejo de efluentes industriais e domésticos acabam por influenciar na quantidade de Zn, Cr, Cd e Cu encontrada nos sedimentos da Baía do Araça (ABESSA *et al.*, 2012).

Os níveis obtidos para metais pesados, encontraram-se, na maioria das amostras, abaixo dos valores estabelecidos pela legislação Canadense. Entretanto, em alguns pontos do sublitoral, os níveis obtidos ficaram acima dos limites. Vale ressaltar, a importância do desenvolvimento de legislações específicas para o Brasil em relação a concentrações aceitáveis de metais pesados nos sedimentos. Sedimentos de regiões diferentes apresentam diferentes constituintes, condições físico-químicas, além da biota apresentar características e metabolismo extremamente distintos, fazendo que se torne questionável a utilização de padrões estrangeiros também para sedimentos brasileiros (ALVES *et al.*, 2010).

6.2. Densidade bacteriana

Em zonas costeiras os sedimentos têm sido considerados como importantes ambientes para atividade microbiana (HAMELS, *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2006). Vários estudos indicam que a abundância de microrganismos está correlacionada positivamente com porcentagem de matéria orgânica (OLIVEIRA *et al.*, 2007; BLUM *et al.*, 2004). Esse fator pode explicar as densidades de bactérias obtidas nas amostras de sedimento do presente trabalho, uma vez que, os mesmos apresentaram quantidade significativa de matéria orgânica em sua composição.

Entretanto, mesmo a porcentagem de M.O. tendo sido significativamente maior no sublitoral o mesmo não ocorreu com as densidades bactérias. Isso pode ser explicado pois a diferença de M.O. não foi suficiente para causar impacto na população microbiana assim como verificado no trabalho de Pinto *et al.* (2012) ou devido as altas quantidades de metais encontradas na região do sublitoral quando comparado com o entremarés.

A granulometria também tem influência nas densidades microbianas uma vez que, sedimentos não muito finos, com uma maior superfície de contato, favorecem a adesão de matéria orgânica e de microrganismos. Pelo contrário, sedimentos mais finos e arredondados acabam por dificultar essa adesão (HAMELS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Esses fatores não foram verificados neste estudo, provavelmente, porque a diferença na composição do sedimento das duas áreas não seja suficiente para causar impacto nas densidades de bactérias.

Diversos estudos indicam que a presença de metais pesados no solo diminui a densidade de microrganismos devido a sua toxicidade (TYLER, 1974; HAFEBURG & KOTHE, 2007). No presente estudo a correlação negativa foi fraca, mas houve tendência de diminuição das densidades bacterianas de acordo com o aumento da concentração de todos os metais. Entretanto é de extrema importância ressaltar que mesmo com uma indicação de diminuição de densidade com o aumento da concentração de metais pesados houve aumento significativo de cepas resistentes em pontos com maior concentração de metais.

6.3. Bactérias resistentes aos metais pesados

Azam *et al.* (1977) reportaram que bactérias em ambientes marinhos sofrem seleção ou adaptação quando existe a ocorrência de metais pesados. A contaminação por determinado metal no ambiente, aumenta o nível de resistência da comunidade bacteriana local a esse metal (MALIK *et al.*, 2002). Portanto, quanto maior a concentração de metais pesados, maior a existência de bactérias resistentes a eles. Esse dado foi corroborado no presente estudo, pois Zn e Cr foram os metais que apresentaram maior concentração nos sedimentos e em relação aos quais mais da metade das cepas testadas

mostraram-se resistentes, enquanto que Cu teve concentração mais baixa e consequentemente menor porcentagem de cepas resistentes.

Cromo, especialmente Cr (VI), exibe pequena atividade biológica, devido à baixa interação com macromoléculas, podendo ser considerado menos tóxico que outros metais pesados (ARSLAM *et al.*, 1987). Porém o cromo é facilmente transportado através de membranas, como resultado da atividade de transportadores inespecíficos de fosfato ou sulfato (BUTTNER & BEYERSMANN, 1985), e só através de várias reações químicas dentro da célula, por meio de diversos agentes redutores o cromo pode sofrer redução formando cromo hexavalente que é conhecido como um agente carcinogênico e mutagênico por ser capaz de formar ligações com RNA e DNA ou proteínas e induzir mutação (YANG *et al.*, 1992).

A relativa baixa toxicidade em relação a outros metais, além da sua maior concentração na Baía do Araçá, pode explicar a maior porcentagem de cepas resistentes ao cromo do que aos outros metais.

Sabe-se que o Zn é um elemento traço essencial à célula bacteriana, mas em altas concentrações é um potente inibidor do transporte de elétrons na respiração celular (CHOUDHURY & SRIVASTAVA, 2001). Entretanto, a sua toxicidade é muito menor quando comparada a de outros metais como Hg, Cd, Cu, Ni, Co e Pb (DUXBURY, 1981), o que pode explicar os resultados obtidos neste estudo, no qual, mais da metade das cepas de bactérias isoladas da Baía do Araçá apresentaram resistência ao Zn.

As cepas isoladas apresentaram menor resistência para Cu, isso pode ser explicado, pois esse metal é associado com toxicidade aguda e crônica em bactérias, e afeta fortemente o sistema enzimático e metabolismos celulares essenciais (ACHARD-JORIS *et al.*, 2007).

Entretanto, em relação ao Cd, 38% das cepas bacterianas foram resistentes, apesar das baixas concentrações de cádmio nos sedimentos da Baía do Araçá. De fato, vários estudos demonstraram a presença de bactérias tolerantes a metais pesados em locais não poluídos ou com baixa de concentração de metais pesados (DUXBURY & BICKNELL, 1983). Esse fator pode ser explicado devido a sua toxicidade, pois Cd é um dos metais mais tóxicos aos seres vivos e doses muito mais baixas revelam efeito adverso na biota (CCME, 2002). Portanto baixas concentrações de Cd são capazes de

selecionar bactérias resistentes, pois concentrações mais altas são letais (KAFILZADEH *et al.*, 2013).

Akinbowale *et al.* (2007) encontraram resistência bacteriana para os mesmos metais testados nesse estudo na seguinte ordem: Cu>Cr>Zn>Cd enquanto que, Matyar *et al.* (2008), nos sedimentos da baía de Iskenderum na Turquia, encontraram bactérias mais resistentes ao Cd, seguido de Cu e depois Cr. Isso mostra que existem diferenças nas concentrações de metais pesados de sedimentos de diferentes regiões de acordo com as atividades antrópicas realizadas, o que reflete no perfil de resistência bacteriana.

No presente estudo houve porcentagem significativa de bactérias multi-resistentes, sendo que quase 50% das cepas testadas foram resistentes concomitantemente a dois metais ou mais. A multi-resistência tem sido relatada em diversos estudos, como o de Diaz-Ravina *et al.* (1994), que encontraram forte correlação de cepas resistentes ao Cd com cepas resistentes ao Zn. Isso indica que existem mecanismos de tolerância similares para esses metais ou a existência de um mesmo sítio de ação, como discutido por Doelman (1985).

É disseminado na literatura o fato de que bactérias podem desenvolver tolerância a dois ou mais metais depois da exposição a apenas um metal (DOELMAN, 1985). Blanck & Wanberg (1991) estudaram padrões de tolerância a metais em comunidades marinhas de perifiton e encontraram que uma múltipla tolerância só ocorre com compostos tóxicos que apresentam mecanismos de toxicidade parecidos.

Diversos outros estudos também demonstram essa co-tolerância como um fenômeno comum tanto para algas quanto para bactérias em ecossistemas aquáticos (TAKAMURA *et al.*, 1989; PENNANEN *et al.*, 1996).

Valores de CMI também podem estar relacionados à concentração e toxicidade de metais no ambiente. Malik *et al.* (2002) isolaram cepas bacterianas de solo de áreas industriais e reportaram máximo de CMI de 2400 µg ml⁻¹ para Cu, Cd e Zn e Cr. Assim como no presente estudo, em que a CMI chegou a valores máximos de 3200 µg/ml para todos os metais menos para Cd que apresentou CMI máximo de 800 µg ml⁻¹.

Estudo realizado por Malik & Jaiswal (2000) também mostrou valores altos de CMI para cepas isoladas e associou seu resultado à localização da área de amostragem. À semelhança do que ocorreu neste trabalho, Malik &

Jaiswal (2000) coletaram suas amostras em locais próximos ao despejo de efluentes industriais e domésticos. No presente estudo os pontos de coleta eram próximos a lançamentos de esgotos domésticos e de efluentes industriais, além de estarem próximos do Porto de São Sebastião e ao TEBAR.

Dessa maneira, a distribuição da resistência bacteriana ao longo da baía do Araçá pode estar relacionada à área de influência da disposição desses efluentes uma vez que, tanto as maiores concentrações de metais, quanto as maiores porcentagens de cepas resistentes foram encontradas nos pontos próximos ao canal de São Sebastião, na região do sublitoral, corroborando a existência de maior contaminação proveniente do canal de São Sebastião e não próximo à costa da baía.

No presente trabalho, apesar das concentrações de metais estarem, no geral, abaixo dos valores de referência do *Canadian Sediment Quality Guidelines* (SQG), foi possível observar frequências elevadas de cepas bacterianas resistentes, o que indica a existência de prováveis efeitos na biota, especialmente na área de sublitoral, indicando que esses microrganismos já estão sofrendo alterações.

Este fato é muito preocupante uma vez que as bactérias são os organismos mais abundantes no sedimento e representam os primeiros degraus de transferência de componentes tóxicos a níveis tróficos superiores (GILLAN *et al.*, 2005). Devido a isso, os resultados encontrados indicam a necessidade de monitoramento da poluição na Baía do Araçá. Além disso, outros estudos demonstram a importância no monitoramento da existência de bactérias resistentes a metais pesados em ambientes contaminados, pois esse fator predispõe que essas bactérias sejam resistentes a antibióticos, sendo, portanto um grave problema de saúde pública (SPAIN & ALM, 2003).

Uma significativa porção das bactérias identificadas neste estudo pertence ao grupo de bactérias gram-positivas, o que se assemelha aos resultados encontrados em outros estudos (GONTANG *et al.*, 2007; NITHIA & PANDIAN, 2010).

Estudos anteriores estimaram que apenas 5% das bactérias encontradas no oceano eram gram-positivas (ZOBELL, 1946), entretanto estudos mais recentes sugerem que a abundância e diversidade de gram-positivas em sedimentos são consideradas muito maiores (PRIEST, 1989;

STACH & BULL, 2005; JENSEN *et al.*, 2005). Portanto o presente estudo indica a grande abundância e diversidade de bactérias gram-positivas também nos sedimentos marinhos brasileiros.

Em relação à identificação das cepas isoladas, o gênero *Bacillus* apresentou-se em dominância em relação aos demais gêneros. Diversos outros estudos com objetivo de isolar bactérias resistentes a metais pesados acabam encontrando grande quantidade desse gênero (BELLIVEAU *et al.*, 1991; KAMALA-KANNAN *et al.*, 2006, 2007), o que pode indicar que *Bacillus* sp apresenta-se como um grande potencial para biorremediação de áreas marinhas e estuarinas contaminadas por metais pesados.

Kamala- Kannan & Lee (2008) também isolaram bactérias resistentes a metais pesados em sedimentos da Baía Sunshon na Coreia do Sul, e todas foram identificadas como *Bacillus* sp, sugerindo que a poluição antrópica acaba por selecionar espécies resistentes. Nesse caso, *Bacillus* sp acabam por se apresentar como o grupo taxonômico dominante nas comunidades de bactérias heterotróficas em áreas contaminadas.

O gênero *Staphylococcus* sp também apresenta-se como um gênero potencial para uso em biorremediação. O trabalho de Baker-Austin *et al.* (2006) afirma que *Staphylococcus* sp é resistente a múltiplos metais pesados, semelhante ao que foi obtido no presente estudo.

Diversas espécies do gênero *Vibrio* e *Planococcus maritimus* também foram isoladas de sedimentos marinhos em outros estudos e apresentaram resistência a diversos metais, inclusive apresentando co-resistência a antibióticos (NITHIA & PANDIAN, 2010).

A poluição do ambiente marinho por efluentes proveniente de indústrias, atividades portuárias, entre outras, e que contenham metais pesados, seleciona bactérias resistentes a diversos metais, tornando-se um problema não só para biota local, como também de saúde pública, pois existe forte co-resistência de metais e antibióticos (BAKER-AUSTIN, 2006).

Recentemente, o Comitê Científico na Identificação de Novos e Emergentes Riscos à Saúde, sugeriu que diversos biocidas, incluindo metais pesados, podem contribuir para seleção e manutenção de bactérias com resistência múltipla a antibióticos (SCENIHR, 2009), através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis e mobilizáveis que transportam

simultaneamente genes que conferem resistência a antibióticos e tolerância a biocidas ou através da partilha dos mesmos mecanismos de resistência (HASMAN *et al.*, 2002; SCENIHR, 2009).

Outros trabalhos revelaram esse potencial problema de saúde pública como Pettibone *et al.* (1996) e Pathak & Gopal (2005), que observaram que bactérias isoladas de peixes apresentavam-se resistente a diversos metais pesados e a antibióticos, concomitantemente. Dessa maneira, fazendo com que essas bactérias cheguem facilmente à população.

Esse problema é ainda agravado pois muitas dessas bactérias são patogênicas, podendo causar graves problemas aos seres humanos. Por exemplo, a espécie *Staphylococcus aureus* que tem se tornado bastante relevante nas últimas décadas por ser responsável por causar infecções hospitalares com altos níveis de morbidade e letalidade, e em boa parte dos casos sua multi-resistência acaba dificultando o tratamento (VELASQUEZ-MEZA, 2005). Outro exemplo é a espécie *Bacillus cereus* que pode causar graves infecções alimentares, e se forem resistentes a antibióticos o tratamento dessas infecções acaba sendo extremamente dificultado (ANDERSON BORGE *et al.*, 2001).

Esse é mais um fator que evidencia a necessidade no monitoramento de contaminações de metais pesados no ambiente que acaba selecionando bactérias resistentes com grande potencial para serem resistentes também a antibióticos.

7. CONCLUSÕES

A maior parte dos metais pesados contaminantes da Baía do Araça é, provavelmente, proveniente do canal de São Sebastião, que acaba por selecionar uma maior quantidade de cepas resistentes na região do sublitoral que se encontra mais próxima ao canal, sofrendo maior influência dos seus contaminantes. Já o entremarés acaba ficando mais protegido da influência da contaminação por metais, que foram encontrados em concentrações significativamente menores.

A maioria dos pontos amostrados se apresentaram em concentrações menores do que as consideradas nocivas para o ambiente de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação canadense. Mas vale ressaltar a importância na criação de uma legislação brasileira para concentrações de metais aceitáveis em sedimentos, uma vez que sedimentos de regiões diferentes apresentam diferentes constituintes e condições físico-químicas, além da biota apresentar características e metabolismo extremamente distintos e específicos. Dessa maneira, esses valores utilizados podem não representar de fato valores de concentrações de metais que realmente causem danos a biota desse ambiente.

Concentrações altas de metais podem influenciar negativamente a abundância dos microrganismos, através da diminuição de densidade bacteriana com o aumento da concentração de metais.

Em compensação uma relação inversa é visualizada em relação a seleção de cepas resistentes. A porcentagem de cepas resistentes se correlacionou positivamente com as concentrações de metais encontradas, dessa maneira a maior quantidade de cepas resistentes acaba se concentrando em regiões com maior concentração de metais. Essa relação apenas não visualizada com metais muito tóxicos que acabam sendo letais e inibindo crescimento bacteriano.

Dessa maneira, foi possível observar o aumento da poluição do canal de São Sebastião através das atividades portuárias, petrolíferas e da presença de efluentes domésticos e industriais influenciando fortemente na seleção de cepas resistentes a metais.

Através da identificação molecular foram identificados gêneros de bactérias de origem marinha como *Bacillus*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, entre outros como tendo resistência a diversos metais e potencial para serem utilizadas em estudos de biorremediação.

O gênero *Bacillus* pode ser considerado um grupo dominante de bactérias heterotróficas em áreas contaminadas por metais pesados, podendo inclusive poder ser utilizado como bioindicador desse tipo de poluição.

As bactérias isoladas apresentam grande potencial para serem usadas na biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados, apresentando uma média de concentração mínima inibitória relativamente alta.

Existe a necessidade de um monitoramento da poluição por metais pesados na Baía do Araça, pois já existe a seleção de bactérias resistentes a metais pesados e além das bactérias serem o primeiro degrau para transferência desses contaminantes para a cadeia trófica.

Futuros estudos devem ser encorajados nesta ceara, uma vez que pouquíssimos trabalhos desse tipo são realizados em áreas marinhas brasileira que apresentam um enorme potencial de microrganismos que talvez ainda nem tenham sido descobertos e estudados.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.M.; RACHID, B.R.; MOSER, G.A.; OLIVEIRA, A.J.F. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 643-661, 2012.

ACHARD-JORIS, M.; MOREAU, J. L.; LUCAS, M.; BAUDRIMONT, M.; MESMER-DUDONS, N.; GONSALEZ, P.; BOUDOU, A.; BORDINEAUD, J. P. Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins. **Biochemie**, v. 9; p. 1474-1488, 2007.

AHMAD, S. & YADAVA, J.N.S. Infectious mercury resistance and its co-transfer among *E. coli* strains. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 26, p. 601-605, 1988.

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 177-182, 2007.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. 2 ed. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 368p.

ALVES, R.I.S.; TONANI, K.A.; NIKAIIDO, M.; CARDOSO, O.O.; TREVILATO, T.M.B.; SEGURA-MUNHOZ, S.I. Avaliação das concentrações de metais pesados em águas superficiais e sedimentos do córrego Monte Alegre e afluentes, Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Ambi-Agua**, v.5, n.3, p. 122-132, 2010.

AMARAL, A.C.Z.; MIGOTTO, A.E.; TURRA, A. & SVHAEFFER-NOVELLY, Y. Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 1-47, 2010.

ANDERSON BERGE, G.I.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P.E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 237-246, 2001.

ANDRADE, S.; POBLET, A.; SCAGLIOLA, M.; VODOPIVEZ, C.; CURTOSI, A.; PUCCI, A.; MARCOVECCHIO, J. Distribution of heavy metals in surface sediments from an Antarctic marine ecosystem. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 66, p. 147–158, 2001.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; WOLF, L.; LEE, M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C. Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of Total Environment**, v. 408, n.7, p. 1501-1507, 2010.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; OKEKE, B.C.; CAMARGO, F.A.O. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 66-74, 2011.

ARSLAM, P.; BELTRAME, M.; TOMASI, A. Intracellular chromium reduction. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.931, n.1, p. 10-15, 1987.

AZAM, F.; VACCARO, R. F.; GILLESPIE, P. A.; MOUSSALLI, E. I.; HODSON, R. E. Controlled ecosystem pollution experiment: Effect of mercury on enclosed water columns. **Marine bacterioplankton Marine Science Communities**, v. 3, p. 313-329, 1977.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPAUNAUSKAS, R.; McARTHUR, J. V. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176-182, 2006.

BELLIVEAU, B.H.; STARADUB, M.E.; TREVOR, J.T. Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 513-520, 1991.

BELÚCIO, L.F. **Comunidades bênticas de moluscos da zona entremarés da região do Araçá, São Sebastião, SP**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

BLANCK, H.; WANGBERG, S. A. Pattern of cotolerance in marine periphyton communities established under arsenate stress. **Aquatic Toxicology**, v. 21, p. 1-14, 1991.

BLUM, L.K., ROBERTS, M.S., GARLAND, J.L., MILLS, A.L. Distribution of microbial communities associated with the dominant high marsh plants and sediments of the United States East Coast. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 3, p. 375–388, 2004.

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

BUTTNER, B.; BEYERSMANN, D. Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate. **Xenobiotica**, v. 15, n.8, p. 735-741, 1985.

CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; JACQUES, R.J.S.; ROESCH, L.F.W.; FRANKENBERGER, W.T. Uso de micro-organismos para a remediação de metais. **Tópicos Especiais em Ciência do Solo**, v. 5, p. 467-496, 2007.

CASTRO-FILHO, B.M. Wind driven currents in the Channel of São Sebastião: winter, 1979. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 38, n. 2, p. 111-132, 1990.

CETESB (São Paulo). Relatório Sistema estuarino Santos – São Vicente. Relatório Técnico. 141p. 2001.

CCME. **Canadian environmental quality guidelines**, National Guidelines and Standards Office. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment, 12 p., 2002.

CHAPMAN, P.M., WANG, F., JANSSEN, C., PERSOONE, G., ALLEN, H.E. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 2221–2243, 1998.

CHEN, S. & WILSON, D. B. Genetic engineering of bacteria and their potential for Hg²⁺ bioremediation. **Biodegradation**, v. 8, p. 97–103, 1997.

CHOUDHURY, R.; SRIVASTAVA, S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. **Current Science**, v. 81, n. 7, p. 768-775, 2001.

DASH, H.R.; MAGDWANI, N.; CHAKRABORYI, J.; KUMARI, S.; DAS, S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 561–571, 2013.

DELL'ANNO, A.; MEI, M. L.; IANNI, C.; DANOVARO, R. Impact of bioavailable heavy metals on bacterial activities in coastal marine sediments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 93-100, 2003.

DIAZ-RAVINA, M.; BATH, E.; FROSTEGARD, A. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by the thymidine incorporation technique. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n.7, p. 238-247, 1994.

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

DOELMAN, P. Resistance of soil microbial communities to heavy metals. Ed: JENSEN, V.; KJOLLER, A.; SORRENSEN, L.H. **Microbial communities on soil**. London, Elsevier, p. 369-384, 1985.

DANOVARO, R., MARRALE, D., DELL'ANNO, A., DELLA CROCE, N., FABIANO, M. Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. **Progress in Oceanography**, v. 46, p. 345–366, 2000.

DÖBLER, W. Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 124-33, 2003.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal tolerant bacterial population populations from natural and metal polluted soils. **Soil Biology and Biochemistry** v. 15, p. 243 – 250, 1983.

DUXBURY, T. Toxicity of heavy metals to soil bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 11, p. 217–220, 1981.

DUXBURY, T. Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. In: MARCHALL, K.C. (Editor) **Advances in microbial ecology**, v. 8, New York: Plenum, p. 185-236, 1985.

ESSA, A.M.M.; MACASKIE, L.E.; BROWN N.L. Mechanisms of mercury bioremediation. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 672-674, 2002.

FONTES, R.F.C. **As Correntes no Canal de São Sebastião**. Dissertação de Mestrado. IOUSP, 1995, 159p.

FÖSTNER, U. G.; WITTMANN, G. T. W. Metal Pollution in the Aquatic Environmental, Springer-Verlag: Berlin, 1981.

GADD, G.M.; WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution- a working biotechnology? **Trends in Biotechnology**, v. 11, p.353-359., 1993.

GAUDETTE, H.E.; FLIGHT, W.R; TONER, L. & FOLGER, D.W. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 44, n. 1, p. 249-253, 1974.

GILLAN, D.C.; DANIS, B.; PERNET, P.; JOLY, G.; DUBOIS, P. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 679–690, 2005.

GILLER, P.S.; MALMQVIST, B. **The Biology of Streams and Rivers**. Oxford University Press, New York, 1998.

GOMES, N.C.M.; HAGLER, L.C.S.M.; SAVVAIDIS, I. Metal Bioremediation by Microorganisms. **Revista de Microbiologia**, p. 28, v. 85-92, 1998.

GONTANG, E.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3272–82, 2007.

GUBITOSO, S. Influência de efluentes domésticos e petroquímicos em sedimentos e carapaças de foraminíferos do canal de São Sebastião, SP. 2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HAFEBURG, G.; KOTHE, E. Microbes and metals: interactions in the environment. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 453-467, 2007.

HAMELS, I., SABBE, K., MUYLEAERT, K., VYVERMAN, W. Quantitative importance, composition, and seasonal dynamics of protozoan communities in polyhaline versus freshwater intertidal sediments. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 1, p. 18–29, 2004.

HASMAN, H.; AARESTRUP, F.M. *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptides resistance. **Antibiotic Agents and Chemoterapy**, v. 46, n. 5, p. 1410-1416, 2002.

HORTELLANI, M.A.; SARKIS, J.E.S.; ABESSA, D.M.S. & SOUSA, E.C.P.M. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos – São Vicente. **Química Nova**, v.31, p.10-19, 2008.

HUGHES, M.N. & POOLE, R. K. **Metals and Micro-organism**. Chapman and Hall, London, 280 p, 1980.

IVORRA, N., BREMER, S.; GUASCH, H.; KRAAK, M.H.S.; ADMIRAAL, W. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p.1332–1339, 2000.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 340–343, 2005.

JENSEN, P. R.; MINCER, J.; WILLIAMS, P. G.; FENICAL, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 87, p. 43-48, 2005.

JI, G. & SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 61-75, 1995.

JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 378-386, 2004.

JOHO, M.; INOUE, M.; TOHOYAMA, H.; MURAYAMA, T. Nickel resistance in yeast and other fungi. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 64-168, 1995.

KAFILZADEH, F.; ZAHIRIAN, Y.; ZOLGHARNEIN, H. Isolation and molecular identification of mercury resistant bacteria and detection of *Escherichia coli* mercuric reductase gene from wastewater of Khowr-e-Musa, Iran. **International Journal of Biosciences**, v. 3, n. 8, p. 313-318, 2013.

KAMALA-KANNAN, S.; MAHADEVAN, S.; KRISHNAMOORTHY, R. Characterization of a mercury-reducing *Bacillus cereus* isolated from the Publicat Lake sediments, South East Coast of India. **Archives of Microbiology**, v. 185, p. 202-211, 2006.

KAMALA-KANNAN, S.; KRISHNAMOORTHY, R.; LEE, K.J.; PUROSOTHAMAN, A.; SANTHI K.; RAO, N.R. Aerobic chromate reducing *Bacillus cereus* isolated from the heavy metal contaminated ennore creek sediment, North of Chennai, Tamil Nadu, South East. **India Research Journal Microbiology**, v. 2, p. 133-140, 2007.

KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K. J. Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunchon Bay, South Korea. **Biotechnology**, v. 7, n.1, p. 149-152, 2008.

LONE, M.I.; HE, Z.; STOFFELLA, P.J.; YANG X. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 9, p. 210-220, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.A.; CLARK, D.P. **Brock biology of microorganisms**, 13th ed. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, CA, 2010.

MALIK, A.; JAISWAL, R. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.16, p. 177-182, 2000.

MALIK, A., KHAN, I. F.; ALEEM, A. Plasmid incidence in bacteria from agricultural and industrial soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p.827 – 833, 2002.

MARQUES, A. M.; CONGREGADO, F.; SIMON-PAJOL, D. M. Anti-biotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 47, p. 347-350, 1979.

MASHIATULLAH, A.; CHAUDHARY, M. Z.; AHMAD, N.; JAVED, T.; GHAFAR, A. Metal pollution and ecological risk assessment in marine sediments of Karachi Coast, Pakistan. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 185, p. 1555–1565, 2013.

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

MIRANDA L.B.; CASTRO-FILHO B.M. Variabilidade da circulação e do transporte de volume no Canal de São Sebastião (SP): outono de 1980. **Publicação especial do Instituto Oceanográfico**, n. 11, p. 1-9, 1995.

MISRA, T.K. Bacterial resistences to inorganic mercury salts and organomercurials. **Plasmid**, v. 27, p. 4-16, 1992.

MORENO, M., FERRERO, T.J., GRANELLI, V., MARIN, V., ALBERTELLI, G., FABIANO, M. Across shore variability and trophodynamic features of meiofauna in a microtidal beach of the NW Mediterranean. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 66, p. 357–367, 2006.

MURATA, K.; FUKUDA, Y.; SHIMOSAKA, M.; WANTANABE, K., SAIKUSA, T.; KIMURA, A. Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1200-1207, 1985.

NAKAHARA, H.; ISHIKAWA, T.; YASUNAGA, S.; KONDO, I.; KOZUKUE, H.; SILVER, S. Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 33, p. 975-976, 1977.

NASCIMENTO, S. C.; HYPOLITO, R.; RIBEIRO, A. A. Disponibilidade de metais pesados em aterro de indústria siderúrgica. **Engenharia Sanitária Ambiental** [online], v.11, n.3, p. 196-202, 2006.

NEIVA, J. **Conheça o petróleo**. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1993.

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

NITHIA, C.; PANDIAN, S. K. Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. **Microbiological Research**, v. 165, p. 578—593, 2010.

OLIVEIRA, A.J.F.; HOLLNAGEL, H.C.; MESQUITA, H.S.L.; FONTES, R.C. Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Pereque Beach, Guarujá (SP), Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 921–927, 2007.

OUTTEN, F. W., OUTTEN, C.E.; O'HALLORAN, T. Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance, p. 145–157. *In*: STORZ, G. & HENGGE-ARONIS, R.; R. (ed.), **Bacterial stress responses**. ASM Press, Washington, D.C., 2000.

PATHAK, S.P.; GOPAL, K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. **Environmental Research**, v. 98, p. 100–103, 2005.

PENANNEN, T.; FROSTEGARD, A.; FRITZE, H.; BAATH, E.
Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 420-428, 1996.

PEREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; MILLWARD, G. E.; ABREU, S. N.; VALE, C.; **Water Science Technology**, v. 37, p. 125, 1998.

PETTIBONE, G.W. et al. Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in *Aeromonas* isolated from brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 234–240, 1996.

PINTO, A. B.; PEREIRA, C. R.; OLIVERIA, A.J.F.C. Densidade de *Enterococcus* sp em águas recreacionais e areias de praias do município de São Vicente-SP, Brasil e sua relação com parâmetros abióticos. **O mundo da saúde**, v. 36, n. 4, p. 587-593, 2012.

PHILLIPS, D. J. H. **Environmental Pollution**, 1977, v. 13, 281p.

POOLE, R. K. & GADD, G. M. **Metals: Microbe Interactions**. IRL Press, Oxford, 1989 p. 1-37.

PRIEST, F. G. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. Em: HAWORD, C. R. (Ed). **Bacillus**, Plenum Press, New York, p. 27-56, 1989.

RAINBOW, P.S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 183–192, 1985.

ROUCH, D. A.; LEE, B. T. D.; MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Industrial Microbiology** , v. 14, p. 132-141, 1995.

SANTHIYA, G.; LAKSHUMANAN, C.; SELVIN, J.; ASHA, D. Microbiological analysis of seawater and sediments in urban shorelines: Occurrence of heavy metals resistance bacteria on Chennai beaches, Bay of Bengal. **Microchemical Journal**, n. 99, p. 197-202, 2011.

SCHWARZ, S.T. & HOBEL, H. Plasmid and resistance to anti-microbial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* from pigs and cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, p. 669-673, 1989.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). **Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides**. 2009. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf, Acessado em: 27 de setembro de 2014.

SILVER, S. Plasmid-determined metal resistance mechanisms: Range and overview. **Plasmid**, v. 27, p. 1-3, 1992.

SILVER, S. Bacterial resistance a toxic metal ions - a review. **Gene**, v. 179, p.9-19, 1996.

SOUZA, A. F. C. **Caracterização molecular e avaliação de resistência a chumbo e cádmio em bactérias isoladas de rizosferas de plantas coletadas em santo amaro (BA)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2013.

SPAIN, A. & ALM, C. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. **Reviews in undergraduate research**, v. 2, p. 1-6, 2003.

STACH, J. E. M.; BULL, A.T. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 87, p. 3-9, 2005.

SUGUIO, K. 1973. **Introdução à sedimentologia**. Editora Edgard Blucher Ltda /EDUSP.

TAKAMURA, N.; KUSAI, F.; WATANABE, M. Effects of Cu, Cd, Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 39-52, 1989.

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

TREVORS, J.T., ODDIE, K.M. & BELLIVEAU, B.H. Metal resistance in bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, p. 39-54, 1985.

TYLER, G. Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. **Plant and Soil**, v. 41, p. 303-311, 1974.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1994.
Method
3051. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges. Soils and oils. Revision 0. September.

YANG, J.L.; HSIEH, Y.C.; WU, C.W.; LEE, T.C. Mutational specificity of chromium(VI) compounds in the hprt locus of Chinese hamster ovary-K1 cells. **Carcinogenesis**, v.13, n.11, p. 2053- 2057, 1992.

VAXEVANIDOU K., PAPASSIOPI N., PASPALIARIS I. Removal of heavy metals and arsenic from contaminated soils using bioremediation and chelant extraction techniques. **Chemosphere**, v. 70, p. 1329–1337, 2008.

VOSS, M. & THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, v. 31, p. 947-951, 2001.

YANG, H., & ROSE, N. L. Distribution of Hg in six lake lake sediments core across the UK. **Science of the Total Environment**, v. 304, p. 391–404, 2003. DOI: 10.1016/S0048-9697(02)00584-3

ZOBEEL, C.E. **Marine microbiology: a monograph on hydrobacteriology**. Chronica Botanica Co., Walthman, M.A., 1946.