

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

TIARA KESLI CONTICELLI TEODÓSIO

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Enterococcus faecalis ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar
Enteritidis CCT 4475 E INTERAÇÃO entre *Enterococcus faecalis*
ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475
NA REMOÇÃO DE COBRE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
MAIO 2011**

TIARA KESLI CONTICELLI TEODÓSIO

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Enterococcus faecalis ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar
Enteritidis CCT 4475 E INTERAÇÃO entre *Enterococcus faecalis*
ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475
NA REMOÇÃO DE COBRE**

**ORIENTADOR: PROF. Dra. KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES
CO-ORIENTADOR: PROF^o Dr. GIAN PAULO GIOVANNI
FRESCHI**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS
MAIO 2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

589.9 Teodósio, Tiara Kesli Conticelli.
T314e Estudo do potencial biotecnológico de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 na remoção de cobre / Tiara Kesli Conticelli Teodósio. – Dourados, MS : UFGD, 2011.
87 f.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes.
Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia Ambiental) –
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Bactérias. 2. Salmonella. 3. Enterococcus. I. Título.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Estudo do potencial biotecnológico de Enterococcus faecalis ATCC 51299, Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre Enterococcus faecalis ATCC 51299 e Samonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 na remoção de cobre”**, de autoria de Tiara Kesli Conticelli Teodósio, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profª. Drª. Kelly Cristina da Silva Brabes (Orientadora-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profª. Drª. Emília Maria Silva
Membro Examinador (UEMS)

Profª. Drª. Gisele Jane de Jesus
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 27 de maio de 2011

Dedico

À Deus e aos meus pais com todo o amor que
tenho em meu coração.

Muito Obrigada,

À Deus por ser a minha fortaleza, permitindo que se torne realidade tudo o que realmente é importante em minha vida.

À Deus por iluminar, proteger e abençoar sempre o meu caminho e da minha família.

Aos meus queridos pais Luiz Teodósio e Solange Maria Conticelli Teodósio pelo amor, carinho, compreensão, ensinamentos, dedicação e pelo apoio e força para superação de todas as dificuldades, como também pela participação em todas as conquistas da minha vida.

Às minhas maninhas Cassila Conticelli Teodósio e Thanize Conticelli Teodósio de Oliveira pelo amor, apoio e incentivo.

Ao meu lindo sobrinho Luiz Fernando Teodósio de Oliveira pela alegria de sua existência.

Ao meu namorado Juliano Eberhart pelo amor, carinho e dedicação.

À minha amiga do coração Denise Fabiana Takarada pela fiel amizade de mais de duas décadas.

Às minhas queridas amigas Fernanda Ferreira de Paula, Carolina Stein Buranello e Aline Hardmann Bezerra da Silva, por me proporcionarem felicidade sempre.

Obrigada a todos!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter permitido conquistar este objetivo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, pelo acesso e utilização das instalações laboratoriais e pela formação e oportunidade de realização deste curso.

À Prof^ª. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes pela orientação, dedicação, amizade e pelos ensinamentos ao longo do curso.

Ao Prof^º. Dr. Fábio Juliano Negrão pelo incentivo e ensinamentos laboratoriais.

Ao Prof^º. Dr. Gian Paulo Giovanni Freschi pela co-orientação e auxílio na elaboração do projeto de Mestrado.

À Prof^ª. Dra. Gisele Jane de Jesus e a Prof^ª. Dra. Emília Maria Silva por aceitarem o convite de participação como membro titular da banca examinadora de defesa da minha dissertação de mestrado.

Ao Felipe Manfroi Fortunato, pela importante ajuda concedida na análise das amostras por espectrofotometria de absorção atômica.

À Fabiana Gomes da Silva e Suéllen Machado de Paula pela ajuda nas análises experimentais, pela amizade e companheirismo em todas as horas desta pesquisa.

Ao Ivan Pires de Oliveira pelo auxílio nas análises de fósforo.

À Prof^ª. Dra. Lenice Heloísa de Arruda e Silva pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Prof^º. Dr. Rafael Henrique de Tonissi Buschinelli de Goes pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Marcos Henrique Wondracek, Thiago Silvério Silva e Eduardo Schwertner pela ajuda e auxílio nas análises laboratoriais.

À Prof^ª. Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon pelo incentivo e apoio durante minha graduação.

Às minhas colegas Rosmarie de Oliveira Guedes, Marichel Canazza de Macedo, Lucimara de Araújo Ramos, Quézia Moura da Silva e Adriana Araújo de Almeida pela amizade e companheirismo.

Aos professores Ivan Ramires, Nelson Luis de Campos Rodrigues e Andrelson Wellington Rinaldi pelo incentivo e apoio.

Aos professores Fabiano Antunes e Joseana Stecca Farezim Knapp pela compreensão e apoio.

Às técnicas Lujan Nunes Sanabria e Débora Regina Hoff Brait pela ajuda e auxílio no laboratório.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de variância para o crescimento das espécies avaliadas em função da concentração de cobre.....	40
Tabela 2. Crescimento das espécies nas diferentes concentrações de cobre.....	40
Tabela 3. Crescimento da biomassa em função das concentrações de cobre.....	40
Tabela 4. Análise de variância para consumo de fósforo em relação à espécie e concentração de cobre.....	44
Tabela 5. Consumo de fósforo pelas espécies nas diferentes concentrações de cobre.....	45
Tabela 6. Consumo de fósforo pela biomassa em função das concentrações de cobre.....	45
Tabela 7. Análise de variância do pH no cultivo de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299, <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes concentrações de cobre.....	50
Tabela 8. Análise de variância para remoção de cobre em função da espécie e concentração de cobre.....	54
Tabela 9. Remoção de cobre pelas espécies em diferentes concentrações de cobre.....	55
Tabela 10. Análise de variância para acúmulo intracelular de cobre em função da espécie e concentração de cobre.....	64
Tabela 11. Acúmulo intracelular de cobre pelas espécies em diferentes concentrações do metal.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 em diferentes períodos de cultivo na presença e ausência de cobre.....	37
Figura 2. Curva de crescimento de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo na presença e ausência de cobre.....	38
Figura 3. Curva de crescimento da interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo na presença e ausência de cobre.....	38
Figura 4. Consumo de fósforo inorgânico por <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 na presença de diferentes concentrações de cobre.....	42
Figura 5. Consumo de fósforo inorgânico por <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 na presença de diferentes concentrações de cobre.....	43
Figura 6. Consumo de fósforo inorgânico pela interação interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 na presença de diferentes concentrações de cobre.....	43
Figura 7. Valores de pH do meio de cultura durante o crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299.....	47
Figura 8. Valores de pH do meio de cultura durante o crescimento de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475.....	48
Figura 9. Valores de pH do meio de cultura durante o crescimento da interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475.....	48
Figura 10. Percentual de remoção de cobre por <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 em diferentes períodos de cultivo.....	52
Figura 11. Percentual de remoção de cobre por <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo.....	53

Figura 12. Percentual de remoção de cobre pela interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo.....	53
Figura 13. Eficiência de remoção de cobre por <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299.....	57
Figura 14. Eficiência de remoção de cobre por <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475.....	58
Figura 15. Eficiência de remoção de cobre pela interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475.....	58
Figura 16. Acumulação de cobre por <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299.....	62
Figura 17. Acumulação de cobre por <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475.....	63
Figura 18. Acumulação de cobre pela interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475.....	63

RESUMO

A água é um dos recursos naturais mais afetados pelo aumento da poluição. Dentre os principais poluentes, destacam-se os metais, que podem ser diretamente prejudiciais à saúde humana e aos ecossistemas. O metal cobre é amplamente utilizado nas indústrias, por isso, seu uso excessivo representa para o meio ambiente problemas de contaminação. Desta forma a remoção de metais por microrganismos em efluentes industriais tem atraído grande atenção, devido ao seu potencial de prover uma alternativa econômica e eficiente quando comparado aos processos físico-químicos convencionais. Devido a poucos estudos a respeito do uso de células vivas na remoção de metais, este estudo visou ampliar os conhecimentos fisiológicos e bioquímicos no processo de remoção ativa e contínua de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475. Os resultados obtidos demonstraram efeito significativo ($P < 0,05$) para os fatores espécie e concentrações de cobre em função do crescimento, consumo de fósforo, remoção de cobre e acúmulo intracelular de cobre, exceto para o pH. As distintas concentrações de cobre limitaram circunstancialmente o crescimento das espécies em estudo, entretanto o metal nas concentrações utilizadas não foi inibitório, o que sugere o desenvolvimento de adaptação fisiológica ao metal cobre em concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹. O requerimento de fósforo pelas células cultivadas na presença de cobre foi maior do que a cultura do grupo controle, portanto pode-se sugerir que o fósforo esteja sendo utilizado para suportar o crescimento das biomassas em presença de cobre. A capacidade máxima de acumulação intracelular de cobre foi 3,69 mg g⁻¹; 11,19mg g⁻¹ e 7,42mg g⁻¹ para as biomassas de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 respectivamente. *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou maior acúmulo intracelular de cobre quando comparado a *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Estes resultados sugerem que as cepas em estudo exibem potencial para a exploração na remoção de cobre.

Palavras-Chave: Cobre, Bioacumulação, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

ABSTRACT

Water is one of the most affected natural resources by the increase of pollution. Among the main pollutants, the ones that stand out are the metals, which can be directly harmful to human health and ecosystems. The metal copper is widely used in industries, so its excessive use represents contamination problems for the environment. Therefore, the removal of metals by microorganisms in industrial effluents has attracted great attention due to its potential to provide an economical and efficient alternative compared to conventional physicochemical processes. Owing to few studies regarding the use of living cells in the removal of metals, this study aimed to broaden the physiological and biochemical knowledge on the process of active and continuous removal of copper by *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CCT 4475 and interaction between *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CCT 4475. The results showed a significant effect ($P < 0.05$) for the species factors and concentrations of copper because of growth, consumption of phosphorus, copper removal and accumulation of intracellular copper, except for pH. The different concentrations of copper circumstantially limited the growth of the species studied, however the metal in the concentrations used was not inhibitory, suggesting the development of physiological adaptation to copper metal at concentrations of 7.72 mg L^{-1} e 15.20 mg L^{-1} . The requirement of phosphorus by the cells cultivated in the presence of copper was higher than the culture of the control group, thus it can be suggested that phosphorus has been used to support the growth of biomass in the presence of copper. The maximum capacity of intracellular accumulation of copper was 3.69 mg g^{-1} , 11.19 mg g^{-1} and 7.42 mg g^{-1} for the biomass of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CCT 4475 and interaction between *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CCT 4475 respectively. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CCT 4475 showed greater intracellular accumulation of copper in comparison to *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. These results suggest that the strains studied show potential for exploration in the removal of copper.

Key-words: Copper, Bioaccumulation, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CCT 4475.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	15
3.1.1 Contaminação do meio ambiente por metais.....	15
3.1.2 Metal cobre.....	17
3.2 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	19
3.2.1 Biotecnologia aplicada à remoção de metais.....	19
3.2.2 Mecanismos de interação entre microrganismos e metais.....	22
3.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	24
3.2.4 <i>Salmonella enterica</i> sorotipo (ou sorovar) Enteritidis.....	26
3.3 POLIFOSFATO E METAIS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 LOCAL DE ESTUDO E PREPARO DE SOLUÇÕES.....	32
4.1.1 Local de execução do estudo.....	32
4.1.2 Solução metálica.....	32
4.2 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	32
4.2.1 Microrganismo e Condições de cultivo.....	32
4.2.2 Determinação da curva de crescimento.....	33
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
4.3.1 Determinação do fósforo.....	33
4.3.2 Determinação do pH.....	34
4.3.3 Cinética de remoção do cobre.....	34
4.3.4 Acumulação de cobre.....	34

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4.5 TRATAMENTOS DE RESÍDUOS GERADOS.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Análise do perfil de crescimento.....	36
5.2 Remoção de cobre.....	51
5.3 Eficiência de remoção do cobre.....	56
5.4 Acumulação intracelular de cobre.....	62
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico trás consigo vários problemas ambientais. Os efluentes industriais são, neste contexto, responsáveis pela maioria dos descartes contendo substâncias poluentes. Dentre estas destacam-se os metais, os quais podem ser extremamente tóxicos e diretamente prejudiciais a saúde humana e aos ecossistemas e diferentemente dos agentes poluidores orgânicos não são biodegradáveis.

Alguns metais são necessários em concentrações mínimas para manutenção dos processos vitais dos seres vivos (sendo denominados de oligoelementos ou micronutrientes). Diversos metais, tais como o ferro, cobre, zinco, cobalto, manganês, cromo, molibdênio, vanádio, selênio, níquel e estanho, participam do metabolismo e da formação de muitas proteínas, enzimas, vitaminas e pigmentos respiratórios essenciais aos diversos organismos. No entanto quando os metais começam a se apresentar em concentrações acima de valores convencionais estabelecidos pela legislação, podem interferir em diferentes passos nas vias metabólicas, de forma que os íons metálicos podem acarretar mudanças na permeabilidade da parede celular, inibição da síntese protéica, interferência nos processos respiratórios, fotossíntese e inibir a ação de enzimas (Nies, 1999).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os metais que causam maior preocupação são: alumínio, cromo, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, cádmio, mercúrio e o chumbo. O metal cobre, em particular, quando encontrado em pequenas concentrações nos organismos participa ativamente no metabolismo celular, sendo um componente essencial de várias enzimas. No entanto, quando os organismos encontram-se expostos a concentrações elevadas biodisponíveis, a bioacumulação pode ocorrer, com possíveis efeitos tóxicos (Donmes e Aksu, 2001).

A contaminação por metais em ecossistemas aquáticos e terrestres assume grande importância e a pesquisa de novas tecnologias para o tratamento destes tem sido fortemente incentivada. Neste sentido o uso de microrganismos para remoção de metais em efluentes industriais tem recebido atenção cada vez maior. Segundo Gupta *et al.* (2000), a alta eficiência e baixo custo em concentrações reduzidas de metais fazem dos processos biotecnológicos, os mais vantajosos em comparação aos métodos físico-químicos empregados na remoção de metais.

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos para a obtenção de produtos e ou serviços de interesse econômico ou ambiental. A biorremediação consiste em uma técnica que utiliza microrganismos para tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos.

Os microrganismos capazes de crescer na presença de metais pesados e que apresentem uma significativa capacidade de sorção têm potencial de utilização em biorremediação. Segundo Gadd *et al.* (2004), os microrganismos possuem capacidade efetiva ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização dos metais, que influenciam no equilíbrio das espécies metálicas entre as fases solúveis e insolúveis. A mobilização dos metais pode ser realizada por quelação e transformação química, enquanto que, a imobilização pode ocorrer por precipitação, adsorção e seqüestro intracelular.

A tolerância aos metais pesados em um grande número de microrganismos tem sido correlacionada com a presença de um homopolímero de cadeia longa de fosfatos inorgânicos, denominado de polifosfato inorgânico (PoliPi). Um grande número de organismos incluindo bactérias, fungos, plantas e animais estocam energia na forma de um polímero de fosfato, que por sua vez atuam como fonte de energia, elementos de reserva de fósforo inorgânico, estoque e quelação de metais e regulador de resposta ao estresse, ressaltando grande relação entre PoliPi e estoque/tolerância/detoxificação de metais (Kulaev, 2000).

Microrganismos vivos e mortos ou seus derivados podem ser usados para remoção de metais pesados de efluentes. A maioria dos estudos, porém são direcionadas para o uso de biomassa inativa (morta). Entretanto, células vivas e em crescimento pode apresentar a vantagem de remoção ativa contínua de metais pesados após adsorção física e potencial otimização através da manipulação de organismos mais resistentes (Malik, 2004).

Mediante ao imenso montante de resíduos contaminados com metais provenientes das mais diversas atividades econômicas e associado a poucos estudos a respeito do comportamento de células vivas na remoção de metais. Esta pesquisa visou ampliar o conhecimento acerca das habilidades de remoção ativa de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475, bem como os fatores que podem influenciar neste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico de cepas bacterianas especificamente *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 durante o crescimento em presença de cobre e caracterizá-las quanto ao seu potencial biotecnológico.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil do crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 na presença e ausência do metal cobre;
- Analisar o comportamento do metabolismo de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 na presença de fósforo e avaliar o envolvimento deste na quelatação de metais;
- Caracterizar a cinética de remoção de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475;
- Avaliar a eficiência de sorção e acumulação de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL

3.1.1 Contaminação do meio ambiente por metais

Em função do crescimento populacional, do intenso uso industrial e agrícola tem elevado o descarte de inúmeros compostos tóxicos no meio ambiente. Este fato, por sua vez, vem alterando a composição química das águas, do solo, da atmosfera e dos sistemas biológicos. A legislação vigente considera resíduos com características prejudiciais à saúde humana e ao ecossistema aquele cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgoto ou em corpos d'água (CONAMA, 2005).

A humanidade vem usando a água doce, desde tempos remotos, de uma forma indiscriminada, como se esta fosse um recurso infinito. Em função do acelerado aumento da poluição de rios e lagos, ocasionada pelo despejo desordenado de rejeitos industriais e urbanos, crescem em todo o mundo a consciência da sustentabilidade e, principalmente, de que a água, em condições de uso, torna-se um recurso cada vez mais escasso (Pegorini *et al.*, 2005; Gonçalves Junior *et al.*, 2009).

A poluição de um meio aquático causa alterações nas características físicas (turbidez, cor, temperatura, viscosidade, tensão superficial), químicas (carência química de oxigênio, pH, acidez, alcalinidade, oxigênio dissolvido, nível de toxicidade, nutrientes) e biológicas, que comprometem a qualidade da água (Barros *et al.*, 2007).

Dentre as várias formas de contaminação do meio ambiente, resultantes das diversas atividades econômicas, a contaminação da água com metais pesados é uma das que têm trazido mais preocupação aos pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle de poluição (Gonçalves Junior *et al.*, 2009). Segundo Porto e Ethur (2009), os metais e seus derivados podem comprometer sensivelmente os sistemas vitais e interferir na manutenção dos ecossistemas.

Os metais pesados são emitidos por atividades de mineração e transformação de metais, bem como de atividades industriais, municipais e agrícolas. As influências geológicas e antrópicas podem determinar as concentrações de metais pesados em determinadas áreas. Os metais diferem de outros contaminantes

ambientais como constituintes naturais do meio ambiente, não devem ser eliminados, devido à necessária presença deste em pequenas concentrações no metabolismo dos seres vivos. Neste sentido os mesmos devem obedecer ao equilíbrio e legislações vigentes entre os diversos íons metálicos biodisponíveis nos ecossistemas. A investigação sobre metais pesados reuniu-se com interesse crescente nos últimos anos. Isto é em parte uma consequência da preocupação com a proteção do meio ambiente, e devido ao aumento do conhecimento sobre o papel e o efeito dos elementos metálicos sobre os organismos vivos (Aprile e Bouvy, 2010).

A indústria química é uma das maiores emissoras de poluentes contendo metais e dentre elas destacam-se: as indústrias de papel, petroquímica, cloro, fertilizantes, usinas siderúrgicas, metais não-ferrosos, automóveis, aviões, vidro, cimento, cerâmica, têxtil, curtumes e usinas termoelétricas (CONAMA, 2005). Os metais quando em solução são facilmente transportados podendo alcançar altas concentrações em áreas fechadas em razão de sua própria disposição, como constituinte natural, ou por amplificação biológica (Pinto *et al.*, 2002).

Os metais pesados constituem um grupo heterogêneo de elementos químicos, que incluem, metais, semi-metais e não metais. A expressão metal pesado se aplica a elementos que possuem massa específica maior que $5,00 \text{ g cm}^{-3}$ ou que tenham número atômico maior do que 20,00 (Gonçalves Junior *et al.*, 2000; Gonçalves Junior *et al.*, 2009).

Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde bactérias e plantas até o ser humano, porém são requeridos em baixas concentrações como micronutrientes atuando como co-fatores essenciais para metaloproteínas e certas enzimas. Em altas concentrações podem tornar-se tóxicos por danificar os sistemas biológicos já que apresentam características biocumulativas no organismo (Celere *et al.*, 2007; Nagashima *et al.*, 2009).

Embora muitos metais sejam essenciais ao bom funcionamento do organismo, outros podem ser prejudiciais, causando efeito de toxicidade agudo ou crônico. Esta toxicidade depende não só do metal tóxico em si, mas da forma como está disponível e da sua concentração, salientando-se, ainda, que a maior parte dos metais encontrados no organismo humano apresenta alta reatividade química e atividade biológica, particularmente na forma de íons, radicais ou complexos orgânicos. Os metais podem potencialmente, ser de alto risco, dependendo da quantidade ingerida e de outras

condições, como o tempo e frequência da exposição e suscetibilidade do organismo exposto (Midio e Martins, 2000; Lidino *et al.*, 2008).

Os metais pesados cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), são considerados essenciais e participam do metabolismo celular e metais pesados cádmio (Cd), chumbo (Pb) e cromo (Cr) não são essenciais, portanto, são tóxicos, mesmo em níveis de traço. (Marengoni1 *et al.*, 2008). Segundo Gonçalves Junior *et al.* (2009), os metais essenciais podem também produzir efeitos tóxicos quando em concentrações elevadas.

Deve-se considerar também que os metais pesados essenciais, benéficos e tóxicos são extremamente relevantes na interrelação dos sistemas vivos e o meio abiótico. O grande risco apresenta-se quando os contaminantes inorgânicos como metais pesados (As, Cd, Cr, Cu, Hg e Pb), encontram-se em quantidade superiores ao limite máximo preconizado por órgãos de saúde pública, e considerados tóxicos, podem causar problemas de saúde como disfunções neurológicas, distúrbios gástricos e muitos outros sintomas (Marengoni1 *et al.*, 2008).

3.1.2 Metal cobre

Os metais pesados podem influenciar nos processos de crescimento dos organismos, morfologia da célula, metabolismo, formação e destruição da membrana celular. A toxicidade resulta em alterações na estrutura dos ácidos nucleicos, proteínas, na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico atuando de maneira comprometedora nas reações bioquímicas essenciais (Bruins *et al.*, 2000).

Como constituinte natural da crosta terrestre o cobre não deve ser eliminado, uma vez que participa ativamente em concentrações traço de reações bioquímicas nos organismos vivos. Entretanto, Segundo Sodré e Lenzi (2001), devido ao aumento atividades decorrentes da agricultura, indústria metalúrgica, mineração e refino tem elevado as concentração de cobre no meio ambiente.

Metais pesados como cobre não são biodegradáveis e a sua toxicidade está condicionada ao tipo, concentração do metal e as propriedades características do ambiente e estes fatores podem influenciar diretamente na disponibilidade do metal (De Mora *et al.*, 2006).

A concentração média desse metal no solo varia de 6 a 8 mg kg⁻¹, podendo oscilar em função das atividades desenvolvidas no local (Sodré e Lenzi, 2001). Os limites recomendados de cobre dissolvido para as águas de Classe I são de 0,009 mg/L em águas doces e 0,005 mg/L em águas salinas (CONAMA, 2005).

Alguns metais são parte integrante dos processos vitais dos seres vivos. O cobre é um micronutriente essencial para a maioria, senão todos, os organismos vivos, pois é o constituinte de muitas metaloenzimas e proteínas envolvidas no transporte de elétrons, oxidação e outras reações importantes (Souza *et al.*, 2005). O cobre também atua como cofator de diversas enzimas celulares, como as catalases, citocromoxidases, dopamina-β-hidroxilase e peroxidases. As manifestações decorrentes da deficiência do metal incluem disfunção cardíaca, aumento da fração do colesterol de alta densidade, diminuição da metionina, encefalinas e diminuição da depuração da glicose (Pedrozo e Lima, 2001). Entretanto quando ocorre o aumento de suas concentrações pode se tornar tóxico e efeitos deletérios começam a surgir provocando vários desequilíbrios.

A exposição crônica ao cobre pode levar a irritação nas fossas nasais, úlceras e perfuração do septo, além da hepatotoxicidade. Distúrbios da concentração normal do cobre solúvel no organismo podem provocar hiper ou hipocupremia (Garbin *et al.*, 2005). Segundo Pedrozo e Lima (2001), as enfermidades decorrentes desta descompensação são os distúrbios genéticos de Menks e Wilson. A síndrome de Menks é uma desordem recessiva ligada ao cromossomo X, que impossibilita a incorporação do metal às enzimas cobre-específicas, levando ao um estado de deficiência do cobre caracterizada por anomalias ósseas, retardo mental severo e degeneração neurológica.

A doença de Wilson é uma moléstia de caráter autossômico recessivo, que leva ao acúmulo desse metal, inicialmente no hepatócito e posteriormente em diversos órgãos e tecidos, particularmente no cérebro, córnea e rins. Dentre as manifestações clínicas citam-se a cirrose, hepatite crônica, catarata, filtração glomerular reduzida, arritmia e cardiomiopatia (Aston *et al.*, 2000; Pedrozo e Lima, 2001). Segundo Azevedo *et al.* (2003), a epilepsia, melanoma, esclerose, aceruloplasminemia, doença de Alzheimer e a artrite reumatóide, são patologias provavelmente relacionadas com o metabolismo do cobre, porém, ainda são motivos de controvérsias e discussões.

As águas residuárias de galvanoplastia e especialmente a indústria elétrica contêm altos níveis de íons Cu²⁺ e o tratamento dessas águas para remover íons Cu²⁺ são necessárias antes do descarte (Yilmaz *et al.*, 2010). O tratamento de ambientes

contaminados por metais envolve processos físico-químicos de precipitação, floculação, eletrólise, cristalização ou adsorção; entretanto, estes processos podem ser onerosos e/ou contribuir para formação de novos contaminantes ambientais (Pinto *et al.*, 2002), além de ineficazes em baixas concentrações de metais (Yilmaz *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2006).

Em microrganismos o cobre tem seu efeito em enzimas relacionadas ao processo respiratório, entretanto em altas concentrações os íons de metais pesados podem formar complexos inespecíficos nas células, os quais são extremamente tóxicos (Nies, 1999). Segundo Wang *et al.* (2003), o cobre interage facilmente com radicais de oxigênio molecular, o que o torna um elemento potencialmente tóxico, e dessa forma, muitos microrganismos são sensíveis ao metal. Entretanto exposição dos microrganismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância pela comunidade microbiana exercendo pressão seletiva a resistência aos metais (Ellis *et al.*, 2003). Estes organismos por sua vez podem ser utilizados na remoção de metais.

A existência de uma política ambiental cada vez mais restritiva obriga ao desenvolvimento de sistemas de remoção de metais que visem à diminuição da concentração destes elementos em efluentes industriais devidos os severos problemas causados pelos metais no ambiente. Uma das alternativas é o uso da biorremediação que é definida como o uso de microrganismos com o fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente. Segundo Chatterjee e Lalitagauri (2008), os métodos biológicos têm melhor desempenho devido ao seu potencial de prover uma alternativa econômica e eficiente quando comparado aos métodos convencionais de remoção de íons metálicos em águas residuárias.

3.2 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

3.2.1 Biotecnologia aplicada à remoção de metais

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis, visando solucionar problemas globais através de produtos, serviços e ou processos para saúde, produção de alimentos e poluição ambiental, bem como à promessa de desenvolvimento industrial sustentável (Bull *et al.*, 2000).

A biotecnologia aplicada ao meio ambiente, embora ainda considerada uma área de pesquisa emergente, mostra-se potencialmente capaz de responder com soluções

efetivas para uma grande variedade de problemas relativos à poluição ambiental. A biorremediação é um processo tecnológico que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. Esta técnica utiliza sistemas biológicos para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação e/ou remoção de poluentes. Os sistemas biológicos geralmente utilizados bactérias, fungos ou plantas. No entanto, a biodegradação com microrganismos é a opção mais frequentemente empregada (Pinto *et al.* 2002).

Existem várias estratégias de biorremediação destacam-se a bioestimulação, bioadição que utilizam microrganismos e cuja aplicação isolada ou combinada poderá conduzir a uma rápida e completa degradação de poluentes. A bioestimulação tem por objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos microrganismos degradadores da comunidade indígena de uma determinada região contaminada, através da adição de nutrientes. A bioadição consiste na adição de microrganismos, pertencentes ou não à comunidade indígena, crescidos em laboratório e com capacidade para degradar o contaminante (Vogel, 1996; Widada *et al.*, 2002). Outras técnicas de biorremediação têm sido estudadas, como a biotransformação do Cr (VI) em Cr (III) por bactérias redutoras de cromo (Figueira *et al.*, 2000), a fitorremediação que utiliza vários tipos de plantas para remover, estabilizar ou destruir contaminantes em ambientes poluídos (Vidali, 2001; Arshad *et al.*, 2008), e a remediação mediada por microrganismos capazes de imobilizar o contaminante.

As técnicas de biorremediação oferecem novas possibilidades para acelerar a degradação destes poluentes, quer adicionando-se os nutrientes necessários à população microbiana natural, quer adicionando-se culturas mistas ou puras, que apresentem as vias metabólicas que permitam a rápida metabolização do contaminante (Brarker e Bryson, 2002). A aplicação biotecnológica de microrganismos geneticamente modificados pode aumentar a capacidade e eficiência de um bioissorvente (Koács *et al.*, 2010).

A biorremediação mais apropriada para tratar um determinado local, é determinada por vários fatores, tais como as características do(s) poluente(s) presente(s) como sua natureza, concentração e biodisponibilidade, a composição do sistema em termos de nutrientes e população microbiana presente no local (Dua *et al.*, 2002).

Vários autores têm estudado a remoção de compostos orgânicos: destacam-se os trabalhos efetuados por Aktas e Çeçen (2007), que estudaram a remoção de 2-clorofenol por quatro tipos de carvão ativado os trabalhos de Wu e Yu (2006, 2007), que utilizaram um fungo, *Phanerochaete chrysosporium*, para a remoção de 2, 4 – diclorofenol, 2 – clorofenol, 4 – clorofenol e fenol e, ainda, os de Rubín *et al.* (2006), com a alga castanha, *Sargassum muticum*, para a remoção dos mesmos compostos. Wu e Yu concluíram que o fungo utilizado apresentava melhores resultados de remoção para o fenol enquanto os segundos chegaram à conclusão que a alga castanha por eles utilizada removia mais eficazmente o 4- clorofenol. A utilização de microrganismos para a remoção de cresóis foi estudada por Tallur *et al.* (2006), que estudaram a biodegradação de *p*-cresol por *Bacillus* sp e concluíram que esta bactéria é capaz de utilizar *p*- cresol como fonte de carbono e energia.

Diferentemente dos compostos orgânicos os metais não são biodegradáveis, ou seja, nenhum processo pode degradar, ou eliminar estes elementos inorgânicos. Entretanto, a sua imobilização mediada pelos microrganismos, pode ser uma alternativa eficaz a fim de proteger solos, águas subterrâneas e o ecossistema de uma contaminação (Sprocati *et al.*, 2006).

Alguns sistemas biológicos com algas marinhas, fungos, leveduras, bactérias, resíduos biológicos (agrícolas, florestais), foram testados em estudos de biossorção de metais com resultados muito promissores. É válido ressaltar que certa biomassa pode remover uma larga gama de metais pesados, enquanto outras são específicas para certo tipo de metal (Vieira e Volesky, 2000).

As principais vantagens do uso de microrganismos para imobilização de metais incluem baixos custos de operação, minimização do volume de químicos e alta eficiência na desintoxificação de efluentes diluídos (Tunali *et al.*, 2005).

Demir e Arysol (2007), desenvolveram um estudo com o objetivo de analisar os custos e benefícios das remoções química e biológica do Cr (VI). Estes autores compararam a remoção de Cr (VI) por *Bacillus thuringiensis* com a remoção do mesmo íon por um método químico (resina de troca iônica). Os resultados obtidos apresentaram na remoção química uma percentagem de remoção de cromo de 99,68 %, enquanto para a remoção biológica se obteve uma remoção de 59,3 % e o custo da remoção por resina de troca iônica foi aproximadamente o dobro do valor da remoção por *Bacillus thuringiensis*. Por conseguinte, o custo por unidade na remoção química é mais alto,

mas é mais alta também a percentagem de remoção, no entanto, a remoção biológica trás inúmeros benefícios não mensuráveis para a saúde humana e o ambiente, pelo que é do interesse das indústrias adotarem sempre os métodos biológicos em detrimento dos métodos químicos.

Muitos microrganismos, incluindo fungos, algas e bactérias possuem a habilidade para remover metais pesados do meio ambiente (Moore *et al.*, 2008; Debelius *et al.*, 2009; Yilmaz *et al.*, 2010). Entretanto a capacidade de remoção, assim como, o mecanismo de acumulação pode variar amplamente de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo a linhagem. Células, produtos excretados, parede celular e polissacarídeos têm potencial para remover metais de solução. Fatores externos como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade de acumulação (Cotoras, 1992; Nakajima e Sakagushi, 1986).

3.2.2 Mecanismos de interação entre microrganismos e metais

Alguns microrganismos exibem capacidade de crescer em elevadas concentrações de metais. Os microrganismos desenvolveram diferentes mecanismos de resistência/tolerância aos metais pesados, dentre os quais: seqüestro intra e extracelular; bombas de efluxo; redução e complexação. Qualquer um desses processos resulta em diminuição da toxicidade do metal (Gomes *et al.*, 1998; Nies, 1999).

A biossorção é um processo pelo qual certos tipos de microrganismos, vivos ou mortos, podem sequestrar ou concentrar metais pesados a partir de soluções aquosas (Naja e Volesky, 2006). As características químicas e biológicas destes processos de remoção são importantes para o entendimento do papel dos íons metálicos nas funções celulares básicas e também para a determinação da forma mais eficaz de aplicação destes processos na desintoxificação de efluentes industriais poluídos com metais pesados com o recurso de biomassa (Prado Acosta *et al.*, 2005).

Os microrganismos exibem uma grande capacidade de captação e acúmulo de metais através de processos que podem ser ou não dependentes do metabolismo. Os microrganismos possuem dois mecanismos distintos de acumulação de metais, onde o primeiro envolve a adsorção físico-química à superfície celular, constituindo um processo independente do metabolismo que é denominado de biossorção. O segundo é

exclusivamente dependente do metabolismo celular e envolve transporte ativo dos metais para o interior da célula, sendo conhecido como bioacumulação (Gomes *et al.*, 1998).

O fenômeno de biossorção está relacionado à superfície celular a presença de grupos carregados negativamente em vários componentes que formam a parede celular confere um caráter aniônico à superfície celular, resultando na atração passiva dos íons de metais a mesma. Sendo assim, a ligação dos íons metálicos ocorre por interações eletrostáticas destes com grupos funcionais (OH^- , HPO_4^{-2} , R^- , COO^- , $-\text{SH}$, NH_2^+) presentes em carboidratos, lipídios e proteínas da superfície celular (Vieira e Volesky, 2000). Desta forma, a capacidade de “adsorver” metais vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie (Gomes *et al.*, 1998).

A bioacumulação é um processo mais lento do que a biossorção e pode ser inibida pela ausência de nutrientes tais como glicose, nitrogênio e fósforo, e pela ação de inibidores metabólicos e fatores ambientais. Este processo pode ser entendido como uma segunda fase do processo de absorção dos metais por microrganismos vivos, decorrendo, dessa forma, de um mecanismo celular ativo, que ocorre numa primeira fase, com gasto de energia (ATP). Assim esse processo difere na sua essência da adsorção físico-química passiva. A bioacumulação requer geralmente sistemas específicos de transporte e dependerá do grau de tolerância da célula ao metal (Donmez e Aksu, 2001; Malik, 2004).

A biossorção é um fenômeno que ocorre em microrganismos vivos e mortos, a bioacumulação é apenas mediada por microrganismos vivos. Sendo assim, a bioacumulação é um processo dependente do crescimento, em contraste com a biossorção que é crescimento independente (Gupta *et al.*, 2000). Em adição, células vivas podem interagir de diversas formas com metais, tanto por mecanismos passivos, utilizados por células mortas, quanto por mecanismos que requerem atividade metabólica (Gomes *et al.*, 1998).

A principal desvantagem da biossorção está relacionada à saturação da biomassa, ou seja, quando os sítios ativos estão ocupados é necessário proceder-se à dessorção do metal ou substituir a biomassa por biomassa nova (Ahluwalia e Goyal, 2007). Neste sentido o processo de bioacumulação apresentam algumas vantagens em relação à biossorção, uma vez que as células em crescimento são capazes de remover metais continuamente através de mecanismos internos de desintoxicação como também

podem ser potencializadas através da manipulação genética (Malik, 2004; Godlewska-Zylkiewicz, 2006).

Diversos estudos revelaram grande potencial de remoção de cobre por comunidades bacterianas especificamente *Pseudomonas cepacia* (Savvaidis *et al.*, 2004), *Enterobacter* sp (Lu *et al.*, 2006), *Amycolatopsis* sp (Albarracín *et al.*, 2008), *Bacillus cereus* (Chatterjee e Lalitagauri, 2008) e *Citrobacter freundii* (Sharma e Fulekar, 2009). Entre os sistemas biológicos utilizados, as bactérias são de grande interesse biotecnológico, fazendo destes organismos importantes agentes na remediação de efluentes contaminados com metais. Entretanto é válido ressaltar que o percentual de remoção varia em função da espécie do organismo envolvido, da forma e da quantidade do contaminante disponível.

3.2.3 *Enterococcus faecalis*

Em 1899 Thiercelin atribuiu o nome “entérocoque” de modo a enfatizar a origem intestinal de diplococos Gram-positivos por ele descobertos (Kohler, 2007; Murray, 1990). No entanto, no início do século XX, o termo *Streptococcus* era utilizado para designar estas bactérias. Em 1937, Sherman desenvolveu um novo esquema de classificação do gênero *Streptococcus*, dividindo-os em quatro classes: piogênicos, viridans, lácteos e enterococos, sendo este último majoritariamente de origem fecal (Foulquie Moreno *et al.*, 2006; Facklam *et al.*, 2002) Entretanto com o aparecimento de técnicas moleculares foi possível distinguir os enterococos dos estreptococos, o que culminou na aceitação do gênero *Enterococcus* em 1984 (Foulquie Moreno *et al.*, 2006; Kohler, 2007; Ogier e Serror, 2007).

O gênero *Enterococcus* pertence à família Enterococcaceae e consiste em bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, que apresentam uma forma ovóide, podendo aparecer como pequenas cadeias, aos pares ou como células únicas (Facklam *et al.*, 2002; Murray, 1990). Os enterococos são capazes de crescer entre 10°C e 45 °C, até 6.5% de NaCl (sendo este um dos melhores parâmetros para a sua identificação). São também capazes de resistir a 60°C durante 30 minutos (Chavers *et al.*, 2003; Ogier e Serror, 2007). Os enterococos são organismos fermentativos restritos devido á inexistência de ciclo de Krebs (Huycke *et al.*, 1998). Quase todas as estirpes são

homofermentativas, sem que haja produção de gás. A fermentação da glucose resulta na produção de ácido L-lático (Devriese *et al.*, 1991).

Os enterococos são quimioorganotróficos, e o seu complexo nutricional requer um meio contendo peptona ou produtos semelhantes (Devriese *et al.*, 1991). Algumas espécies são pigmentadas, como é o caso do *E. mundtii* e do *E. casseliflavus*; outras apresentam mobilidade, como o *E. casseliflavus* e o *E. gallinarum*. Estes organismos são catalase negativos. Outra das características que os distingue é a capacidade de hidrolisarem compostos como a esculina na presença de 40% de sais biliares com exceção de algumas espécies (Foulquie Moreno *et al.*, 2006; Murray, 1990).

Estas bactérias fazem parte da microflora intestinal humana, mas também foram descritos como fazendo parte da vagina e da cavidade bucal como comensais (Paradella *et al.*, 2007). Também se encontram na microflora de outros animais, nos solo e água, estes últimos provavelmente como resultado de contaminação por fontes fecais e devido à sua tolerância natural a condições adversas (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, G. 2002). Algumas estirpes têm uma ação benéfica, sendo até considerados indispensáveis na indústria queijeira, como culturas de arranque (Foulquie Moreno *et al.*, 2006). A espécie *E. durans* é frequentemente encontrado em leite e queijos, dos quais também são isolados *E. hirae* e *E. casseliflavus/E. flavescens* (Ogier e Serror, 2007).

Segundo Camargo *et al.* (2008), algumas espécies são consideradas importantes patógenos. As espécies, como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, podem originar doenças infecciosas. Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium* (Paradella *et al.*, 2007). No entanto, já foram descritos casos pontuais de infecções causadas por *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. raffinosus* (Ogier e Serror, 2007). Embora a maioria das infecções seja causada por *E. faecalis* tem-se observado um crescente aumento de infecções causadas por *E. faecium*, espécie à qual está associado um maior número de resistência a antibióticos (Alekhshun e Levy, 2006).

Segundo Bohle *et al.* (2010), *Enterococcus faecalis* pode causar doenças como infecções do trato urinário e endocardite infecciosa em pacientes imunocomprometidos. Esta bactéria é reconhecida como patógeno oportunista notório, que muitas vezes adquire resistência a antibiótico e potencial fatores de virulência (Aakra *et al.*, 2010).

Esta bactéria é capaz de sobreviver em pH na faixa de 2 a 10 (Evans *et al.*, 2002), podem sobreviver em ambientes hipotônicos, hipertônicos, ácidos, alcalinos, em

ambientes com falta de nutrientes, além de possuírem mecanismos de aderência nas células do hospedeiro (Love, 2001; Figdor *et al.*, 2003). Além disto, o *E. faecalis* tem a capacidade de expressar proteínas que dão à capacidade de adaptação e sobrevivência em diferentes condições ambientais, tais como as proteínas de superfície, fatores de aderência e substância de agregação que facilitam a adesão (Sedgley *et al.*, 2005).

E. faecalis é considerado como um modelo interessante para estudar as respostas ao estresse bacteriano sendo capaz de crescer e colonizar vários ambientes hostis, incluindo o trato gastrointestinal (Bohle *et al.*, 2010; Rince *et al.*, 2003). No trato gastrointestinal humano, a bile atua como um detergente biológico, emulsificante e solubilizante gorduras. O fígado secreta diariamente cerca de um litro de bile, que consiste principalmente de ácidos biliares, colesterol, fosfolipídios, e do pigmento biliverdina (Bohle *et al.*, 2010; Begley *et al.*, 2005). A exposição à bile pode levar a mudanças na composição dos ácidos graxos e fosfolipídeos das membranas e à distorção da superfície da célula bacteriana (Taranto *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2007). Também foi mostrado que a bile pode induzir danos no DNA. A fim de sobreviver no trato gastrointestinal humano, a bactéria deve superar diversos estresses ambientais adversos, tais como baixo pH, baixos níveis de oxigênio, limitações de nutrientes, osmolaridade elevada e as ações deletérias de biliar (Bohle *et al.*, 2010; Begley *et al.*, 2005).

Organismos com potencial e aplicabilidade em biotecnologia ambiental apresentam capacidade de sobreviver em condições adversas, um exemplo, são as bactérias que sobrevivem em ambientes contaminados com petróleo e são capazes de degradar este poluente (Pinto *et al.*, 2002). Ao considerar a grande versatilidade genética de *Enterococcus faecalis* em relação à adaptação e resistência a variações das condições ambientais esta bactéria apresenta características em potencial para pesquisas em biorremediação.

3.2.4 *Salmonella enterica* sorotipo (ou sorovar) Enteritidis

O gênero *Salmonella* faz parte da família *Enterobacteriaceae*. São bactérias aeróbias, mas podem também facultativamente, sobreviver em condições de anaerobiose. São bacilos curtos de 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, Gram-negativos, não formadores de esporos. Em sua grande maioria são móveis com flagelos peritríquios, embora alguns

sorotipos, como *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* sejam imóveis. A temperatura de crescimento está entre 5 e 45 °C, sendo ideal a 37°C, e o pH entre 4 e 9, sendo ideal em torno de 7 (Gast, 2003; Forshell e Wierup, 2006).

As salmonelas, em geral, possuem habilidade para metabolizar nutrientes, catabolizando D-glicose ou outros carboidratos, com exceção de lactose e sacarose, com produção de ácido e gás. São catalase positiva e oxidase negativa como todos os membros da sua família. Não fermentam malonato, não hidrolisam a uréia, não produzem indol; utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito e podem produzir ácido sulfídrico (Jones *et al.*, 2000)

Conforme o esquema de Kauffman-White as salmonelas são classificadas de acordo com seus sorotipos (Berchieri Júnior, 2000; Sharr, 2003). Para a caracterização dos sorovares são utilizados antissoros que reagem com antígenos presentes na célula bacteriana. Há três diferentes tipos de antígenos que podem identificar os sorovares de *Salmonella* spp. : antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) e o antígeno capsular de virulência (Vi) (Selander *et al.*, 1996).

De acordo com Grimont e Weill (2007), há um total de 2.579 sorovares isolados de *Salmonella* spp. Desses, 22 pertencem à espécie *S. bongori* e a maior parte, à espécie *S. enterica* subsp. *enterica* com 1.531 espécimes. Segundo Gast (2007), cerca de 10% do total de sorovares, já foram isolados de aves. Uma terceira espécie denominada de *S. subterrânea* foi descrita por Shelobolina *et al.* (2004), mas, segundo Grimont e Weill (2007), esta não pertence ao gênero *Salmonella*.

A espécie *Salmonella enterica* foi subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*; *S. enterica* subsp. *salamae*; *S. enterica* subsp. *arizonae*; *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (Grimont *et al.*, 2000; Forshell e Wierup, 2006). Assim, a designação de *Salmonella* “*typhimurium*” passaria a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo (ou sorovar) Typhimurium, ou de forma simplificada *Salmonella* Typhimurium (Popoff *et al.*, 1996).

As salmonelas são enterobactérias que podem estar presentes em diversas espécies animais como os mamíferos, os répteis e as aves (Borsoi *et al.*, 2010). A principal via de transmissão é fecal-oral, por intermédio do contato direto ou indireto com animais infectados ou pela ingestão de alimentos e água contaminados, estando dispersas amplamente em locais onde há presença de animais e dejetos podendo sobreviver longos tempos em solo úmido, água, fezes, alimentos e superfícies com

matéria orgânica (Acha e Szyfres, 2003; Mermin *et al.*, 2004; Carvalho, 2006; Davies, 2004; Nunes *et al.*, 2010).

As salmonelas ocupam lugar de destaque no campo da saúde pública, como um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos, sendo incriminada como causa de infecções alimentares decorrentes do consumo de carne e leite e seus derivados (Perdocini *et al.*, 2011). Os sorotipos *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Typhimurium são os mais frequentemente isolados em bovinos, sendo *Salmonella* Dublin o sorotipo adaptado à espécie bovina e um dos principais agentes etiológicos de diarreia em bezerros (Silva *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2002). A *Salmonella* Enteritidis é um dos principais sorovares isolados de aves (Fernandes *et al.*, 2006).

Segundo Berchieri Júnior (2000), cerca de 80 a 90 sorotipos de *Salmonella* são mais comuns em casos de infecção dos seres humanos e dos animais. *Salmonella* Enteritidis em aves e mamíferos é caracterizada por uma gastroenterite, que a depender da susceptibilidade do organismo infectado pode resultar em uma infecção sistêmica (Berchieri Júnior e Barrow, 1995; Van Immerseel *et al.*, 2005). Considerando os possíveis meios de transmissão de *Salmonella* sp para os seres humanos é importante mencionar o consumo de alimentos contaminados, principalmente os produtos de origem avícola (Santos *et al.*, 2000 ; Nadvorny *et al.*, 2004).

Salmonella Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Javiana foram os sorotipos mais isolados de seres humanos nos Estados Unidos, em 2005 (CDC, 2007). Em humanos, a maioria das salmoneloses manifesta-se clinicamente como uma síndrome gastrointestinal, com período de incubação de seis a 72 horas, seguida de febre, dor abdominal, náuseas, diarreia e vômito, acompanhada de dores de cabeça. Entretanto, geralmente, apresenta um curso benigno, e a recuperação clínica ocorre em poucos dias (Acha e Szyfres, 2003; Nunes *et al.*, 2010).

A utilização de células vivas na remoção de metais possui a vantagem de maiores quantidades de metal serem acumuladas pelas células em crescimento. Os metais no interior das células podem ser incorporados em vias bioquímicas, ou presos em uma forma inativa por complexação com outro ligante de alta afinidade.

O polifosfato presente no interior das células pode interagir com o metal e formar complexos metal-fosfato (Vagabov *et al.*, 2008). Segundo Rashid *et al.* (2000), *Salmonella* ssp apresenta sequência conservada de genes que codifica a

polifosfatocinase sendo esta a enzima responsável pela síntese do polifosfato. Assim este gênero de bactérias apresenta potencial para estudos em processos de remoção de metais.

3.3 POLIFOSFATO E METAIS

Um grande número de organismos incluindo bactérias, fungos, plantas e animais estocam energia na forma de um polímero de fosfato, que pode conter de três a milhares de unidades repetidas de fosfato, o qual é denominado de polifosfato inorgânico (PoliPi) (Kulaev, 2000).

O Polifosfato (PoliPi) é um homopolímero de ortofosfatos unidos através de ligações fosfoanidrílicas, termodinamicamente equivalentes ao fosfato de alta energia do Tri-Fosfato de Adenosina (ATP), considerada de alta energia (Kulaev e Kulakovskaya, 2000; Hijikata et al., 2010). Segundo Kulaev *et al.* (2004) cada átomo de fósforo é ligado ao vizinho através de dois átomos de oxigênio, formando uma cadeia linear.

A ocorrência do polifosfato em um grande número de organismos sugere funções biológicas fundamentais à vida, dependente da sua quantidade, localização celular, tamanho da cadeia e fonte biológica (Kornberg *et al.*, 1999). Assim como nas bactérias, em eucariotos o PoliPi está localizado em todos os compartimentos celulares estudados (Kulaev e Kulakovskaya, 2000).

O metabolismo do PoliPi em microrganismos oscila muito em função das condições ambientais afetando muitas funções celulares (Rao *et al.*, 1998; Kuroda e Ohtake, 2000). Dentre as funções do polifosfato podem ser citadas: reserva de fosfato e energia, estoque e quelação de metais, formação de canais de membrana, participação no transporte de fosfato, envolvimento na função e formação do envelope celular, controle da atividade gênica, regulação da atividade enzimática e uma função vital em respostas celulares ao estress ambiental e na adaptação a fase estacionária de crescimento (Kornberg *et al.*, 1999; Kulaev e Kulakovskaya, 2000; Vagabov *et al.*, 2008).

O acúmulo de polifosfato pelos microrganismos, e que podem ser induzidos por fatores ambientais, têm várias implicações biotecnológicas. Os organismos com habilidade de acumular polifosfato podem ser utilizados na biorremediação de efluentes

contaminados com metais pesados. Vários estudos demonstraram a associação de grânulos de polifosfato com cátions e metais pesados. Em adição, a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência ou tolerância de alguns microrganismos a metais pesados reforça o seu potencial biotecnológico na remoção destes elementos (Keasling *et al.*, 2000; Kulaev, 2000).

Estudos mostraram que uma mutação no gene que codifica a polifosfatocinase (ppK), enzima responsável pela síntese do polifosfato, influencia a motilidade de bactérias patogênicas. Tendo em vista que a motilidade é essencial para a invasão e o estabelecimento da infecção em um hospedeiro, tal resultado sugere uma relação entre polifosfato e patogenicidade bacteriana. A lista de microrganismos patógenos que apresentam a seqüência conservada é ampla, destacando-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros (Rashid *et al.*, 2000).

Os grânulos contendo polifosfato (grânulos de volutina ou metacromáticos) foram identificados no início do século XX, com a aplicação da microscopia óptica. A partir de então, o polifosfato tem sido estudado com o emprego de diversas técnicas, como por exemplo, microanálise por Raios X, ressonância nuclear magnética, métodos diferenciados de extração bioquímica e cromatografia (Greenfield *et al.*, 1987; Ohtomo *et al.*, 2004). A partir destes estudos a composição química dos grânulos de polifosfato foi determinada, evidenciando além da presença de fósforo, a de muitos metais tais como: Na, K, Ca, Mg, Zn, Ba e Al. Tais análises suscitaram a dedução de que o polifosfato pode estar envolvido na quelação de metais (Wood e Clarck, 1988).

A habilidade de síntese e degradação do PoliPi é mais importante para tolerância aos metais pesados do que apenas a capacidade de acumular grande quantidade de polifosfato intracelular como sustentam alguns estudos (Keasling *et al.*, 1998). Um mecanismo acerca da participação do PoliPi no processo de detoxificação de metais pesados foi proposto por Keasling (1997), onde o polifosfato presente na membrana celular seqüestraria o íon metálico e o transportaria para dentro da célula. Por outro lado, a entrada do metal pesado na célula estimula a atividade de exopolifosfatases, as quais liberam Pi a partir do PoliPi formando um complexo metal-fosfato que é uma molécula inerte podendo permanecer dentro ou ser transportada para fora da célula. Estudos com diferentes microrganismos têm corroborado esta hipótese (Alvarez e Jerez, 2004; Remonsellez *et al.*, 2006).

Considerando as habilidades das bactérias de remover metais e as características em potencial apresentadas por *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, tornou-se fundamental um estudo com o objetivo de investigar o potencial biotecnológico destas cepas bacterianas na remoção de cobre, bem como o desenvolvimento de estratégias que explorem tais habilidades.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO E PREPARO DE SOLUÇÕES

4.1.1 Local de execução do estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS/UFGD) e no Laboratório de Espectrometria e Cromatografia Aplicada da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET/UFGD).

4.1.2 Solução metálica

Todos os materiais utilizados no trabalho foram descontaminados em banho de HNO₃ 10% (v/v) por no mínimo 24 h, lavados com água destilada e com água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação de água Millipore 5, Direct –Q™.

Para todos os experimentos, reagentes de grau analítico e água ultrapura foram empregados para o preparo de soluções.

A solução de cloreto de cobre utilizada neste trabalho foi preparada com água deionizada nas concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹.

4.2 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Microrganismo e Condições de cultivo

Enterococcus faecalis ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 foram gentilmente cedidas pelo Serviço Nacional de Aprendizagem (SENAI) e Fundação André Tosello (FAT), respectivamente. As cepas foram mantidas em caldo nutriente acrescido de 15 % de glicerol -60 °C. O caldo nutritivo Brain Heart Infusion (BHI) foi utilizado para crescimento e multiplicação das células bacterianas a temperatura de 35°C durante 24 horas.

Uma quantidade padronizada de 1,0 mL com concentração de 10⁹ células de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar

Enteritidis CCT 4475, foram transferidas para tubos corning de 15 mL de capacidade, contendo 7 mL do caldo de cultura (BHI) acrescido de 1,0 mL de solução de cloreto de cobre nas concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹. Culturas controle foram crescidas no meio original sem a presença de cobre. Os frascos foram incubados durante 48 horas a temperatura de 35°C. Todos os experimentos foram realizados usando três réplicas.

4.2.2 Determinação da curva de crescimento

As amostras coletadas nos intervalos de 2, 6, 12, 24 e 48 horas de cultivo foram centrifugadas a 2.000 rpm (Centrifuga Excelsa, modelo 206 BL/FANEM), durante 10 minutos. O precipitado de células foi mantido em estufa a temperatura de 40°C por um período de 24 horas.

Os tubos foram pesados em balança semi-analítica antes e após o cultivo. A diferença entre os tubos correspondeu à biomassa seca.

A média do peso seco em triplicata foi utilizada para estabelecer o gráfico correspondente à curva de crescimento.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação do fósforo

Para determinar o consumo de fósforo do meio, alíquotas de sobrenadante de cultura foram coletadas nos intervalos de 2, 6, 12, 24 e 48 horas de cultivo.

O consumo de fosfato do meio de cultura foi determinado pelo método colorimétrico que se baseia na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, resultando em um complexo fosfomolibdato de cor azul, quantificado espectrofotometricamente, e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do fósforo (ABNT, 1992).

Uma curva padrão em cinco pontos foi construída, utilizando-se uma solução de fosfato (25,0 - 125,0 µg L⁻¹). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, UV-vis, modelo Cary 50-VARIAN. O valor final correspondeu à média aritmética de três réplicas.

4.3.2 Determinação do pH

As variações de pH dos meios de cultura foram acompanhadas ao longo do crescimento. O valor do pH em cada ponto do intervalo correspondeu à média de três repetições. Posteriormente, uma curva de pH foi estabelecida com esses valores.

4.3.3 Cinética de remoção do cobre

Para avaliar a remoção de cobre amostras de sobrenadante de cultura foram coletadas em intervalos de 2, 6, 12, 24 e 48 horas de cultivo. A concentração do metal foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), modelo AA240Z-VARIAN. Equipado com automostrador PSD120-VARIAN.

Uma curva padrão em cinco pontos foi produzida utilizando solução de cloreto de cobre (20,0 – 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os valores médios foram usados na análise.

Os valores das concentrações finais do metal nas soluções foram subtraídos das concentrações iniciais para o cálculo dos índices de eficiência de remoção (adaptado de Volesky e May-Phillips 1995; Souza *et al.*, 2008) e R% (remoção percentual) segundo as equações:

$$q = C_i - C_f / B \quad (1)$$

$$R\% = [(C_i - C_f) 100] / C_i \quad (2)$$

Onde q é a quantidade de metal removido por biomassa (mg g^{-1}), C_i é a concentração inicial de metal em solução (mg L^{-1}), C_f é a concentração final de metal em solução (mg L^{-1}), e B é a quantidade de biomassa (g L^{-1}).

4.3.4 Acumulação de cobre

A biomassa coletada com 6, 24 e 48 horas de incubação na presença de cobre em diferentes concentrações foi lavada três vezes com ácido tetracético etilenodiamina (EDTA) na concentração de 0.05 M, durante 5 minutos. Após este período, a biomassa foi digerida em ácido nítrico (65%) durante 24 h. Em seguida, o material digerido foi

analisado para determinação de cobre por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Estes experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios foram usados.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tratamentos estudados com relação a espécies, concentração de cobre e tempo, bem como os valores de crescimento, consumo de fósforo, pH, R% e acúmulo intracelular de cobre foram submetidos a análise de variância em fatorial (3x3x5). Os dados foram analisados no Programa SAEG, utilizando o teste de Tukey para comparação de médias obtidas.

4.5 TRATAMENTOS DE RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos contendo metais foram tratados, dentro da capela, elevando-se o pH da solução pela adição de hidróxido de sódio comercial, favorecendo a precipitação dos mesmos em solução alcalina (pH = 11). Estes foram armazenados em galões plásticos devidamente identificados por etiquetas para posteriormente serem aterrados em local especialmente construído para resíduos industriais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do perfil de crescimento

Em microrganismos o cobre atua como elemento traço em diversas reações bioquímicas. A função mais importante deste metal reside em seu efeito sobre a citocromo oxidase e enzimas relacionadas, essenciais ao processo respiratório. Contudo, em altas concentrações os íons de metais pesados podem formar complexos inespecíficos nas células, os quais são extremamente tóxicos (Nies, 1999). Segundo Lindino *et al.* (2008), os metais interferem com muitos processos fisiológicos dependendo de sua concentração, frequência de exposição e suscetibilidade do organismo exposto.

Os metais podem interferir com processos microbianos importantes e os efeitos tóxicos incluem o deslocamento de íons e / ou substituição de íons essenciais a célula e bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, por exemplo, enzimas e sistemas de transporte de nutrientes essenciais. Isto provoca desnaturação e inativação de enzimas, bem como rompimento da membrana celular (Sani *et al.*, 2001). Estes efeitos resultam, principalmente, na diminuição das taxas de crescimento e/ou inibição total, assim como morte celular (Stohs e Onions, 1995; Wang *et al.*, 1997; Gikas *et al.*, 2009). Entretanto a exposição dos microrganismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância/resistência pela comunidade microbiana exibindo a habilidade de crescer em altas concentrações de metal tóxico o que pode ser resultado de mecanismos intrínsecos ou induzidos, bem como, de fatores ambientais que podem reduzir a toxicidade do metal (Gadd, 1993; Gomes *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2003).

Os termos resistência e tolerância frequentemente são usados como sinônimos. Gadd (1992) definiu resistência como a habilidade de sobreviver a metais tóxicos por mecanismos de detoxificação produzidos em resposta direta ao metal. A tolerância, por outro lado, seria a habilidade de sobreviver à toxicidade de metais por meio de propriedades intrínsecas do organismo.

Os resultados apresentados nas figuras 1, 2 e 3 demonstraram que as distintas concentrações de cobre limitaram circunstancialmente o crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

CCT 4475 durante o período de cultivo. A curva de crescimento controle exibiu fase exponencial até 12 horas e estacionária de 24 a 48 horas de incubação. Por outro lado, as culturas submetidas ao tratamento com cobre não apresentaram as fases típicas de crescimento, mas sim um crescimento ascendente, contínuo e linear durante todo o tempo de cultivo.

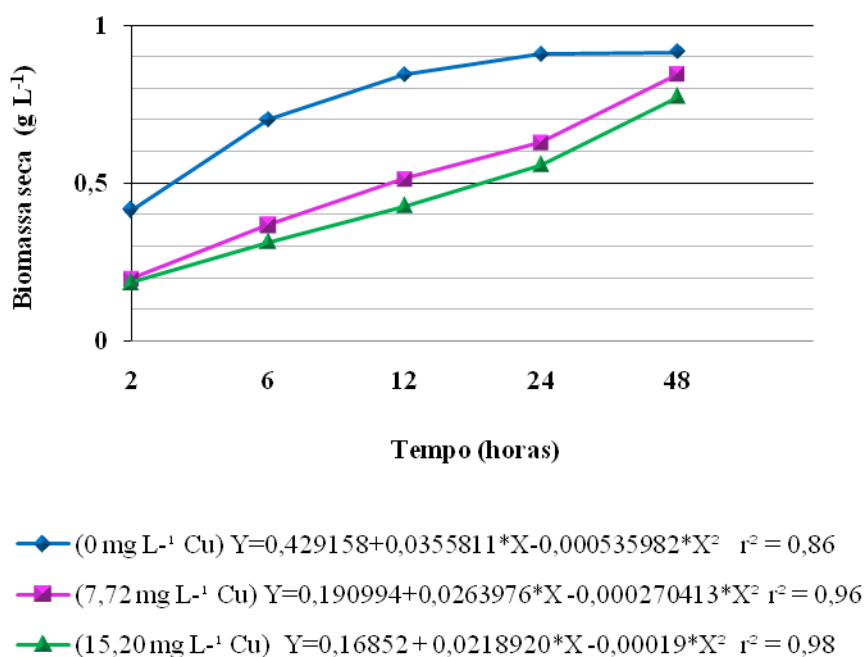


Figura 1. Curva de crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 em diferentes períodos de cultivo na presença e ausência de cobre.

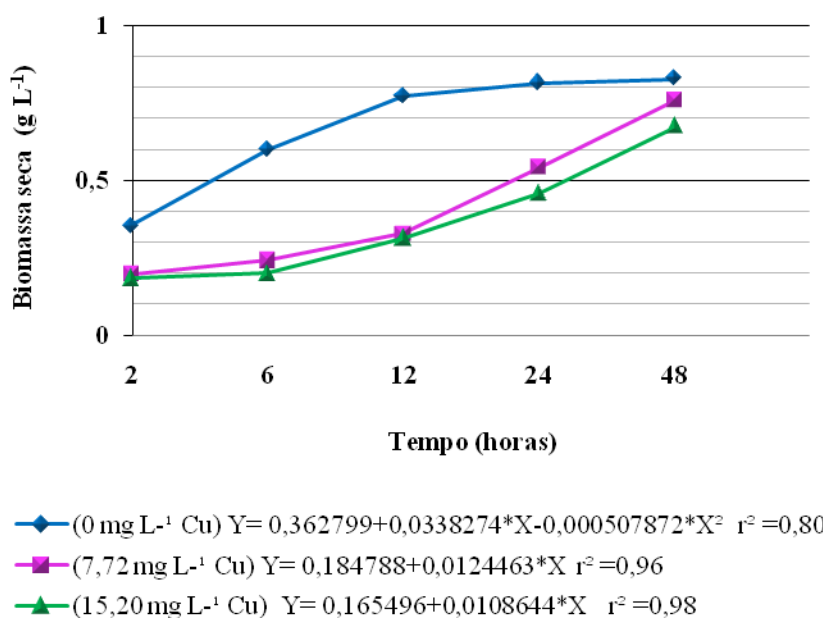


Figura 2. Curva de crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo na presença e ausência de cobre.

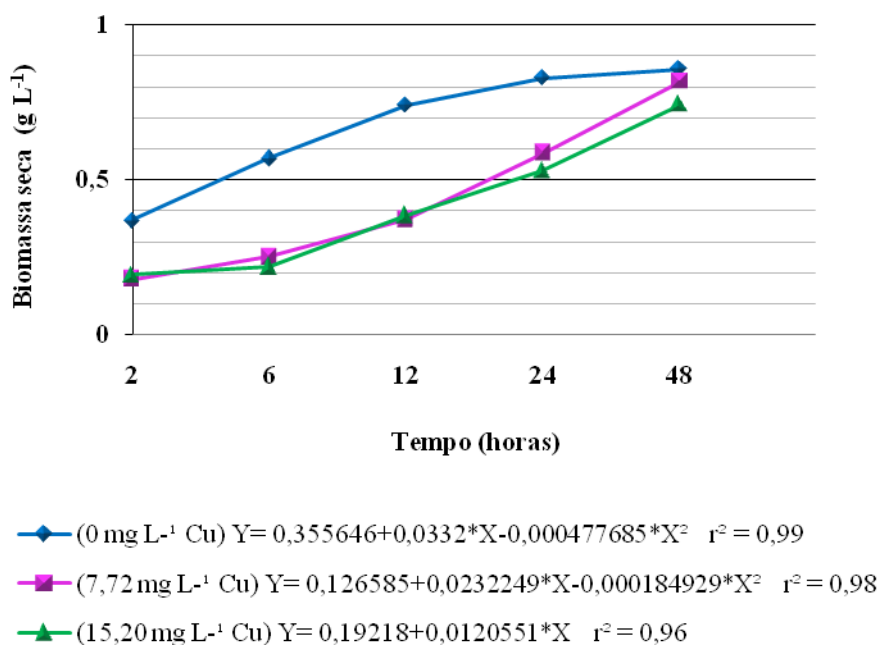


Figura 3. Curva de crescimento da interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo na presença e ausência de cobre.

Enterococcus faecalis ATCC 51299 produziu ao final de 48 horas de cultivo 0,842 g L⁻¹ e 0,771 g L⁻¹ de biomassa, nas concentrações de cobre de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹, respectivamente contra 0,914 g L⁻¹ do grupo controle (Figura 1).

A curva de crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou valores de biomassa de 0,828 g L⁻¹; 0,757 g L⁻¹ e 0,671 g L⁻¹ nas concentrações de cobre de 0 mg L⁻¹, 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹, respectivamente, ao final de 48 horas de cultivo (Figura 2).

A produção final de biomassa para o interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) foi de 0,857 g L⁻¹ para amostras controle, 0,814 g L⁻¹ e 0,742 g L⁻¹, respectivamente para as concentrações 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre (Figura 3).

A comparação das culturas cultivadas nas diferentes concentrações do metal revela o efeito inibidor deste. Pode-se observar que houve uma diminuição na taxa de crescimento proporcional à concentração inicial do metal, quando a bactéria é cultivada na presença de cobre.

Enterococcus faecalis ATCC 51299 no período de 6 horas e 48 horas de cultivo apresentou um percentual de crescimento de 47% e 55,14%; 7,87% e 15,64%, respectivamente, inferior ao peso da biomassa verificado nas amostras cultivadas na ausência do metal para as concentrações 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente (Figura 1).

Já para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 no período de 6 horas e 48 horas de cultivo o percentual de crescimento foi de 59,5% e 66,66%; 8,52% e 18,96%, respectivamente, inferior ao peso da biomassa verificado nas amostras controle para as concentrações de cobre 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 2).

A interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) revelou um crescimento de biomassa intermediário aos valores apresentados entre ambas as cepas bacterianas (Figura 3).

Ambas as cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 no final do período de cultivo apresentaram valores de biomassa próximos aos valores encontrados nas amostras cultivados na ausência do metal demonstrando habilidade em sobreviver a estas concentrações de cobre.

A análise de variância para crescimento evidenciou diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância ao final do período de cultivo, para os fatores espécies e

concentrações de cobre (Tabela 1). Para esses fatores foram aplicados o Teste Tukey, cujos valores são apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 1. Análise de variância para o crescimento das espécies avaliadas em função da concentração de cobre.

Crescimento	GL	QM	F	SIG
Espécie	2	0,1851433	35,013	0,00000
Concentração	2	0,4321033	81,717	0,00000
Espécie * Concentração	4	0,3993333	0,755	*****
Resíduo	18	0,5287778		
Coeficiente de variação = 2,876				

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 2. Crescimento das espécies nas diferentes concentrações de cobre.

Espécie	Médias (g L ⁻¹)	Comparações
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	0,842	A
Interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	0,804	B
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	0,752	C

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 3. Crescimento da biomassa em função das concentrações de cobre.

Concentração de cobre	Médias (g L ⁻¹)	Comparações
0 mg L ⁻¹ Cu	0,866	A
7,72 mg L ⁻¹ Cu	0,804	B
15,20 mg L ⁻¹ Cu	0,728	C

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados apresentados na tabela 2 demonstraram maior crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 frente à presença de diferentes concentrações de cobre quando comparado a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e

interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 avaliadas nas mesmas condições de cultivo. A redução mais drástica no crescimento ocorreu na concentração de 15,20 mg L⁻¹ de cobre, porém não foi inibitória, sendo que as cepas foram capazes de resistir ao cobre até esta concentração, o que sugere o desenvolvimento de adaptação fisiológica ao metal (Tabela 3).

Pesquisas na literatura revelam potencial de tolerância/resistência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em diferentes concentrações de metais. Sharma e Fulekar (2009), verificaram que a cepa Gram-negativa *Citrobacter freundii* possui capacidade de crescimento em diferentes concentrações de cobre sendo capaz de crescer até a concentração de 800 mg L⁻¹.

As bactérias Gram-negativa *Pseudomonas* sp e Gram-positiva *Bacillus* sp, isoladas de rizoplano de trigo cresceram durante todo o período de cultivo em diferentes concentrações de cobre (14,29 mg L⁻¹; 28,59 mg L⁻¹ e 42,89 mg L⁻¹) (Voss e Thomas, 2001).

Kim *et al.* (2007), testando as habilidades de crescimento de *Bacillus* em presença de diferentes concentrações de metais verificaram que apenas um isolado foi capaz de crescer em 400 mg L⁻¹ de chumbo, cobre e zinco.

Pseudomonas putida CZ1 foi capaz de crescer continuamente durante todo o período de cultivo na presença de cobre e zinco, entretanto, exibiu valores de concentração inibitória mínima (cerca de 190 mg Cu L⁻¹ e 326 mg Cu L⁻¹) (Chen *et al.*, 2006).

A bactéria Gram-negativa *Sphingomonas paucimobilis* cultivada em presença de cádmio não apresentou todas as fases de crescimento, quando comparadas as amostras cultivadas na ausência do metal. Além disso, o cádmio foi inibitório uma vez que não se observou aumento de crescimento no meio com metal (Tangaromsuk *et al.*, 2002).

O cobre alterou o padrão de crescimento normal de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 de modo que não se observou as fases típicas de crescimento (figura 1 e 2). Entretanto não inibiu o crescimento das biomassas, atribuindo a estas cepas resistência/tolerância ao metal nas concentrações utilizadas.

Escherichia coli modificada geneticamente cresceu durante o período de cultivo em alta concentração do metal cobre (635,5 mg L⁻¹), demonstrando que microrganismos

com tolerância/resistência a presença de metal tóxico podem ser potencializadas através do desenvolvimento de espécies mais resistentes (Ueki *et al.*, 2003).

Pesquisas apontam grande relação entre componentes do meio, como fontes de carbono, nitrogênio e fósforo na acumulação de metais (Sing e Yu, 1998; Donmez e Aksu, 2001).

Em relação às curvas de consumo de fósforo (Figuras 4, 5 e 6), observou-se que a biomassa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 cultivada com cobre consumiu maiores quantidades de fósforo do que as células cultivadas na ausência do metal.

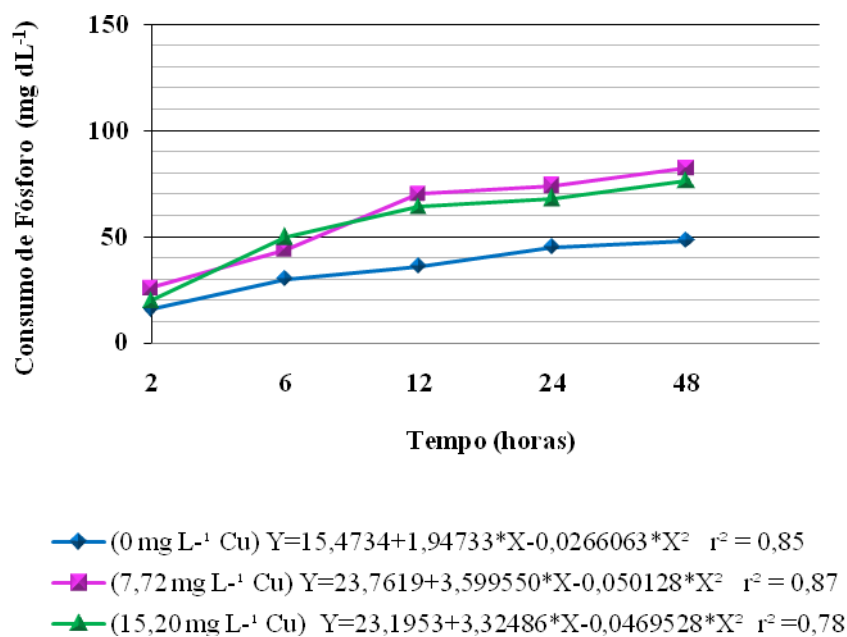


Figura 4. Consumo de fósforo inorgânico por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 na presença de diferentes concentrações de cobre.

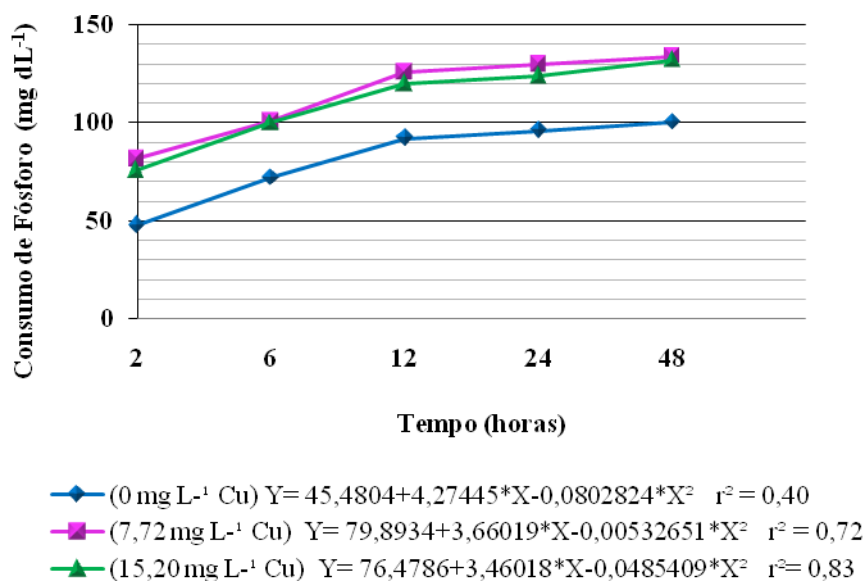


Figura 5. Consumo de fósforo inorgânico por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 na presença de diferentes concentrações de cobre.

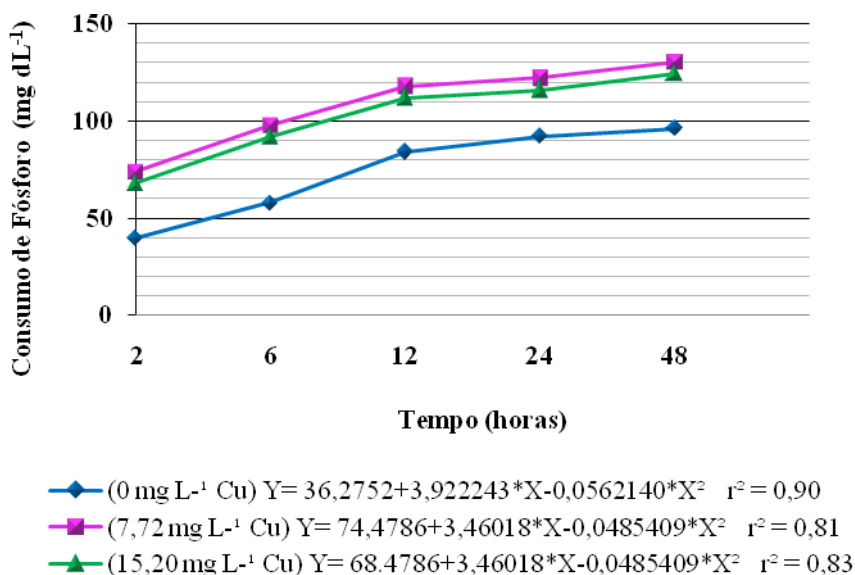


Figura 6. Consumo de fósforo inorgânico pela interação interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 na presença de diferentes concentrações de cobre.

Em 48 horas o consumo total de fósforo pelas culturas de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 cultivadas na ausência de cobre foi de 17,64%, ao passo que, o das culturas tratadas com cobre nas concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ foi de 30,14% e 27,94% , respectivamente (Figura 4).

Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 ao final do período de cultivo apresentou um consumo total de fósforo de 36,76%; 49,26% e 48,52% pelas culturas tratadas nas concentrações de 0 mg L⁻¹; 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente (Figura 5).

Ao final de 48 horas de cultivo a interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) exibiu para as culturas controle um consumo de fósforo de 35,29% e as culturas tratadas com cobre nas concentrações 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ consumiram 47,79% e 45,58% de fósforo, respectivamente (Figura 6).

Pode-se observar na figura 6 que a interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 tratada com 15,20 mg L⁻¹ de cobre, no período de 12 horas, exibiu consumo de fósforo 10,29% superior ao controle, mesmo com crescimento de 48,11% inferior as culturas controle. Neste sentido é evidente que o requerimento de fósforo pelas células cultivadas na presença de cobre foi maior do que a cultura do grupo controle. Nota-se também que os níveis de fósforo consumidos pelas células cultivadas com cobre excedem as necessidades fisiológicas normais.

O consumo de fósforo em 48 horas de cultivo apresentou diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância, para os fatores espécies e concentrações de cobre (Tabela 4, 5 e 6).

Tabela 4. Análise de variância para consumo de fósforo em relação à espécie e concentração de cobre.

Consumo de Fósforo	GL	QM	F	SIG
Espécie	2	6180,148	18,872	0,00004
Concentração	2	5538,815	16,913	0,00007
Espécie * Concentração	4	420,1481	1,283	0,31347
Resíduo	18	327,4815		
Coeficiente de variação = 18,327				

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 5. Consumo de fósforo pelas espécies nas diferentes concentrações de cobre.

Espécie	Médias (mg dL ⁻¹)	Comparações
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	116,66	A
Interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	110,88	A
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	68,66	B

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 6. Consumo de fósforo pela biomassa em função das concentrações de cobre.

Concentração de cobre	Médias (mg dL ⁻¹)	Comparações
7,72 mg L ⁻¹ Cu	115,33	A
15,20 mg L ⁻¹ Cu	110,66	A
0 mg L ⁻¹ Cu	70,22	B

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A biomassa de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentaram maiores consumo de fósforo em relação à *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (Tabela 5). Os resultados apresentados na tabela 6 apontam que o consumo de fósforo foi maior nas amostras cultivadas na presença do metal quando comparadas as amostras controle. Dessa forma, tais resultados sugerem que o fósforo está sendo usado para suportar o crescimento das biomassas na presença do metal.

Em microrganismos o íon fosfato (PO_4^{3-}) é fonte importante de fósforo para a célula. O fósforo é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e para os fosfolipídeos componentes da membrana celular. Este elemento também é encontrado como componentes das ligações ricas em ATP. Segundo Varela *et al.* (2010), os microrganismos, incluindo as bactérias, estocam fósforo principalmente na forma de um polímero denominado de polifosfato. Alguns estudos apontam a ação do polifosfato na complexação de metais, sendo este polímero um potencial candidato para processos de

remoção de metais em função de sua grande capacidade de quelação (Keasling e Hupf, 1996; Keasling *et al.*, 1999; Remonsellez *et al.*, 2006).

Segundo Kornberg *et al.* (1999), a capacidade de quelação de metais do ambiente se deve às propriedades polianiónicas do polifosfato. Sendo assim, a relação entre PoliPi e estoque/tolerância/detoxificação de metais pesados tem sido descrita nos últimos anos por muitos autores.

Aiking *et al.* (1984), demonstraram que *Klebsiella aerogenes* acumula fósforo durante crescimento na presença de cádmio. Tais autores consideram este acúmulo um mecanismo primário de detoxificação, uma vez que pode ocorrer à formação de fosfato de cádmio, sal pouco solúvel que pode precipitar diminuindo assim a toxicidade do metal.

O polifosfato de superfície de *Acinetobacter lwoffii* é degradado quando esta bactéria é cultivada na presença de cádmio (Suresh *et al.*, 1986). Em *Staphylococcus aureus*, o PoliPi está envolvido na remoção de níquel (Gonzalez e Jensen, 1998). Adicionalmente, Pan-Hou e colaboradores (2002) indicam que o polifosfato está envolvido na resistência ao metal mercúrio.

Nishikawa *et al.* (2003), demonstraram que *Chlamydomonas acidophila* apresentou depósitos eletrondensos no interior de vacúolos, constituído de cádmio e fosfato, quando em crescimento na presença deste metal.

Em *Acidithiobacillus ferrooxidans*, um microrganismo com alto nível de resistência a metais pesados, Alvarez e Jerez (2004) observaram que as células cultivadas na presença de cobre mostraram uma rápida diminuição nos níveis de polifosfato com um aumento concomitante na atividade de exopolifosfatase e uma estimulação de efluxo de fosfato.

Souza *et al.* (2005), verificaram que o consumo da fonte de fósforo por *Cunninghamella elegans* na cultura tratada com cobre foi maior que na cultura controle.

A relação entre a presença do polifosfato e o incremento da resistência aos metais pesados indicam fortemente o potencial de utilização de organismos, selvagens ou modificados geneticamente para o acúmulo de polifosfato no processo de remoção de metais em efluentes contaminados com tais elementos tóxicos (Keasling *et al.*, 2000).

Muitos microrganismos exibem a habilidade de crescer em altas concentrações de metal tóxico. Os fatores ambientais como o pH, o suprimento de nutrientes e

oxigênio, presença de outros íons metálico, agente quelantes e concentração celular influenciam na toxicidade dos metais (Valdman e Leite, 2000).

As bactérias possuem caráter aniônico em condições comuns de pH de solo e de água. As cargas negativas são originadas da ionização dos radicais carboxílicos, fosfáticos, hidroxílicos e sulfidrílicos encontrados nos polímeros da parede microbiana (Beveridge, 1989; Moreira e Siqueira, 2002).

As superfícies celulares são estruturas aniônicas devido à presença de grupos ionizáveis que apresentam capacidade de interagir e reter os cátions, entretanto a captação de metais pela superfície celular é influenciada pelo pH do meio. Pegoraro *et al.* (2006), ressaltam que o pH atua direta e indiretamente sobre a biodisponibilidade dos íons metálicos.

Uma análise da curva do pH permite observar que este decresceu durante todo o período experimental nas culturas controle, como também naquelas tratadas com o metal cobre (Figura 7, 8 e 9). O valor do pH apresentou decréscimo proporcional à concentração inicial do metal, uma vez que a solução metálica utilizada no presente estudo foi preparada a partir de uma solução padrão de cobre contendo ácido nítrico a 5%.

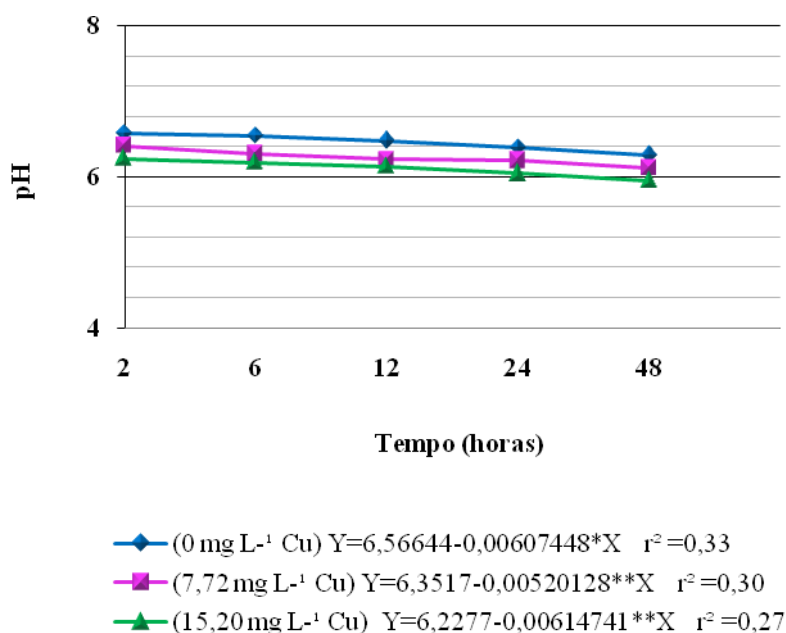


Figura 7. Valores de pH do meio de cultura durante o crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

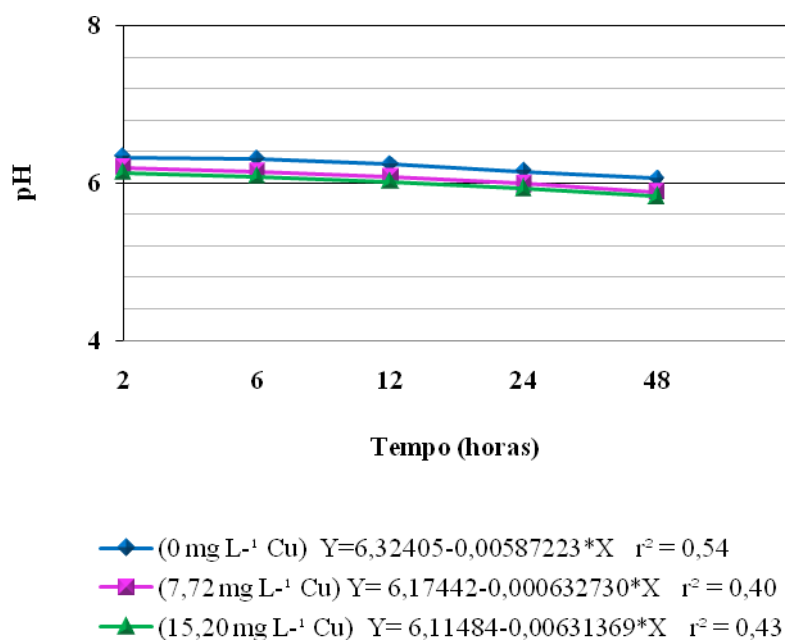


Figura 8. Valores de pH do meio de cultura durante o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

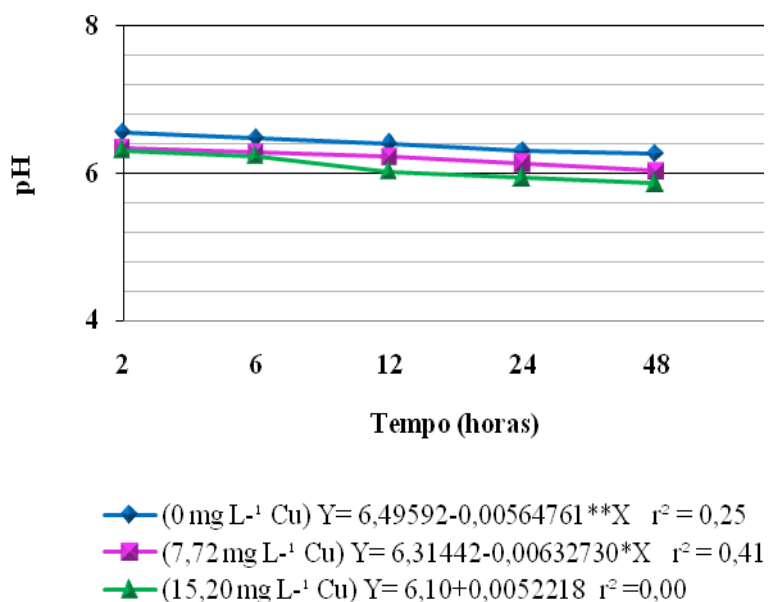


Figura 9. Valores de pH do meio de cultura durante o crescimento da interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

Enterococcus faecalis ATCC 51299 apresentou ao final do período de cultivo valores de pH 6,29 para as amostras controle e 6,12 e 5,95 respectivamente para as concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ (Figura 7).

Ao final do período de cultivo as culturas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentaram valores de pH 6,06; 5,89 e 5,83 respectivamente para as concentrações de 0 mg L⁻¹; 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ (Figura 8).

Em 48 horas de cultivo a biomassa da interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) apresentou valores de pH 6,26 para as amostras controle e 6,03 e 5,86 respectivamente para as concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ (Figura 9).

A troca iônica exerce papel dominante no processo de biossorção, sendo assim o pH é um dos principais fatores que influenciam no processo. O pH determina a protonação ou desprotonação dos íons metálicos em sítios de ligação (Chojnacka, 2010; Schiewer e Volesky, 2000). Geralmente, o aumento do pH causa desprotonação de íons metálicos dos sítios expostos por superfícies celulares. Já a diminuição do pH faz concorrência entre prótons e íons de metal carregados positivamente. A biossorção é um processo reversível, a redução do pH resultaria em desprotonação (Naja e Volesky, 2010).

Os mecanismos de remoção de íons metálicos através de biomassa e os fatores que afetam o seu desempenho são importantes para a otimização das condições de operação do biossorvente (Xu *et al.*, 2006). O pH influencia a magnitude da carga negativa na superfície do material, por protonação e desprotonação dos sítios de ligação de metais. Portanto, o pH influencia a disponibilidade dos íons em solução (Ofomaja e Ho, 2007).

Salmonella cresce em intervalo de pH 4,0 a 9,0, com crescimento ótimo na faixa de 7,0 (Gast, 2003; Forshell e Wierup, 2006). *Enterococcus faecalis* é capaz de sobreviver em pH na faixa de 2 a 10 (Evans *et al.*, 2002). Os menores valores de pH foram encontrados na maior concentração de cobre e apresentaram valores de 5,95 e 5,83 para *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 respectivamente (Figuras 7 e 8).

Voss e Thomas (2001) verificaram que alterando o pH de 5,0 para 3,0 diminuiu a quantidade de metal sorvido. Esse decréscimo foi de 55,05% para Cu²⁺ em *Pseudomonas* sp. No presente estudo as amostras cresceram de forma contínua em todo

o período de cultivo em pH próximo de 5,8. A biomassa nestas condições apresenta potencial para remoção de íons metálicos carregados positivamente.

A análise de variância demonstrou que não houve diferenças estatísticas significativas a 5% para o fator pH (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de variância do pH no cultivo de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes concentrações de cobre.

pH	GL	QM	F	SIG
Espécie	2	0,2699370	1,434	0,26433
Concentração	2	0,8133704	0,432	*****
Espécie * Concentração	4	0,1167037	0,620	*****
Resíduo	18	0,1882481		
Coeficiente de variação = 7,105				

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Várias pesquisas discutem o efeito do pH sobre o desempenho de remoção de íons metálicos por diversos tipos de biomassa. Volesky *et al.* (1999), estudaram a capacidade de bioissorção de cádmio por diferentes espécies de algas pertencentes ao gênero *Sargassum* e verificaram grande eficiência de remoção em valor de pH 4,5.

Dönmez e Aksu (1999), relataram bioacumulação de Cu(II) por várias cepas de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida* sp. Tais autores verificaram que a bioacumulação foi dependente da concentração inicial de Cu (II) e também do pH.

A bioissorção de cobre aumentou significativamente com o aumento de pH 2,0-6,0, independentemente da espécie de *Bacillus* (Lo *et al.*, 2003). A bioissorção de chumbo por *Spirulina maxima* foi dependente do pH da solução e a adsorção máxima foi obtida em uma solução de pH de aproximadamente 5,5 (Gong *et al.*, 2005).

Estudos dirigidos por Savvaidis *et al.* (2004), em diferentes valores de pH 3-8, demonstraram que a bioissorção de cobre por *Pseudomonas cepacia* foi maior em pH 7. A bioissorção de zinco em onze diferentes espécies de microalgas marinhas a diferentes valores de pH foi testada por Senthilkumar *et al.* (2006). Estes autores concluíram que a alga verde *Ulva reticulata*, exibe o maior valor de acumulação com 36,1 mg g⁻¹ a pH 5,5 e para uma concentração inicial de Zn (II) de 100 mg/l.

Luo *et al.* (2006), ao avaliar a bioissorção de chumbo pela alga castanha, *Laminaria japonica*, concluíram que a bioissorção do chumbo é fortemente condicionada pelo valor de pH e observaram que o valor de pH para o qual a remoção é máxima é de 5,3.

Lu *et al.* (2006), investigaram a cinética e equilíbrio de bioissorção de diferentes íons metálicos utilizando a biomassa de *Enterobacter* sp. J1. Tais autores verificaram que ajustando o pH para 3,0 levou à quase completa dessorção de cádmio. Já para cobre os melhores resultados de dessorção foi apresentado em valores de pH 2,0.

Para encontrar o pH ótimo para a remoção de íons Cu^{2+} pela bactéria *E. faecium* Yilmaz *et al.* (2010), realizaram experimentos em diferentes valores de pH inicial variando de 1,0 a 6,0. Estes autores concluíram que o processo de remoção dos íons Cu^{2+} é fortemente dependente do pH e os dois maiores valores de adsorção foram obtidos em pH 5 e 6, verificaram também que a eficiência de remoção de íons Cu^{2+} de *E. faecium* caiu drasticamente no $\text{pH} \leq 4$.

Mulgund *et al.* (2011), investigaram a capacidade de remoção de diferentes metais através da utilização de resíduos de carvão vegetal de eucalipto. Estes autores verificaram que este bioissorvente foi muito eficaz na remoção de chumbo, cobre e cádmio a partir de soluções aquosas. Ressaltaram que a bioissorção é dependente do pH, com máxima remoção de Pb^{2+} e Cu^{2+} em pH 7, enquanto que para Cd^{2+} o ideal foi pH 9 e a dessorção máxima em pH 1.

A eficiência de um processo de remoção de metais não depende apenas do bioissorvente utilizado, mas também do tipo de íon e sua concentração, temperatura, pH, e presença de outros íons. Estes parâmetros são extremamente relevantes para a eficácia de todo o processo. Neste sentido os fatores que influem na capacidade de um bioissorvente devem ser minuciosamente controlados.

5.2 Remoção de cobre

Os métodos convencionais utilizados na remoção de metais, tais como precipitação química, membrana de separação ou resina de troca iônica, podem ser muito caro e, às vezes, não muito eficazes. O tratamento à base de sistemas biológicos, oferece redução dos níveis de metais tóxicos aos limites ambientalmente aceitáveis a

custos relativamente baixos se comparado aos processos físico-químicos (Volesky, 2001; Kadukova' e Vircíková, 2005).

No processo de remoção de metais em efluentes os temos biossorção e bioacumulação são geralmente empregados. Biossorção e bioacumulação diferem em que, no primeiro processo os íons metálicos são ligados à superfície da parede celular assemelhando-se a adsorção convencional. A diferença reside na natureza do adsorvente que neste caso é o material de origem biológica (Biossorvente - biomassa morta). Biossorção é um processo metabolicamente passivo (Chojnacka, 2010).

No segundo processo a primeira fase é a biossorção e as fases subseqüentes estão relacionadas com o transporte dos íons para o interior da célula através da energia que consome os sistemas de transporte ativo (Biossorvente - biomassa viva). Assim, em bioacumulação mais sítios vinculativos ao poluente estão disponíveis (Chojnacka, 2010).

Nas figuras 10, 11 e 12 observa-se a evolução do percentual de remoção de cobre pela biomassa ativa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) em função do tempo.

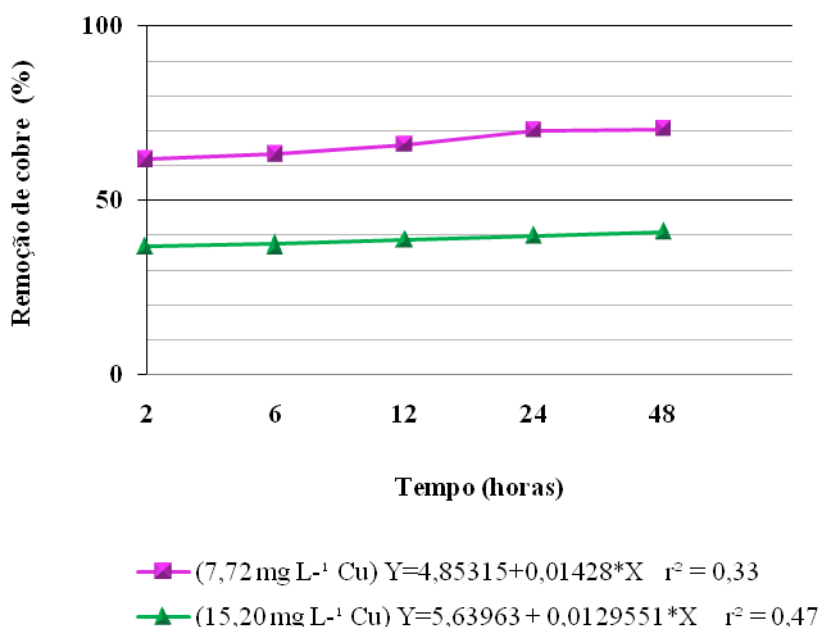


Figura 10. Percentual de remoção de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 em diferentes períodos de cultivo.

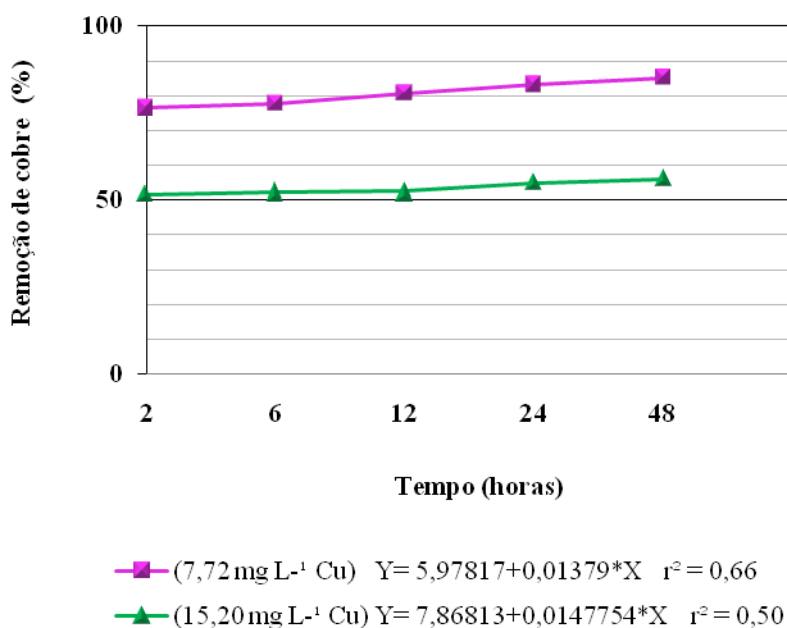


Figura 11. Percentual de remoção de cobre por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo.

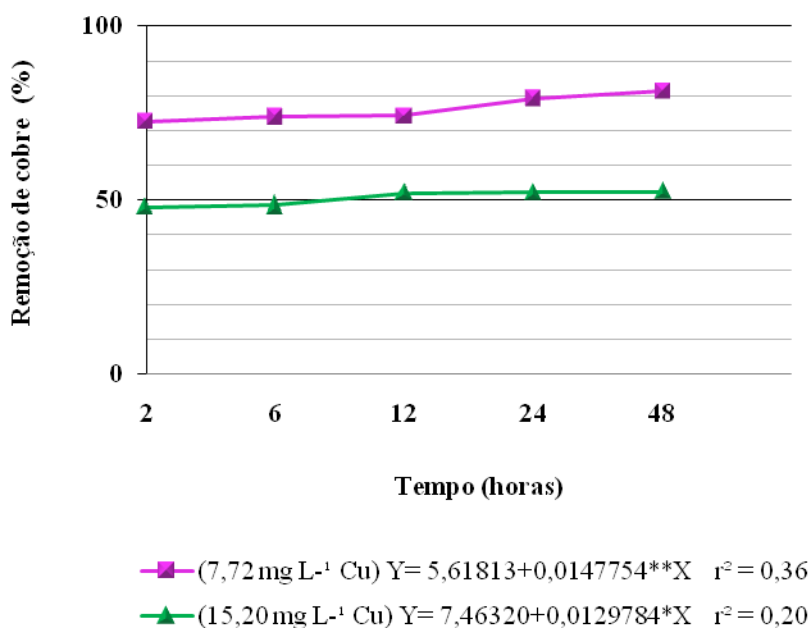


Figura 12. Percentual de remoção de cobre pela interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em diferentes períodos de cultivo.

A remoção de cobre foi dependente da concentração do metal, variando proporcionalmente com a concentração do cobre usado (Figuras 10, 11 e 12).

Enterococcus faecalis ATCC 51299 apresentou um percentual de remoção de cobre ao final do tempo experimental de 70,33% e 40,78% para as concentrações iniciais 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente (Figura 10).

O percentual de remoção de cobre por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em 48 horas de cultivo foi 85,10 % e 56,05% para as concentrações iniciais 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente (Figura 11).

Ao final do tempo experimental a interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou um percentual de remoção de cobre de 81,21 % e 52,36% para as concentrações iniciais 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente (Figura 12).

A mais alta remoção de cobre pela interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) foi de 81,21 % e ocorreu na menor concentração inicial do metal usado de 7,72 mg L⁻¹. Entretanto, o valor máximo da capacidade de remoção foi obtido com a concentração de 15,20 mg L⁻¹ de cobre, e correspondeu a 7,96 mg L⁻¹ de cobre em 48 horas (figura 12). Assim sendo, a taxa de remoção de cobre foi inversamente proporcional à concentração de metal inicial (Figuras 10, 11 e 12).

Ao nível de 5% de significância os fatores espécie e concentração, apresentaram diferenças estatísticas ao final de 48 horas de cultivo (Tabela 8). O resultado do Teste Tukey é apresentado na tabela 9.

Tabela 8. Análise de variância para remoção de cobre em função da espécie e concentração de cobre.

Consumo de cobre	GL	QM	F	SIG
Concentração	1	9,724050	76,779	0,00000
Espécie	2	4,867800	38,435	0,00000
Concentração * Espécie	2	0,5766000	4,553	0,03378
Resíduo	12	0,1266500		
Coeficiente de variação = 5,214				

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 9. Remoção de cobre pelas espécies em diferentes concentrações de cobre.

Espécie	Concentração	
	7,72 mg L ⁻¹	15,20 mg L ⁻¹
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	5,43bB	6,20aC
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	6,57bA	8,52aA
interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	6,27bA	7,96aB

Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados apresentados na tabela 9 revelam que houve diferenças significativas na remoção de cobre pelas biomassas, acompanhando o aumento das concentrações do metal. A remoção de cobre foi maior em relação às concentrações mais elevadas, enquanto que em relação à remoção percentual (%), os maiores índices foram correlacionados à menor concentração inicial.

Os maiores índices de capacidade de remoção embora tenham ocorrido na concentração mais elevada de cobre (Figuras 10, 11 e 12), os teores remanescentes do metal em solução foram proporcionalmente maiores, resultando em menores taxas de remoção percentual. Comportamento semelhante foi observado por Souza *et al.* (2008), em relação à biossorção de cobre por diferentes espécies de fungos zoospóricos. Tais autores relataram que houve aumento na capacidade de biossorção e concomitante diminuição na remoção percentual em relação ao aumento da concentração inicial do metal.

Em 48 horas de cultivo *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou uma remoção de cobre 14,77% e 15,27% superior a *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 quando cultivadas nas concentrações iniciais 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente. Assim, tais resultados demonstraram maior percentual de remoção de cobre pela bactéria Gram-negativa do que para a Gram-positiva.

Pesquisas na literatura informam que as bactérias Gram-positivas possuem maior potencial de biossorção de metais do que as Gram-negativas, pois as primeiras possuem várias camadas de peptidoglicano na superfície celular, portanto uma quantidade maior de grupos funcionais livres para a adsorção de metais (Costa e Duta, 2001; Van

Hullebusch *et al.*, 2003). Entretanto o uso de células vivas e em crescimento pode alterar a capacidade de remoção dos íons metálicos, uma vez que estes podem ser internalizados via transporte ativo.

Voss e Thomas (2001), ao estudarem a remoção de cobre e manganês por *Bacillus* sp e *Pseudomonas* sp, verificaram maior capacidade de remoção de cobre para *Bacillus* sp no primeiro período de cultivo. Entretanto a capacidade de remoção de cobre por *Pseudomonas* sp aumentou 65% quando comparado a *Bacillus* sp quando o tempo de crescimento das células passou de 16 para 90 horas. Desta forma tais resultados sugerem maior capacidade de remoção de cobre pela bactéria Gram-negativa do que pela bactéria Gram-positiva em crescimento ativo.

O processo de remoção de cobre pode ser dividido em dois estágios (figuras 10, 11 e 12). O primeiro estágio da cinética de remoção para as concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ terminaram às duas horas de contato sendo responsável por 61,78% e 36,71% do cobre removido para *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e 76,0% e 51,71% do cobre removido para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475. Ao final do cultivo (48 horas) *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 removeram 8,55% e 4,07% e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 9,1% e 4,34% a mais de cobre se comparado ao primeiro período de cultivo.

Estes resultados confirmam informações da literatura as quais têm demonstrado que células metabolicamente ativas quando utilizadas para remoção de metais apresentam um padrão de sorção bifásico. No estágio inicial a taxa de sorção é muito alta e ocorre em um curto período de tempo. No segundo estágio a taxa de sorção é muito baixa e ocorre em um período de tempo maior e sua contribuição para a sorção total de metal é pequena (Donmez e Aksu, 2001; Malik, 2004).

5.3 Eficiência de remoção do cobre

A eficiência de remoção mostra a relação entre a concentração de metal removido e a biomassa produzida (Figuras 13, 14 e 15).

A eficiência de remoção foi determinada através da equação: $q = (C_i - C_f) / B$. Onde q é a quantidade de metal removido por biomassa (mg g⁻¹), C_i é a concentração

inicial de metal em solução (mg L^{-1}), C_f é a concentração final de metal em solução (mg L^{-1}), e B é a quantidade de biomassa (g L^{-1}).

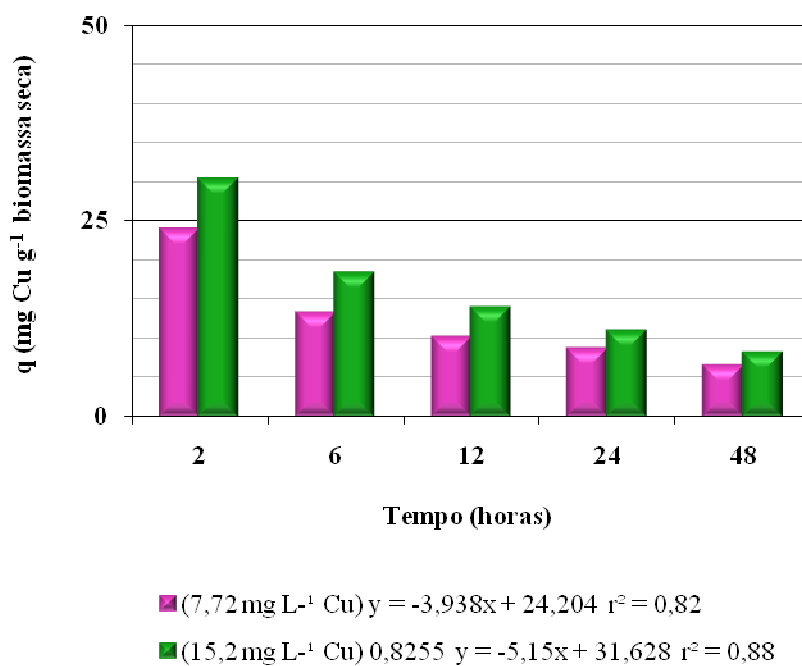


Figura 13. Eficiência de remoção de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

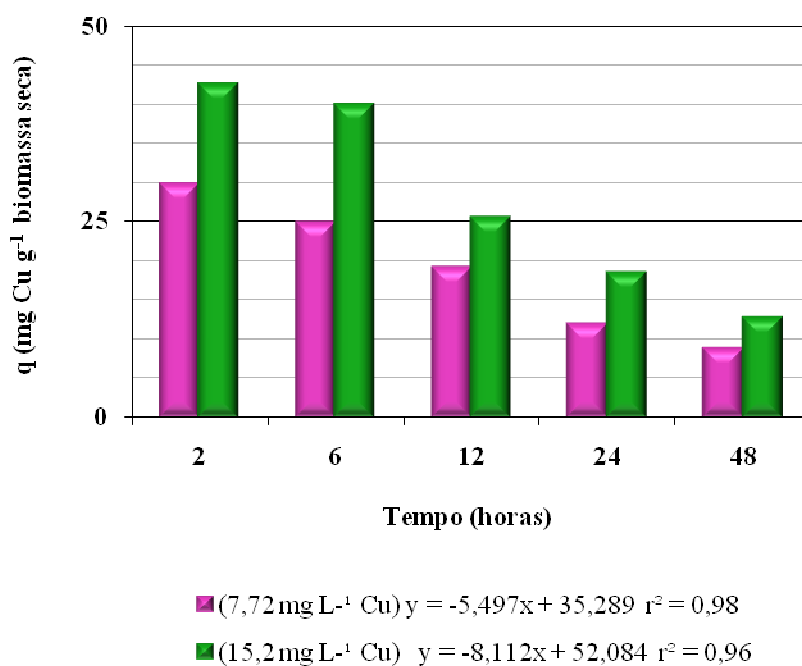


Figura 14. Eficiência de remoção de cobre por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

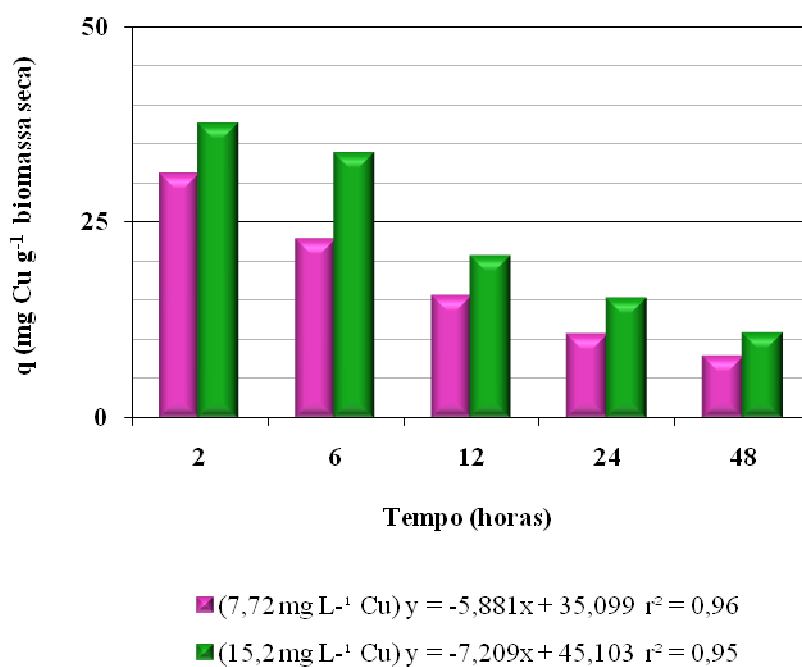


Figura 15. Eficiência de remoção de cobre pela interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

A eficiência máxima de remoção de cobre correspondeu a 30,16 mg g⁻¹; 42,48 mg g⁻¹ e 37,43 mg g⁻¹ em 2 horas de experimento para *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) respectivamente (Figuras 13, 14 e 15).

Os resultados demonstraram que o valor de q aumentou com a elevação da concentração inicial de cobre. A mais alta eficiência de remoção ocorreu nos estágios iniciais de incubação, ou seja, nos intervalos de 2 e 6 horas. Após este período, o valor de q declinou continuamente com o tempo experimental, como resposta a diminuição da proporção cobre/biomassa (Figuras 13, 14 e 15).

Resultados semelhantes foram descrito por Souza *et al.* (2008), testando a bioissorção de cobre por diferentes espécies de fungos zoospóricos. Tais autores observaram que os maiores valores de eficiência de remoção (q) foram encontrados nas maiores concentrações de cobre.

Yilmaz *et al.* (2010), ao estudarem a bioissorção de cobre pela bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecium* em concentrações iniciais de cobre de 25 mg L⁻¹ a 500 mg L⁻¹, verificaram que a capacidade máxima de bioissorção foi 106,4 mg g⁻¹. Eficiência de remoção superior ao apresentado pela biomassa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (30,16 mg g⁻¹). Entretanto o valor de q aumenta com a elevação da concentração inicial do metal e a concentração utilizada por tais autores é superior a pesquisada no presente estudo. É válido ressaltar também que bactérias quando em crescimento ativo podem utilizar mecanismos intrínsecos visando sua sobrevivência à presença de metais em concentrações tóxicas, diminuindo assim a capacidade de remoção destes elementos.

Muitos sistemas de resistência ao metal pesado por microrganismos envolvem efluxo ativo ou desintoxicação de íons metálicos por diferentes transformações. Para o cobre, incluem complexação intracelular, complexação extracelular e seqüestro no periplasma (Rouch *et al.*, 1989; Harwood e Gordon, 1994; Alvarez e Jerez, 2004). Os processos de desintoxicação de metais incluem precipitação como fosfatos, carbonatos e sulfetos; substâncias poliméricas extracelulares e sistemas de efluxo dependentes de energia (Gadd, 1990).

O processo de bioacumulação de metais pode ser suportado pela síntese de metalotioneínas, que são proteínas ricas em cisteína (-SH, designado por grupo tiol ou grupo sulfidrilo), vinculando-os na forma que não é biologicamente ativa, portanto, esta

é excluída a partir de reações metabólicas. Estas proteínas ligam íons metálicos e frequentemente são sintetizados como resposta à presença de íons metálicos no meio de crescimento, sendo induzida pela presença destes poluentes (Martin-Gonzalez *et al.*, 2006). Assim os íons metálicos após serem internalizados são bombeados para fora da célula como um mecanismo de desintoxicação. Pesquisas revelam que a bioacumulação de adaptação em microorganismos é mais eficiente do que não-adaptados (Kocberber e Dönmez, 2007; de Siloniz et al, 2002).

Em bioacumulação os íons metálicos tóxicos quando em concentrações elevadas podem formar complexos com a membrana celular, provocando a perda da sua integridade e prejudicando a sua função na remoção destes elementos (Yilmazer e Saracoglu, 2009).

Kaduková e Vircíková (2005), ao comparar as diferenças entre a bioacumulação e a biossorção de cobre pela alga verde *Chlorella kessleri* verificaram que concentrações de cobre elevadas causam sérios danos às paredes celulares das células vivas provocando a perda da capacidade de ligação, resultando em menor capacidade remoção. Estes autorem observaram que a eficiência de remoção (q) obtidas para *C. kessleri* na biossorção é cerca de seis vezes maior do que na bioacumulação em relação a maior concentração do metal. Entretanto baixas concentrações de cobre (abaixo de 20 mg L⁻¹), não danificam as células de forma tão significativa para diminuir suas habilidades de remoção. Assim sendo, a eficiência de remoção (q) é semelhante para ambos a bioacumulação e biossorção, ou em alguns casos, a capacidade de bioacumulação pode superar a capacidade de biossorção, uma vez que o metal após ser adsorvido nas superfícies das células pode ser acumulado em seu interior (Kaduková e Vircíková, 2005).

O processo de bioacumulação apresenta vantagens em relação à biossorção, na capacidade de remoção em concentrações reduzidas de metais, uma vez que as células em crescimento são capazes de remover metais continuamente através de mecanismos de internalização, como também podem ser potencializadas através da manipulação de organismos modificados geneticamente para esta finalidade. Deng e Wilson (2001), verificaram que *Escherichia coli* modificada geneticamente com genes de metalotioneína melhoraram a capacidade de bioacumulação do mercúrio. Ueki *et al.* (2003), observaram que linhagens *E. coli* com genes que codificam proteínas de ligação

clonados de *Ascidia sydneiensis samea* removeram cerca de vinte vezes mais cobre (II) que a cepa controle, em meio à qual 10 mM de cobre (II) foram adicionados.

A principal desvantagem da biossorção está relacionada à saturação da biomassa, ou seja, quando os sítios ativos estão ocupados é necessário substituir a biomassa por biomassa nova (Ahluwalia e Goyal, 2007). Em relação aos aspectos operacionais deve-se considerar também que a remoção de metais via células em crescimento apresenta a vantagem de que os processos de unidade adicionais de biomassa são reduzido: cultivo, secagem, processamento e armazenamento (Aksu e Dönmez, 2005). Assim, estes aspectos podem influenciar no custo final de todo o processo.

O uso de células vivas é eficiente na remoção ativa contínua de metais e os custos operacionais são reduzidos em comparação a biossorção. Entretanto a bioacumulação é um processo de não-equilíbrio (Aksu e Dönmez, 2000), sendo um processo mais complexo do que a biossorção, pois requer atividade metabólica das células. Uma vez dependente do metabolismo celular, a bioacumulação pode ser influenciada por inibidores metabólicos tais como a baixa temperatura, nutrientes entre outros (Kaduková e Vircíková, 2005; Genter, 1996). Portanto, os fatores que podem interferir na eficácia do biossorvente devem ser minuciosamente controlados e monitorados em tratamentos de efluentes industriais.

Existem alguns biossorventes comerciais disponíveis no mercado: AlgaSORB® é produzido pela empresa Biorecovery Systems. AlgaSORB® é um sorvente de algas em pó. O sorvente consiste em biofilme imobilizado em sílica gel, consistindo de alga multicelular verde filamentosa *Spirogyra* (Chojnacka, 2010; Singh e Prasad, 2000). As outras preparações comerciais de biossorção incluem: BIOCLAIM® (bactérias do gênero *Bacillus*, lavadas e imobilizadas em esferas de polietilenoimina (PEI) e glutaraldeído), e o processo BIO-FIX® (esfagno, musgo de turfa, algas, fungos, bactérias e flora aquática imobilizada em polissulfona) (Chojnacka, 2010).

A capacidade de remoção ativa de cobre em concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ pela biomassa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 indicam potencial destas cepas bacterianas em biorremediação. Ao considerar a capacidade de biossorção de células inativas em elevadas concentrações de metais, o tratamento de efluentes industriais como um processo contínuo (Etapas: Biossorção – Bioacumulação) pode ser uma alternativa

eficaz, com vistas à redução dos custos operacionais, sendo este o parâmetro principal para convencer industriais a optarem pelo uso de absorventes renováveis.

No entanto, para que ocorra a expansão da tecnologia de biossorventes em tratamentos de efluentes industriais, pesquisas adicionais são necessárias, com fins de comparações com as tecnologias concorrentes, tais como: tratamentos químicos convencionais, os custos dos biossorventes e formulação de produtos prontos para uso, bem como o tipo do biossorvente e sua melhor aplicabilidade (Volesky, 2007).

5.4 Acumulação intracelular de cobre

As biomassas foram lavadas com EDTA antes da análise sugerindo acumulação intracelular. Os resultados percentuais de acumulação de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e pela interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) são apresentados nas figuras 16, 17 e 18.

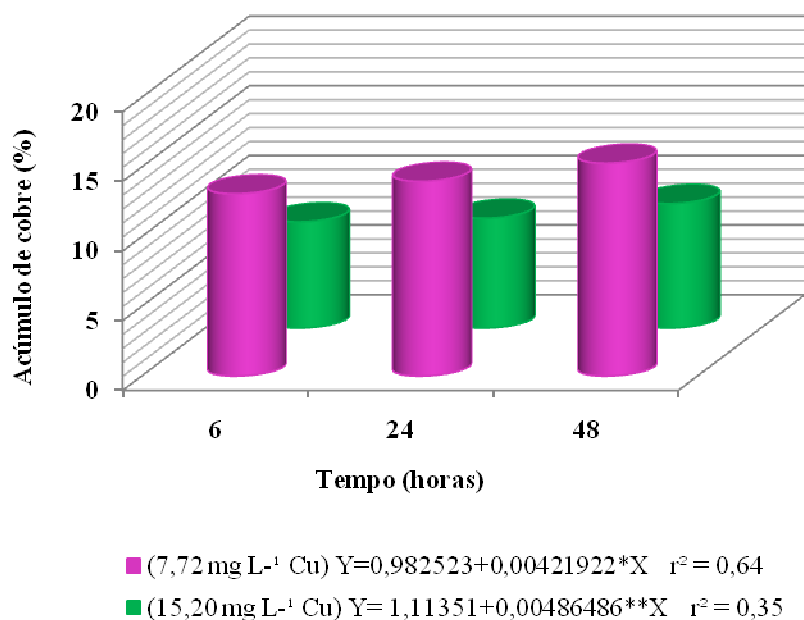


Figura 16. Acumulação de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

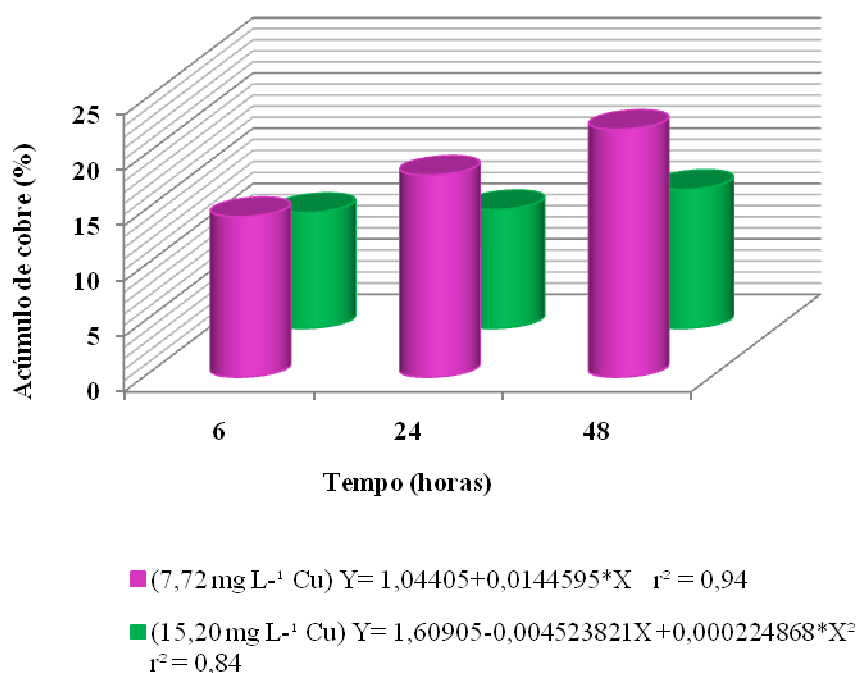


Figura 17. Acumulação de cobre por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

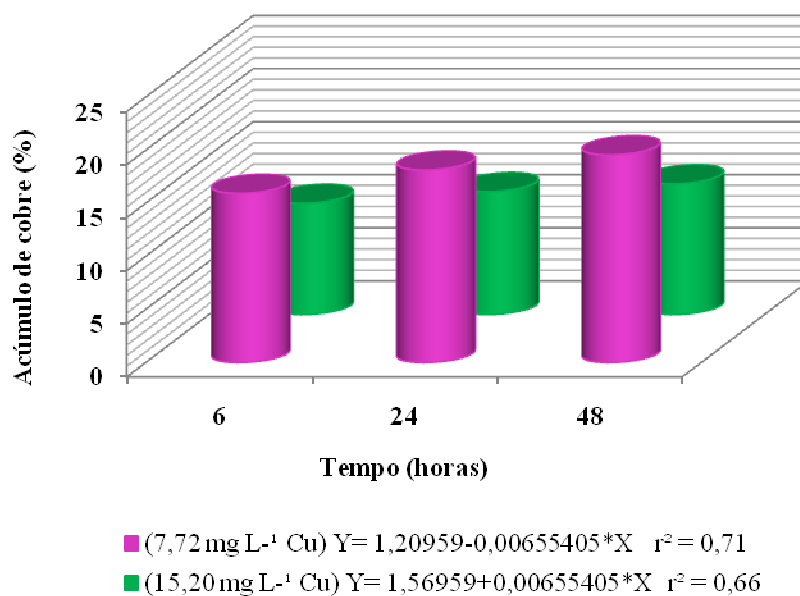


Figura 18. Acumulação de cobre pela interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475.

A acumulação de cobre pela biomassa bacteriana aumentou com a concentração de metal externa e com o tempo de cultivo, enquanto que em relação aos valores percentuais os maiores índices foram correlacionados à menor concentração inicial (figuras 16, 17 e 18). Em 48 horas de cultivo apresentaram valores percentuais de 15,28%, 22,40% e 19,55% de acumulação de cobre para *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) respectivamente na concentração de 7,72 mg L⁻¹ de cobre (Figuras 16, 17 e 18).

A capacidade máxima de acumulação intracelular foi 3,69 mg g⁻¹; 11,19mg g⁻¹ e 7,42mg g⁻¹ para as biomassas de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação bacteriana (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) respectivamente. A eficiência de acumulação (q) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 foi maior do que *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

A análise de variância para o acúmulo de cobre apresentou diferença estatística ao nível de 5% de significância ao final do período de cultivo, para os fatores espécies e concentrações de cobre (Tabela 10). Para esses fatores foram aplicados o Teste Tukey, cujos valores são apresentados na tabela 11.

Tabela 10. Análise de variância para acúmulo intracelular de cobre em função da espécie e concentração de cobre.

Consumo de cobre	GL	QM	F	SIG
Concentração	1	0,2544222	113,638	0,00000
Espécie	2	0,4893556	218,571	0,00000
Concentração * Espécie	2	0,1682222	7,514	0,00766
Resíduo	12	0,2238889		
Coeficiente de variação = 5,214				

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 11. Acúmulo intracelular de cobre pelas espécies em diferentes concentrações do metal.

Espécie	Concentração	
	7,72 mg L ⁻¹	15,20 mg L ⁻¹
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	1,18bC	1,36aB
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	1,73bA	1,91aA
interação entre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475	1,51bB	1,87aA

Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou maior acúmulo intracelular de cobre quando comparado a *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, atribuindo maior potencial de bioacumulação de cobre para a bactéria Gram-negativa do que para a Gram-positiva em crescimento ativo. Entretanto, o principal processo de remoção de cobre por ambas as cepas foi a bioissorção (Tabela 11).

Resultados semelhantes foram verificados por Anand *et al.* (2006) ao estudarem o fracionamento celular de *Trichoderma viride*, estes autores verificaram que a maior porcentagem do cobre removido, estava adsorvido na parede celular e a menor parcela foi revelada no interior das células.

Uma das diferenças básicas entre a bioissorção e a acumulação intracelular é que o grau de acumulação é expressivamente menor do que a bioissorção (Raraz, 1995). No entanto o uso de células vivas e em crescimento apresentam tanto remoção via bioissorção (adsorção na parede celular) como acumulação intracelular, apresentando desta forma vantagens em relação ao uso de células inativas na remoção de metais.

Chen *et al.* (2006), isolaram a cepa *Pseudomonas putida* CZ1 da rizosfera de *Elsholtzia splendens* para fins de estudos de eficiência de remoção ao cobre (Cu) e zinco (Zn). Esta cepa bacteriana foi capaz de remover cobre durante o ciclo de crescimento ativo, com capacidades de remoção específica de 24,2 mg g⁻¹ em 100 mg L⁻¹ Cu. O efeito do cobre (II), chumbo (II) e cromo (VI) sobre as propriedades de crescimento e bioacumulação de *Aspergillus niger* foi investigada por Dursun *et al.* (2003), tais autores verificaram que os metais reduziram o crescimento da biomassa quando comparados a amostras controle. Na concentração de 100 mg dm⁻³ de cobre A.

niger apresentou uma eficiência de remoção máxima de 15,6 mg g⁻¹. Anand *et al.* (2006), ao realizarem estudos de bioacumulação de cobre durante o crescimento de *Trichoderma viride* em concentrações de 100 mg L⁻¹, observaram que este fungo foi capaz de remover 25 mg Cu g⁻¹.

As concentrações de metal utilizadas nos estudos acima foram 84,8% superiores a concentração utilizada no presente estudo e considerando que a eficiência de remoção (*q*) aumenta proporcionalmente com a concentração do cobre usado, a capacidade de remoção de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 quando comparado aos resultados divulgados na literatura citada anteriormente, pode ser considerada promissora, haja vista os valores obtidos no presente estudo, onde a capacidade máxima de remoção foi em concentrações de cobre de 15,20 mg L⁻¹. Este é o primeiro relato de bioacumulação de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475, indicando o potencial destas cepas como bioissorventes em tratamento de efluentes contaminados com metais.

6 CONCLUSÕES

- Houve uma diminuição na taxa de crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475, proporcional à concentração inicial do metal durante o período de cultivo.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 apresentou maior crescimento frente à presença de cobre em concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹, demonstrando maior adaptação fisiológica quando comparado a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475;
- O cobre influenciou no consumo de fósforo durante o crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475;
- O requerimento de fósforo pelas células cultivadas na presença de cobre foi maior do que a cultura do grupo controle, portanto pode-se sugerir que o fósforo esteja sendo utilizado para suportar o crescimento das biomassas em presença de cobre;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 foram capazes de remover cobre do meio de cultivo;
- A interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475) apresentou valores intermediários de crescimento, consumo de fósforo, porcentagem de remoção de cobre e eficiência (q) quando comparados aos isolados de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475;

- *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou maior porcentagem de remoção de cobre e eficiência (q) quando comparado a *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e interação entre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentam potencial para tratamento de efluentes industriais contaminados com cobre.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKRA, A.; VEBO, H.; INDAHL U.; SNIPEN, L.; GJERSTAD, O.; LUNDE, M.; NES I. F. The Response of *Enterococcus faecalis* V583 to Chloramphenicol Treatment. **International Journal of Microbiology**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

ABNT. **Água: determinação de fósforo – NBR 12772**. Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 9p. 1992.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 989 p.

AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, p.2243-2257, 2007.

AIKING, H.; STIJNMAN, A.; GARDEREN, C. V.; HEERIKHUIZEN, H. V.; RIET, J. V. Inorganic Phosphate Accumulation and Cadmium Detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 Growing in Continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.374-377, 1984.

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. The use of molasses in copper(II) containing wastewaters: effects on growth and copper(II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p.451-458, 2000.

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v.40, p.2443-2454, 2005.

AKTAS, O.; ÇEÇEN, F.; Adsorption, desorption and bioregeneration in treatment of 2-chlorophenol with activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v.141, p.769-777, 2007.

ALBARRACÍN, V. H.; VINIK, B.; KOTHE, E.; AMOROSO, M. J. Copper bioaccumulation by the actinobacterium *Amycolatopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v.48, p.323-330, 2008.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Commensals upon us. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p.893-900, 2006.

ALVAREZ, S.; JEREZ, C. A. Copper Ions Stimulate Polyphosphate Degradation and Phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.5177-5182, 2004.

ANAND, P., ISAR, J.; SARAN, S.; SAXENA, R. K. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. **Bioresource Technology**, v.97, p.1018-1025, 2006.

APRILE, F. M.; BOUVY, M. Heavy metal levels in surface waters from a tropical river basin, Pernambuco State, northeastern **Brazil Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, p.357-364, 2010

ARSHAD, M.; ZAFAR, M. N.; YOUNIS, S.; NADEEM, R. The use of Neem biomass or the biosorption of zinc from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v.157, p.534-540, 2008.

ASTON, N. S.; WATT, N.; MORTON, I. E.; TANNER, M. S.; EVANS, G. S.; Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells. **Human & Experimental Toxicology**, v.19, p.367-376, 2000.

AZEVEDO, S. M.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, N. E.; RIBEIRO, C. F. S.A.; SILVA, V.E. F; AGUIAR, F. C. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.618- 624, 2003.

BARROS, A. J. M.; PRASAD, S.; LEITE, V. D.; SOUZA, A. G. The process of biosorption of heavy metals in bioreactors loaded with sanitary sewage sludge. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 153-162, 2006.

BARROS, A. J. M.; PRASAD, S.; LEITE, V. D; SOUZA, A. G. Biosorption of heavy metals in upflow sludge columns. **Bioresource Technology**, v.98, p.1418-1425, 2007.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.625-651, 2005.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p. 185-195, 2000.

BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P. A. Patologia e métodos de diagnóstico de *Salmonella* enteritidis. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E

TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, p. 14-19, 1995.

BEVERIDGE, T. J. Role of cellular design in bacteria-metal accumulation and mineralization. **Annual Review of Microbiology**, v.43, p.147-171, 1989.

BOHLE, L. A.; FAERGESTAD, E. M.; VEISETH-KENT, E.; STEINMOEN, H.; NES I. F.; EIJSINK, V. G. H.; MATHIESEN, G. Identification of proteins related to the stress response in *Enterococcus faecalis* V583 caused by bovine bile. **Proteome Science**, v. 8, p. 1-12, 2010.

BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, v.40, p.2338-2342, 2010.

BRARKER, A. V.; BRYSON, G. M. Bioremediation of Heavy Metal and Organic Toxicants by Composting. **The Scientific World Journal**, v.2, p.407-420, 2002.

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

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p. 573-606, 2000.

CAMARGO, I. L. B. C.; ZANELLA, R. C.; GILMORE, M. S. and DARINI, A. L. C.. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin - susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.9, p. 273-278, 2008.

CARVALHO, V. M. Colibacilose e salmonelose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Orgs.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p.42-750, 2006.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **Salmonella: annual summary 2005**. Georgia: US Department of Health and Human Services, 2007. 79 p.

CELERE, M. S.; OLIVEIRA, A. S.; TREVILATO, T. M. B.; SEGURA-MUNHÔZ, S. I. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil e sua relevância para saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, p. 939-947, 2007.

CHATTERJEE, A.; LALITAGAURI, R. Biosorption of Cu(II) by immobilized biomass of *Bacillus cereus* from aqueous solution. **Journal of Scientific and Industrial Research (JSIR)**, v.67, p. 629-634, 2008.

CHAVERS, L. S.; MOSER, S. A.; BENJAMIN, W. H.; BANKS, S. E.; STEINHAUER, J. R.; SMITH, A. M.; JOHNSON, C. N.; FUNKHOUSER, E.; CHAVERS, L. P.; STAMM, A. M.; WAITES, K. B. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**, v.53, p. 159-71, 2003.

CHEN, X. C.; SHI, J. Y.; CHEN, Y. X.; XU, X. H.; XU, S. Y.; WANG, Y. P. Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metal-polluted soil Canadian. **Journal Microbiology**, v.52, p.308-316, 2006.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. **Environment International**, v.36, p. 299-307, 2010.

CONAMA - **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 07 de Abril de 2011.

COSTA, A. C. A.; DUTA, F. P. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal Microbiology** [online], v.32, p.1-5, 2001.

COTORAS, D. Sorption of metal ions by whole cells of *Bacillus* and *Micrococcus*. **Environmental Technology**, v.13, p.551-559, 1992.

DAVIES, R. Salmonellosis. In: World Organization for Animal Health – OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 5th ed. chap. 2.10.3, 2004. Disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00129.htm>. Acesso em: 18 de abril de 2011.

DE MORA, A. P.; BURGOS P.; MADEJÓN E.; CABRERA, F.; JAECKEL, P.; SCHLOTTER, M. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 38, p.327-341, 2006.

DE SILONIZ, M. I.; BALSALOBRE, L.; ALBA, C.; VALDERRAMA, M. J.; PEINADO, J. M. Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. **Research in Microbiology**, v.153, p.173-180. 2002.

DEBELIUS, B.; FORJA, J. M.; DELVALLS, A.; LUBIÁN, L. M. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1503-1513, 2009.

DEMÍR, A.; ARISOY, M. Biological and chemical removal of Cr (VI) from waste water: cost and benefit analysis. **Journal of Hazardous Material**, v.147, p.275-280, 2007.

DENG, X.; WILSON, D. B. Bioaccumulation of mercury from wastewater by genetically engineered *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.276-279, 2001

DEVRIESE, L.A.; COLLINS, M. D.; WIRTH, R. **The Genus *Enterococcus***. In "The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications". 2nd Ed. Ed A.Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer, v.66, p. 1465-1481, 1991.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. Bioaccumulation of Cooper (II) and Nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. **Water Research**, v. 35, p.1425 – 1434, 2001.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, v.35, p.135-142, 1999.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p. 143-152, 2002.

DURSUN, A.Y.; USLU, G.; CUCI, Y.; AKSU, Z. Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing *Aspergillus Níger*. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1647-1651, 2003.

ELLIS, R. J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. Cultivation dependant and independent appoache for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, p. 3223-3230, 2003.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v.35, p.221-228, 2002.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Eds, Washington: ASM Press, p 1-54, 2002.

FERNANDES, S. A.; TAVECCHIO, A. T.; GHILIARDI, A. C.; DIAS, A. M.; ALMEIDA, I.A.; MELO, L. C. *Salmonella* sorovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p. 179-184, 2006.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p.234-239, 2003.

FIGUEIRA, M. M.; VOLESKY, B.; CIMINELLI, V. S. T.; RODDICK, F. A. Biosorption of metals in Brown seaweed biomass. **Water Research**, v.34, p.196-204, 2000.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, v.25, p.541-554, 2006.

FOULQUIE MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

FRANZ, C. M.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p.1-24, 1999.

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v.46, p. 834-840, 1990.

GADD, G. M. Metals and Microorganisms: A problem of definition. **FEMS Microbiology Letters**, v.100, p.197-204, 1992.

GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytology**, v.124, p.25-60, 1993.

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

GARBIN, R.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, p.1436-1440, 2005.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In. CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa University Press, cap. 16, p.567-613, 2003.

GAST, R. K. Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-borne *Salmonella* in Poultry. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.51, p. 817-828, 2007.

GENTER, R.B. Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. Pages. 403-468, In: Stevenson, R.J., M. Bothwell, and R. Lowe (Eds.), **Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems**. Academic Press, San Diego, California. 1996.

GIKAS, P.; SENGÖR, S.S.; GINN, T. ; MOBERLY, J.; PEYTON, B. The effects of heavy metals and temperature on microbial growth and lag. **Global NEST Journal**, v.11, p. 325-332, 2009.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.163-71, 2002.

GODLEWSKA-ZYLKIEWICZ B. Microorganisms in inorganic chemical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.384, p. 114-123, 2006.

GOMES, N. C. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SAVAIDIS, I. Metal Biorremediation by Microorganisms. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.85-92, 1998.

GONÇALVES JUNIOR, A. C.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio em soja cultivada em Latossolo Vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. **Química Nova**, v. 23, p. 173-177, 2000.

GONÇALVES JUNIOR, A. C.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Uso de biomassa seca de aguapé (*Eichornia crassipes*) visando à remoção de metais pesados de soluções contaminadas. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 31, p. 103-108, 2009.

GONG, R.; DING, Y.; LIU, H.; CHEN, Q.; LIU, Z. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *spirulina maxima* biomass. *Chemosphere*, v.58, p. 125-130, 2005.

GONZALEZ, H.; JENSEN, T. E. Nikel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. **Microbios**, v. 93, p. 179-185, 1998.

GREENFIELD, N. J.; HUSSAIN, M.; LENARD, J. Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a Pnuclear magnetic resonance study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 926, 205-214, 1987.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**, New York: CABI Publishing, cap.1, p. 1-17. 2000.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars**. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Institute Pasteur, 2007.

GUPTA, R.; AHUJA, P.; KLAN, S.; SAXENA, R. K.; MOHAPATRA, H. Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. **Current Science**, v.78, p. 967-973. 2000.

HARWOOD, V. J.; GORDON, A. S. Regulation of extracellular copper-binding proteins in copper-resistant and copper-sensitive mutants of **Vibrio alginolyticus** *Vibrio alginolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1749-1753, 1994.

HIJIKATA, N.; MURASE, M.; TANI, C.; OHTOMO, R.; OSAKI, M.; EZAWA, T. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v.186, p.285-289, 2010.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.239-49, 1998.

JONES, Y. E.; McLAREN, I. M.; WRAY, C. Laboratory Aspects of Salmonella. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella* in domestic animals. New York: CABI Publishing, cap. 23, p.393-405, 2000.

KADUKOVA, J.; VIRCIKOVA, E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environment International**, v.31, p. 227-232, 2005.

KEASLING, J. D.; HUPF, G. A. Genetic Manipulation of Polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.743-746, 1996.

KEASLING, J.D. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.829, p.242-249, 1997.

KEASLING, J.D.; VAN DIEN, S.J.; PRAMANIK, J. Engineering polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*: Implications for bioremediation of inorganic contaminants. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, p.231-239, 1998.

KEASLING, L. D.; VAN DIEN, S. J.; TRELSTAD, P.; RENNINGER, N.; MCMAHON, K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**. Moscow, v. 65, p.324-331, 1999.

KEASLING, J.D.; VAN DIEN, S.J.; TRELSTAD, P.; RENNINGER, N.; MCMAHON, K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry** (Moscow), v.65, p.324-331, 2000.

KIM, S.U.; CHEONG, Y.H.; SEO, D.C.; HUR, J.S. HEO, J.S.; CHO, J.S. Characterization of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp). **Water Science and Technology**, v.55, p.105-111, 2007.

KOÁCS, A. T.; HARTSKAMP, M. V.; KUIPERS, O. P.; KRANENBURG, R. V. Genetic Tool Development for a New Host for Biotechnology, the Thermotolerant Bacterium *Bacillus coagulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.4085-4088, 2010.

KOCBERBER, N.; DONMEZ, G. Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters. **Bioresource Technology**, v.98, p.2178-83, 2007.

KOHLER, W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, p.133-150, 2007.

KORNBERG, A.; RAO, N. N.; AULT-RICHÉ, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annual Review Biochemistry**, v.68, p.89-125, 1999.

KULAEV, I. S. Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. **Biochemistry**, v.65, p.269-270, 2000.

KULAEV, I. S.; VAGABOV, V. M.; KULAKOVSKAYA, T. V.; The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. **Wiley, Chichester**. 2004. 277 p.

KULAEV, I.; KULAKOVSKAYA, T. Polyphosphate and Phosphate Pump. **Annual Reviews Microbiology**, v.54, p.709-734, 2000.

KURODA, A.; OHTAKE, H. Molecular Analysis of Polyphosphate Accumulation in Bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v.65, p.304-308, 2000.

LINDINO, C. A.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; SCHREINER¹, G. G. O.; SCHREINER, J. S.; DE FARINA L. O. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. **Acta Scientiarum**. Technology, v. 30, p. 93-98, 2008.

LO, W.; NG, L. M.; CHUA, H.; YU, P. H. F.; SIN, S. N.; WONG, K. Biosorption and desorption of copper (II) ions by *Bacillus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.107, p.581-591, 2003.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* a mechanism for its role in endodontic failure. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 399-405, 2001.

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

LUO, F.; LIU, Y.; LI, X.; XUAN, Z.; MA, J. Biosorption of lead ion by chemically-modified biomass of marine brown algae *Laminaria japonica*. **Chemosphere**, v.64, p.1122-1127, 2006.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v.30, p.261-278, 2004.

MARENGONIL, N. G.; POSSAMAIL, M.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; OLIVEIRA A. A. M. A. Performance e retenção de metais pesados em três linhagens de juvenis de tilápia-do-Nilo em hapas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, p. 351-358, 2008.

MARTIN-GONZALEZ, A.; DIAZ, S.; BORNIQUEL, S.; GALLEGOS, A.; GUTIERREZ, J. C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology**, v.157, p.108-118. 2006.

MERMIN, J.; HUTWAGNER, L.; VUGIA, D.; SHALLOW, S.; DAILY, P.; BENDER, J.; KOEHLER, J.; MARCUS, R.; ÂNGULO, F. J. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 253-261, 2004.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. Toxicologia de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2000.

MOORE, B. A.; DUNCAN, J. R.; BURGESS J. E. Fungal bioaccumulation of copper, níquel, gold and platinum. **Original Research Article Minerals Engineering**, v. 21, p. 55-60, 2008.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, 2002. 623 p.

MULGUND, M. G.; DABEER, S. P.; DHAR, S.; MAKANI, V.; JADHAV, B. Equilibrium Uptake and Column Studies of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ Using Waste Eucalyptus Charcoal. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, p.135-142, 2011.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, p.46-65, 1990.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M.; SCHMIDT, V. *Salmonella* foodborne outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil, in 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 47- 51, 2004.

NAGASHIMA, L. A.; JÚNIOR, C. B.; DA SILVA, C. A.; FUJIMURA, A. S. Avaliação dos níveis de metais pesados em efluente líquido percolado do aterro sanitário de Paranavaí, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 31, p. 1-8, 2009.

NAJA, G.; VOLESKY, B. Behavior of the mass transfer zone in a biosorption column. **Environmental Science Technology**, v.40, p.3996-4003, 2006.

NAJA, G. M.; VOLESKY, B. **Treatment of Metal-Bearing Effluents: Removal and Recovery**. In: Wang LK, Chen JP, Hung YT, Shammas NK, editors. Handbook on Heavy Metals in the Environment. Boca Raton, FL: Taylor e Francis and CRC Press; 2010.

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

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

NISHIKAWA, K.; YAMAKOSHI, Y.; UEMURA, I.; TOMINAGA, N. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. **FEMS Microbiology Ecology**, v.44, p.253-259, 2003.

NUNES, O. C.; OLIVEIRA, E. D.; LABORDA, S. S.; HOHLENWERGER, J. C.; MORAES NETO, M.; FRANKE, C. R. Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. de jabutis piranga (*Chelonoidis carbonaria*) oriundos do tráfico de animais silvestres **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 168-173, 2010.

OFOMAJA, A. E.; HO, Y. S. Effect of pH on cadmium biosorption by coconut copra meal. **Journal Hazardous Materials**, v.139, p.356-362, 2007.

OGIER, J. C.; SERROR, P. The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 291-301, 2007.

OHOTOMO, R.; SEKIGUCHI, Y.; MIMURA, T.; SAITO, M.; EZAWA, T. Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.328, p.139-146, 2004.

PAN-HOU, H.; KIYONO, M.; OMURA, H.; OMURA, T.; ENDO, G. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v.10325, p.159-164. 2002.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.36, p.163-68, 2007.

PEDROZO, M F. M.; LIMA, I.V. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos**. Cadernos de referência ambiental. Centro de Recursos Ambientais (BA) III. Título. IV. Série. 128p. 2001.

PEGORARO, R. F.; SILVA, I. R.; NOVAIS, R. F.; MENDONÇA, E. S.; GEBRIM, F. O.; MOREIRA, F. F. R. Fluxo difusivo e biodisponibilidade de zinco, cobre, ferro e manganês no solo: influência da calagem, textura do solo e resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.859-868, 2006.

PEGORINI, E. S.; CARNEIRO, C.; ANDREOLI, C. V. Mananciais de Abastecimento Público. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Ed.). **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. 1. ed. Curitiba: Sanepar, cap. 1, p. 4-82, 2005.

PERDOCINI, G.; ROCHA, D. T.; MORAES, C.R.; BORSOI, A.; SCHMIDT, V. Presença de Salmonella spp. em pintos de um dia comercializados para produção não industrial em Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 1-3, 2011.

PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; DA CUNHA, C. D.; MESQUITA, L. M. S. Aplicação de Microorganismos no Tratamento de Resíduos: a remoção de metais pesados de efluentes líquidos. **Revista Científica e Cultural da Universidade Estácio de Sá**. Cap. 09, 2002.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 147, n. 39, p. 765-769, 1996.

PORTO, L. C. S.; ETHUR, E. M. Elementos traço na água e em vísceras de peixes da Bacia Hidrográfica Butuí-Icamaquã, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, p.2512-2518, 2009.

PRADO ACOSTA, M.; VALDMAN, E.; LEITE S. G. F.; BATTAGLINI, F.; RUZAL S. M. Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1157-1163, 2005.

RAO, N.N.; LIU, S.; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*: The Phosphate Regulon and the Stringent Response. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p.2186- 2193, 1998.

RARAZ, A. G. Biological and biotechnological waste management in materials processing. **JOM**, v. 47, p.56-62, 1995.

RASHID, M. H.; RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate is Required for Motility of Bacterial Pathogens. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 225-227. 2000.

REMONSELLEZ, F.; ORELL, A.; JEREZ, C. A. Copper tolerance of the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. **Microbiology**, v.152, p.59-66, 2006.

RINCE, A.; LE BRETON, Y.; VERNEUIL, N.; GIARD, J. C.; HARTKE, A.; AUFRAY, Y. Physiological and molecular aspects of bile salt response in *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.207-213, 2003.

ROUCH, D. R.; LEE, B. T.; CAMAKARIS, J. **Genetics and molecular basis of copper resistance in *Escherichia coli***, p. 439-446, 1989. In D. H. Hamer and D. R. Winge (ed.), Metal homeostasis. Alan Liss Inc., New York, N.Y.

RUBÍN, E.; RODRÍGUEZ, P.; HERRERO, R.; SASTRE DE VICENTE, M. E. Biosorption of phenolic compounds by the brown alga *Sargassum muticum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81p.1093-1099, 2006.

RUIZ, L.; SANCHEZ, B.; RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G.; MARGOLLES, A. Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. **FEMS Microbiology Letters**, v.274, p.316-322, 2007.

SANI, R. K.; PEYTON, B. M.; BROWN, L.T. Copper-Induced Inhibition of Growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: Assessment of Its Toxicity and Correlation with Those of Zinc and Lead. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4765–4772, 2001.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JR.; A. FERNADES, S. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 39-42, 2000.

SANTOS, R.L.; ZHANG, S; TSOLIS, R.M. et al. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.*, v.39, p.200-215, 2002.

SAVVAIDIS, I.; HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. Copper biosorption by *Pseudomonas cepacia* and other strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.117-121, 2004.

SCHIEWER S.; VOLESKY B. **Biosorption Processes for Heavy Metal Removal**. In: Lovley DE, editor. Environmental Microbe-Metal Interactions. Washington D.C.: ASM Press; 2000.

SEDGLEY, C. M.; MOLANDER, A.; FLANNAGAN, S. E.; NAGEL, A. C.; APPELBE, O.K.; CLEWELL, D. B.; DAHLÉN, G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, p. 10-19, 2005.

SELANDER, R. K.; LI, J.; NELSON, K. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: NEIDHARDI, F. C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. **Escherichia coli and Salmonella – cellular and molecular biology**. Washington: American Society for Microbiology, v. 2, p. 2691-2707, 1996.

SENTHILKUMAR, R.; VIJAYARAGHAVAN, K.; THILAKAVATHI, M.; IYER, P. V. P.; VELAN, M. Seaweeds for the remediation of wastewaters contaminated with zinc(II) ions. **Journal of Hazardous Materials**, v.136, p.791-799, 2006.

SHARMA, J.; FULEKAR, M. H. Potential of *Citrobacter freundii* for bioaccumulation of heavy metal – copper. **Biology and Medicine**, v.1, p.7-14, 2009.

SHARR, H. Controles de salmonela na União Européia. In. CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas. **Anais...**Campinas: FACTA, p.357-368, 2003.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEIL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U (VI) – Reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI), contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2959-2965, 2004.

SILVA, D. G.; SILVA, D. R.; SILVA, P. R. L.; CÍCERO, E. A. S.; FERRAZ, A. L. J.; LEMOS, M. V. F.; FAGLIARI, J. J. Avaliação da reação em cadeia da polimerase e do isolamento bacteriológico convencional na detecção de *Salmonella* Dublin em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.752-756, 2010.

SIN, C.; YU, J. Cooper adsorption and removal from water by living mycelium of White-rot fungus *Phanerochaete chysosporium*. **Elsevier Science**, v.9, 2746-2752. 1998.

SINGH, R.; PRASAD, B. B. Trace metal analysis: selective sample (copper II) enrichment on an AlgaSORB column. **Process Biochemistry**, v.35, p.897-905, 2000.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**, v. 24p. 324-330, 2001.

SOUZA, J. I. de; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A SCHOENLEIN, N. C. Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) R.L. Seym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes). **Acta Botanica. Brasilica**. [online], v.22, p. 217-223, 2008.

SOUZA, P. M.; MARINHO, P. M.; LIMA, M. A. B.; NASCIMENTO, A. E.; TAKAKI, G. M. C. Copper influence on polyphosphate metabolism of *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal Microbiology**, v.36, p. 315-320, 2005.

SPROCATI, A. R.; ALISI, C.; SEGRE, L.; TASSO, F.; GALLETTI, M.; CREMISINI, C. Investigating heavy metals resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. **Science of the total environment**, v.366, p.649-658, 2006.

STOHS, D.; ONIONS, A. H. S. Oxidative mechanisms in the toxicity of heavy metals. **Free Radicals Biology and Medicine**, v.18, p.321-336, 1995.

SURESH, N.; ROBERTS, M. F.; COCCIA, M.; CHIKARMANE, H. M.; HALVORSON, H. O. Cadmium induced loss of surface polyphosphate in *Acinetobacter lwoffii*. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.91-94. 1986.

TALLUR, P. N.; MEGADI, V. B.; KAMANAVALLI, C. M.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of p-cresol by *Bacillus* sp. strain PHN 1. **Current Microbiology**, v. 53, p. 529-533, 2006.

TANGAROMSUK, J.; POKETHITIYOOK, P.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, U.S. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. **Bioresource Technology**, v.85, 103-105, 2002.

TARANTO, M. P.; FERNANDEZ MURGA, M. L.; LORCA, G.; DE VALDEZ, G. F. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. **Journal Applied Microbiology**, v.95, p.86-91, 2003.

TUNALI, S.; KIRAN, I.; AKAR, T. Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. **Minerals Engineering**, v.18, p. 681-689, 2005.

UEKI, T.; SAKAMOTO, Y.; YAMAGUCHI, N.; MICHIBATA, H. Bioaccumulation of Copper Ions by *Escherichia coli* Expressing Vanabin Genes from the Vanadium-Rich Ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.6442-6446, 2003.

VAGABOV, V. M.; TRILISENKO, L. V.; KULAKOVSKAYA, T. V.; KULAEV, I. S Effect of a carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.877-882, 2008.

VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F. Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. waste biomass. **Bioprocess Engineer**, v.22, p.171-73, 2000.

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

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.133, p. 959-978, 2005.

VARELA, C.; MAURIACA, C.; PARADELA, A.; ALBAR, J.P.; JEREZ, C.A.; CHÁVEZF.P. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. **BMC Microbiology**, v.12, p.7-10, 2010.

VIDALI, M. Bioremediation: An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1163-1172, 2001.

VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution?. **International Microbiology**, v.3, p.17-24, 2000.

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7 p. 311-316, 1996.

VOLESKY B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v.59, p.203-216, 2001.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v.41, p.4017-4029, 2007.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.797-806, 1995.

VOLESKY, B.; WEBER, J.; VIEIRA, R. H. S. F. Biosorption of Cd and Cu by different types of *Sargassum* biomass. **Process Metallurgy**, v.9, p.473-482, 1999.

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

WANG, C.L.; MICHELS, P.C.; DAWSON, S.C.; KITISAKKUL, S.; BAROSS, J.A.; KEASLING, J.D.; CLARK, D.S. Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4075-4078, 1997.

WANG, L.; CHUA, H.; ZHOU, P. K.; WONG, S. N.; SIN, S. N.; LO, W. L.; YU, P. H. Role of cell surface components on Cu²⁺ adsorption by *Pseudomonas putida* isolated from electroplating effluent. **Water Research**, v.37, p.561-568, 2003.

WIDADA, J.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.45-59, 2002.

WOOD, H. G.; CLARCK, J. E. Biological Aspects of Inorganic Polyphosphate. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.57, p.253-260, 1988.

WU, J.; YU H. Q. Biosorption of 2, 4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 253-259, 2007.

WU, J.; YU H. Q. Biosorption of phenol and chlorophenols from aqueous solutions by fungal mycelia. **Process Biochemistry**, v.41, p. 44-49, 2006.

XU, H.; LIU, Y.; TAY, J. H. Effect of pH on nickel biosorption by aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v.97, p.359-63, 2006.

YILMAZ , M.; TAY, T.; KIVANC, M.; TURK, H. Removal of copper(ii) ions from aqueous solution by a lactic acid bacterium. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 309-314, 2010.

YILMAZER, P.; SARACOGLU, N. Bioaccumulation and biosorption of copper(II) and chromium(III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.84, p.604-10, 2009.