

ARTIGOS

REMOÇÃO DE COBRE POR BIOMASSA DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E *SALMONELLA ENTERICA* SOROVAR ENTERITIDIS EM SOLUÇÃO AQUOSA

Teodósio TKC*, Brabes KCS**, Silva FG***, Paula SM****, Fortunato FM*****, Rech CR*****, Goes RH*****, Negrão FJ*****

Resumo

Em razão dos poucos estudos a respeito do uso de células vivas na remoção de metais, com esta pesquisa visou-se avaliar a remoção de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em crescimento contínuo. Os resultados obtidos demonstraram efeito significativo ($P < 0,05$) para os fatores espécie e concentrações de cobre em decorrência do crescimento, remoção total e acúmulo intracelular de cobre. As distintas concentrações de cobre limitaram circunstancialmente o crescimento das biomassas, 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. *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou maior percentual de remoção total e acúmulo intracelular de cobre quando comparada à *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Entretanto, ambas as cepas foram capazes de remover cobre em meio de cultivo. Esses resultados sugerem que as cepas em estudo exibem potencial para a exploração na remoção de cobre.

Palavras-chave: Bactéria. Bioacumulação. Metal pesado.

* Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso; Caixa Postal 322, 79825-070, Dourados, MS; tiarakesli@yahoo.com.br

** Professora na Universidade Federal da Grande Dourados; kellybrabes@ufgd.edu.br

*** Doutoranda em Ciência da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; fabianasilva@ufgd.edu.br

**** Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; suellenpaula@ufgd.edu.br

***** Doutorando em Química pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; felipe.manfroi@hotmail.com

***** Doutoranda em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; chaiane.rech@hotmail.com

***** Professor na Universidade Federal da Grande Dourados; rafaelgoes@ufgd.edu.br

***** Professor na Universidade Federal da Grande Dourados; fabionegrao@ufgd.edu.br

Copper removal by enterococcus faecalis e salmonella enterica sorovar enteritidis biomass in water solution

Abstract

Due to the few studies regarding the use of living cells on metal removal, in this research it was aimed to evaluate the removal of copper by Enterococcus faecalis ATCC 51299 and by Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 in continuous growth. The results demonstrated significant effect ($P < 0.05$) for the species and copper concentrations factors, depending on the growth, total removal and intracellular copper accumulation. The different copper concentrations circumstantially limited biomass growth, though the metal concentrations used were not inhibitory, suggesting the development of physiologic adaptation to copper metal at concentrations of 7.72 mg L^{-1} and 15.20 mg L^{-1} . Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475 showed a higher percentage of total removal and intracellular copper accumulation when compared to Enterococcus faecalis ATCC 51299. However, both strains were able to remove copper in culture medium. These results suggest that the strains being studied exhibit potential for exploration in copper removal process.

Keywords: Bacteria. Bioaccumulation. Heavy metal.

1 INTRODUÇÃO

Muitos metais são essenciais ao bom funcionamento do organismo; entretanto, outros podem ser prejudiciais, causando efeito de toxicidade agudo ou crônico, dependendo da forma como esta está presente e da sua concentração. Salienta-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.¹

Os metais pesados como o cobre (Cu), o zinco (Zn), o ferro (Fe) e o manganês (Mn) são considerados essenciais e participam do metabolismo celular, e os metais pesados como o cádmio (Cd), o chumbo (Pb) e o cromo (Cr) não são essenciais, portanto, são tóxicos, mesmo em níveis de traço.² Os metais essenciais também podem produzir efeitos tóxicos quando em concentrações elevadas³ e influenciar os processos de crescimento dos organismos, morfologia da célula, metabolismo, formação e destruição da membrana celular.⁴ A toxicidade causa alterações na estrutura dos ácidos nucleicos, das proteínas, na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico, atuando de maneira comprometedora nas reações bioquímicas essenciais.⁵

As águas residuárias de galvanoplastia e, especialmente, a indústria elétrica contêm altos níveis de íons Cu^{2+} ; a remoção desse tipo de contaminante é necessária antes do descarte.⁶ O tratamento de ambientes contaminados por metais envolve processos físico-químicos de precipitação, floculação, eletrolise, cristalização ou adsorção; entretanto, esses processos podem ser onerosos e/ou contribuir para a formação de novos contaminantes ambientais,⁷ além de ineficazes em baixas concentrações de metais,⁸ podendo apresentar baixa eficiência de remoção, baixa seletividade e alto requerimento de energia.⁹

Considerando-se que muitos micro-organismos podem realizar a descontaminação de maneira a produzir menores riscos de perturbação do equilíbrio ecológico, as principais vantagens do uso destes para imobilização de metais incluem: baixos custos de operação, minimização do volume de químicos e alta eficiência na desintoxificação de efluentes diluídos.¹⁰

Em micro-organismos, 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.¹¹ Segundo Wang,¹² o cobre interage facilmente com radicais de oxigênio molecular, o que o torna um elemento potencialmente tóxico, e, dessa forma, muitos micro-organismos são sensíveis ao metal. Entretanto, a exposição dos micro-organismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância pela comunidade microbiana, exercendo pressão seletiva à resistência aos metais.¹³ Esses organismos capazes de crescer na presença de metais pesados e que apresentam uma significativa capacidade de sorção têm potencial para serem utilizados em biorremediação.

Segundo Gadd,¹⁴ os micro-organismos 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 a imobilização pode ocorrer por precipitação, adsorção e sequestro intracelular.

Para a remoção de metais pesados, podem ser usados micro-organismos vivos e mortos ou seus derivados. A maioria dos estudos, porém, é direcionada para o uso de biomassa inativa (morta). Entretanto, células vivas e em crescimento podem apresentar a vantagem de remoção ativa de metais pesados e potencial otimização por meio da manipulação de organismos mais resistentes.¹⁵

Mediante o imenso montante de resíduos contaminados com metais provenientes das mais diversas atividades econômicas, associado a poucos estudos a respeito do comportamento de células vivas na remoção de metais, nesta pesquisa visou-se investigar o potencial biotecnológico das cepas bacterianas *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 na remoção contínua de cobre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo 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).

2.1 MICRO-ORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Enterococcus faecalis ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 foram cedidas pelo Serviço Nacional de Aprendizagem (Senai) e pela 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 a multiplicação de células bacterianas à temperatura de 35 °C durante 24 horas.

Foi padronizada a quantidade de 1,0 mL com concentração de 10^9 células para *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT4475. Essa quantidade foi transferida para tubos corning de 15 mL de capacidade, contendo 7 mL de 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 inoculadas no meio original sem a presença de cobre. Os frascos foram incubados durante 48 horas à temperatura de 35 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As amostras coletadas nos intervalos de 2, 6, 12, 24 e 48 horas de cultivo foram centrifugadas a 2.000 rpm (Centrífuga Excelsa, modelo 206 BL/FANEM) durante 10 minutos. O precipitado de células foi mantido em estufa à temperatura de 40 °C por um período de 24 horas. Os tubos foram pesados em balança semianalítica antes e após o cultivo. A diferença entre os tubos correspondeu à biomassa seca.

2.2 CINÉTICA DE REMOÇÃO DO COBRE

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.

Para avaliar o percentual de remoção total 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-se solução de cloreto de cobre (20,0 – 100,0 µg 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 da remoção percentual, segundo a equação:

$$R\% = [(C_i - C_f) 100] / C_i \quad (1)$$

Em que R% representa a remoção percentual, C_i é a concentração inicial de metal em solução (mg L⁻¹), e C_f é a concentração final de metal em solução (mg L⁻¹).

A capacidade de acúmulo intracelular foi avaliada utilizando-se biomassas coletadas com 6, 24 e 48 horas de incubação na presença de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre. As biomassas foram

lavadas três vezes com ácido tetracético etilenodiamina (EDTA) na concentração de 0.05 M, durante cinco minutos. Após esse período, a biomassa foi digerida em ácido nítrico (65%) durante 24 horas. Em seguida, o material digerido foi analisado para determinação de cobre por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Esses experimentos foram realizados em triplicata, e os valores médios foram usados.

A relação entre as espécies, concentração de cobre e tempo, bem como os valores de crescimento, R% e acúmulo intracelular foram submetidos à análise de variância em fatorial. Os dados foram analisados pelo Programa SAEG 9.1,¹⁶ utilizando-se o teste de Tukey para comparação de médias obtidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO

O cobre atua como elemento-traço em diversas reações bioquímicas. A função mais importante desse metal reside em seu efeito sobre a citocromo oxidase e enzimas relacionadas, essenciais ao processo respiratório.¹¹ Contudo, segundo Lindino, Gonçalves, Schreiner, Sheiner e Farina,¹ os metais interferem com muitos processos fisiológicos, dependendo de sua concentração, da frequência de exposição e da suscetibilidade do organismo exposto.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que as distintas concentrações de cobre limitaram circunstancialmente a multiplicação de ambas as cepas. A análise de variância para crescimento evidenciou diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância para os fatores tempo e concentração de cobre.

Nos períodos de 6 horas e 48 horas de cultivo, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 apresentou um percentual de crescimento de 47,0% e 55,1%; 7,8% e 15,6%, 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. Para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475, nos períodos de 6 horas e 48 horas de cultivo, o percentual de crescimento foi de 55,8% e 61,4%; 5,0% e 13,4%, 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.

Tabela 1 – Período de cultivo das biomassas de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em presença de cobre[†]

Ci mgL ⁻¹	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 Bi mgL ⁻¹					<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCT 4475 Bi mgL ⁻¹				
	Tempo de cultivo (h)									
	2	6	12	24	48	2	6	12	24	48
0	0,41aD	0,70aC	0,84aB	0,90aA	0,91aA	0,37aD	0,57aC	0,74aB	0,83aA	0,86aA
7,72	0,20bE	0,37bD	0,51bC	0,63bB	0,84bA	0,18bE	0,25bD	0,37bC	0,58bB	0,81aA
15,20	0,19cE	0,31cD	0,43cC	0,56cB	0,77cA	0,19bD	0,22bD	0,38bC	0,53cB	0,74bA

Os metais podem interferir em processos microbianos importantes, e os efeitos tóxicos disso incluem o deslocamento de íons e/ou substituição de íons essenciais à célula e bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, por exemplo, enzimas e sistemas de transporte de nutrientes essenciais. Isso provoca desnaturação e inativação de enzimas, bem como rompimento da membrana celular.¹⁷ Esses efeitos resultam, principalmente, na diminuição das taxas de multiplicação microbiana e/ou inibição total, assim como morte celular.^{18,19,20} No entanto, a exposição dos micro-organismos 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.^{13,21,22}

Enterococcus faecalis ATCC51299 apresentou desenvolvimento bacteriano superior na presença de diferentes concentrações de cobre quando comparada à *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475, avaliadas nas mesmas condições de cultivo (Tabela 1). Entretanto, ambas, ao final do período de cultivo, apresentaram valores de biomassa próximos aos valores encontrados nas amostras cultivadas na ausência do metal, o que sugere desenvolvimento de adaptação fisiológica ao metal.

3.2 REMOÇÃO DE COBRE

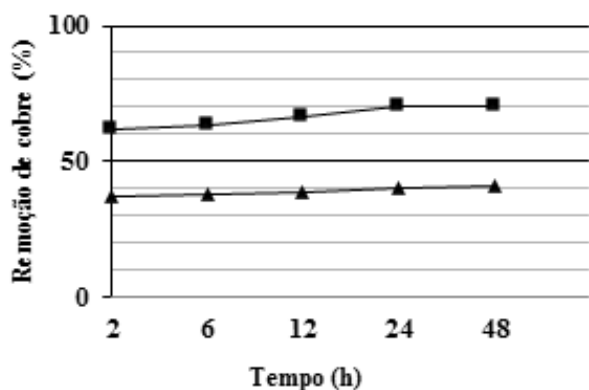
No processo de remoção de metais, a bioadsorção e a bioacumulação diferem, principalmente, em relação à natureza do adsorvente. No primeiro processo, os íons metálicos são ligados à superfície da parede celular, assemelhando-se à adsorção convencional. Para o segundo processo, a primeira fase é a bioadsorção, e as fases subsequentes estão relacionadas ao transporte dos íons para o interior da célula por meio da energia que consomem os sistemas de transporte ativo. Bioadsorção é um processo metabolicamente passivo, já em bioacumulação mais sítios vinculativos ao metal estão biodisponíveis.^{23,24}

O processo de remoção de cobre pode ser dividido em dois estágios. O primeiro estágio da cinética de remoção terminou às duas horas de contato, sendo responsável pelo maior valor percen-

[†] Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras minúsculas representam análise vertical do crescimento em razão das concentrações de cobre, e as maiúsculas representam análise horizontal do tempo de crescimento para cada nível de concentração de cobre. Ci – concentração inicial de cobre; Bi – peso biomassa.

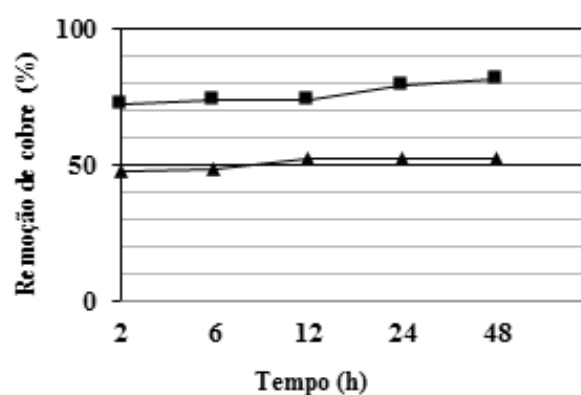
tual de remoção do metal quando comparado ao valor da diferença percentual do final do período de cultivo (Figura 1). As células metabolicamente ativas, quando utilizadas para remoção de metais, apresentam um padrão de sorção bifásico. No estágio inicial, a taxa de sorção é muito alta e ocorre em um 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.^{15,25}

Enterococcus faecalis ATCC 51299



■ (7,72 mg L⁻¹ Cu) $Y=4,85315+0,01428*X$ $r^2 = 0,33$
 ▲ (15,20 mg L⁻¹ Cu) $Y=5,63963 + 0,0129551*X$ $r^2 = 0,47$

Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475



■ (7,72 mg L⁻¹ Cu) $Y= 5,61813+0,0147754*X$ $r^2 = 0,36$
 ▲ (15,20 mg L⁻¹ Cu) $Y= 7,46320+0,0129784*X$ $r^2 = 0,20$

Figura 1 – Percentual de remoção de cobre por *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. *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. O percentual de remoção de cobre por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em 48 horas de cultivo foi de 81,21% e 52,36% para as concentrações iniciais 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹ de cobre, respectivamente.

O maior percentual de remoção de cobre ocorreu na menor concentração inicial do metal usado, 7,72 mg L⁻¹. Entretanto, o valor máximo de remoção foi obtido com a concentração de 15,20 mg L⁻¹ de cobre e correspondeu a 7,96 mg L⁻¹ (52,36%) de cobre para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em 48 horas. Assim, a taxa de remoção de cobre foi inversamente proporcional à concentração de metal inicial (Figura 1).

A remoção de cobre foi maior em relação às concentrações mais elevadas, enquanto em relação à remoção percentual (%), os maiores índices foram correlacionados à menor concentração inicial. Embora, os maiores índices de remoção tenham ocorrido na concentração mais elevada de cobre, os teores remanescentes do metal em solução foram proporcionalmente maiores, resultando em menores taxas de remoção percentual. Comportamento semelhante foi observado por Souza, Schoenlein-

-Crusius, Pires-Zottarelli e Sehoenlin,²⁶ 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 *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou maior remoção de cobre quando comparado à biomassa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 avaliadas nas mesmas condições de cultivo (Figura 1). 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.^{27,28} Entretanto, o uso de células vivas pode alterar a capacidade de remoção, uma vez que as células podem interagir ativamente com os íons metálicos no processo de desintoxicação.

Voss e Thomas,²⁹ ao estudarem a remoção de cobre e manganês por *Bacillus* sp e *Pseudomonas* sp, verificaram que 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. Dessa forma, tais resultados sugerem maior capacidade de remoção de cobre pela bactéria Gram-negativa do que pela bactéria Gram-positiva em multiplicação ativa.

3.3 ACÚMULO INTRACELULAR DE COBRE

O acúmulo intracelular de cobre pela biomassa bacteriana aumentou com a concentração de metal externa e com o tempo de cultivo, enquanto em relação aos valores percentuais os maiores índices foram correlacionados à menor concentração inicial. Em 48 horas de cultivo apresentaram valores percentuais de 15,28% e 19,55% de acumulação de cobre para *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475, respectivamente, na concentração de 7,72 mg L⁻¹ de cobre (Figura 2).

Enterococcus faecalis ATCC 51299

Salmonella enterica sorovar Enteritidis CCT 4475

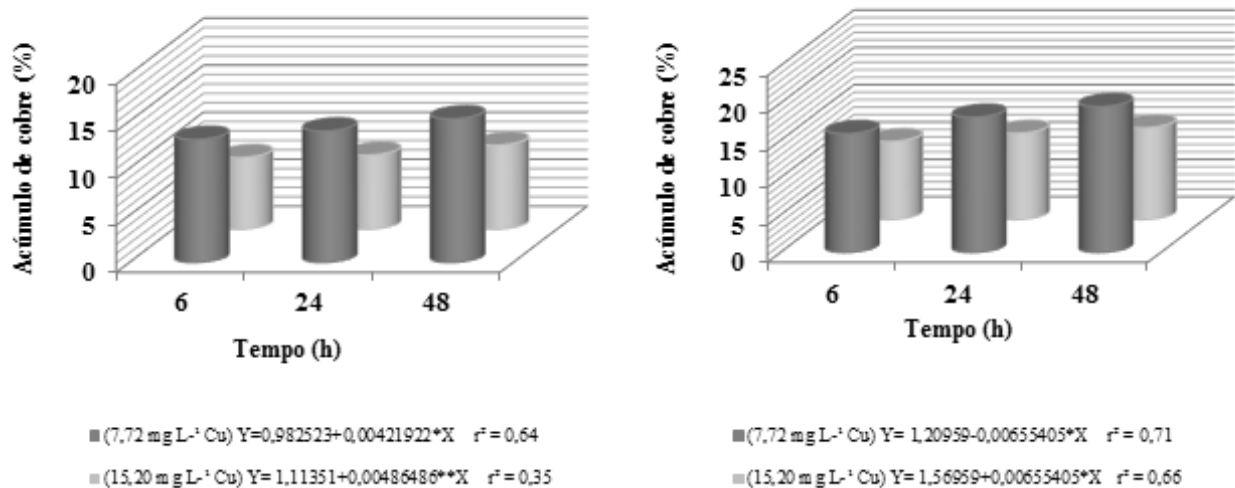


Figura 2 – Percentual de acúmulo intracelular de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475

Em ambas as cepas, o menor percentual de remoção total de cobre foi atribuído ao acúmulo intracelular. Resultados semelhantes foram verificados por Anand, Isar, Saran, Saxena,³⁰ ao estudarem o fracionamento celular de *Trichoderma viride*. Esses autores verificaram que a maior porcentagem do cobre removido estava adsorvida na parede celular, e a menor parcela foi revelada no interior das células.

A principal desvantagem da bioissorção está relacionada à saturação da biomassa, ou seja, quando os sítios ativos estão ocupados, é necessário substituir a biomassa por biomassa nova.³¹ As células metabolicamente ativas são capazes de remover metais continuamente, por meio de mecanismos internos de desintoxicação.^{15,32} Para o cobre, esses mecanismos incluem complexação intracelular, complexação extracelular e sequestro no periplasma.^{33,34} Portanto, o uso de células vivas e em crescimento pode exceder a bioissorção (adsorção à parede celular) em relação ao percentual de remoção total de íons metálicos.

Este é o primeiro relato de remoção de cobre por *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 em crescimento ativo. Os resultados apresentados neste estudo indicam o potencial dessas cepas como bioissorventes para a remoção de cobre.

4 CONCLUSÃO

Houve uma diminuição na taxa de desenvolvimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 proporcional à concentração inicial de cobre. Entretanto, as cepas cresceram continuamente durante o período de cultivo, demonstrando adaptação fisiológica ao metal nas concentrações utilizadas. *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCT 4475 apresentou maior percentual de remoção total e acúmulo intracelular de cobre quando comparada à *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Ambas as cepas removeram cobre nas concentrações de 7,72 mg L⁻¹ e 15,20 mg L⁻¹.

REFERÊNCIAS

1. Lindino CA, Gonçalves AC, Schreiner GGO, Schreiner JS, Farina L. O. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. *Acta Sci., Technol.* 2008; 30(1): 93-8.
2. Marengonil NG, Possamail M, Gonçalves AC, Oliveira AAMA. Performance e retenção de metais pesados em três linhagens de juvenis de tilápia-do-Nilo em hapas. *Acta Sci., Anim. Sci.* 2008; 30(3):351-8.
3. Puyen ZM, Villagrasa E, Maldonado J, Diestra E, Esteve I, Solé A. Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. *Bioresour. Technol.* 2012 Dec; 126:233-7.

4. Gonçalves AC, Selzlein C, Nacke H. Uso de biomassa seca de aguapé (*Eichornia crassipes*) visando à remoção de metais pesados de soluções contaminadas. *Acta Sci., Technol.* 2009; 31(1):103-8.
5. Bruins M, Kapil S, Oehme F. Microbial resistance to metal in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000 Mar; 45(3):198-207.
6. Yilmaz M, Tay T, Kivanc M, Turk H. Removal of copper(ii) ions from aqueous solution by a lactic acid bacterium. *Braz. J. Chem. Eng.* 2010 Apr-June; 27(2):309-14.
7. Pinto GAS, Leite SGE, Cunha CD, Mesquita LMS. Aplicação de microrganismos no tratamento de resíduos: a remoção de metais pesados de efluentes líquidos. *Revista Científica e Cultural da Universidade Estácio de Sá. Cap. 09*; 2002.
8. Barros AJM, Prasad S, Leite VD, Souza AG. The process of biosorption of heavy metals in bioreactors loaded with sanitary sewage sludge. *Braz. J. Chem. Eng.* 2006 Apr-June; 23(2):153-62.
9. Modenes NA, Espinoza-Quiñones FR, Lavarda FL, Colombo A, Borba CB, Leichtweis WA, *et al.* Remoção dos metais pesados Cd(II), Cu(II) e Zn(II) pelo processo de biossorção utilizando a macrofita *Eichornia crassipes*. *Rev. Esc. Minas [on-line]*. 2013 July-Sept; 66(3):355-62.
10. Tunali S, Kiran I, Akar T. Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. *Miner. Eng.* 2005 Nov; 18(7):681-9.
11. Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999 June; 51(6):730-50.
12. Wang CL, Michels PC, Dawson SC, Kitisakkul S, Baross JA, Keasling JD, *et al.* Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997 Oct; 63(10):4075-8.
13. Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ, Fry JC. Cultivation dependant and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. *Applied Environ. Microbiol.* 2003 June; 69(6):3223-30.
14. Gadd GM. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma.* 2004 Oct; 122(2-4):109-19.
15. Malik A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 2004 Apr; 30(2):261-78.
16. Universidade Federal de Viçosa. Sistema de análises estatísticas e genéticas. Versão 9,1. Manual do usuário. Viçosa; 2007.
17. Sani RK, Peyton BM, Brown LT. Copper-induced inhibition of growth of *desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001 Oct; 67(10):4765-72.

18. Stohs D, Onions AHS. Oxidative mechanisms in the toxicity of heavy metals. *Free Radic. Biol. Med.* 1995 July; 18(2):321-36.
19. Wang L, Chua H, Zhou PK, Wong SN, Sin SN, Lo WL, *et al.* Role of cell surface components on Cu 2+ adsorption by *Pseudomonas putida* isolated from electroplating effluent. *Water Res.* 2003 Feb; 37(3):561-8.
20. Gikas P, Sengör SS, Ginn T, Moberly J, Peyton B. The effects of heavy metals and temperature on microbial growth and lag. *Global Nest J.* 2009 Sept; 11(3):325-32.
21. Gadd GM. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist.* 1993 May; 124(1):25-60.
22. Gomes NCM, Mendonça-Hagler LCS, Savaidis I. Metal Biorremediation by Microorganisms. *Rev. Microbiol.* 1998; 29:85-92.
23. Chojnacka K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environ. Int.* 2010 Apr; 36(3):299-307.
24. Flout R, Estephane G. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *J. Environ. Manage.* 2012 Nov; 111:106-14.
25. Donmez G, Aksu Z. Bioaccumulation of Cooper (II) and Nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Res.* 2001 Apr; 35(6):1425-34.
26. Souza JI, Schoenlein-Crusius IH, Pires-Zottarelli CLA, Schoenlin NC. Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) R.L. Seym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes). *Acta Bot. Bras.* [on-line]. 2008 Jan-Mar; 22(1):217-23.
27. Costa ACA, Duta FP. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Braz. J. Microbiol.* 2001 Mar; 32(1):1-5.
28. Van Hullebusch ED, Zandvoort MH, Lens PNL. Metal immobilization by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Reviews Environ. Sci. Biotechnol.* 2003 Dec; 2(1):9-33.
29. Voss M, Thomas RWSP. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. *Cienc. Rural* [on-line]. 2001 Mar; 31(6):947-51.
30. Anand P, Isar J, Saran S, Saxena RK. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Biore-sour. Technol.* 2006 May; 97(8):1018-25.
31. Ahluwalia SS, Goyal D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.* 2007 Sept; 98(12):2243-57.
32. Godlewska-Zylkiewicz B. Microorganisms in inorganic chemical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006 Jan; 384(1):114-23.

33. Harwood VJ, Gordon AS. Regulation of extracellular copper-binding proteins in copper-resistant and copper-sensitive mutants of *Vibrio alginolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. 1994 June; 60(6):1749-53.

34. Alvarez S, Jerez CA. Copper Ions Stimulate Polyphosphate Degradation and Phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 2004 Sept; 70(9):5177-82.