

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA LICENCIATURA E BACHARELADO
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

Pâmela Thays da Silva Baima

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS E *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DO AMBIENTE DA LAGUNA DA JANSEN NA PRESENÇA DE METAIS PESADOS (COBRE E CHUMBO).

São Luís
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA LICENCIATURA E BACHARELADO
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

Pâmela Thays da Silva Baima

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ENTEROBACTERIAS E *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DO AMBIENTE DA LAGUNA DA JANSEN NA PRESENÇA DE METAIS PESADOS (COBRE E CHUMBO).

Monografia apresentada a coordenação do curso de Química Licenciatura como requisito para a obtenção do grau em licenciatura em Química.

Orientador(a): Dr^a Adenilde Nascimento
Mouchreck

SÃO LUÍS

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Baima, Pâmela Thays da Silva.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS E
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DO AMBIENTE DA LAGUNA DA
JANSEN NA PRESENÇA DE METAIS PESADOS COBRE E CHUMBO /
Pâmela Thays da Silva Baima. - 2019.

102 p.

Orientador(a): Adenilde Nascimento Mouchreck.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade
Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Chumbo. 2. Cobre. 3. Enterobactérias. 4. Laguna
da Jansen. 5. Pseudomonas aeruginosa. I. Mouchreck,
Adenilde Nascimento. II. Título.

Pâmela Thays da Silva Baima

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ENTEROBACTERIAS E *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DO AMBIENTE DA LAGUNA DA JANSEN NA PRESENÇA DE METAIS PESADOS (COBRE E CHUMBO).

Trabalho de monografia apresentado ao curso de Química Licenciatura, como requisito parcial para obtenção do título de licenciada em Química.

Aprovado em, _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.(a) Adenilde Nascimento Mouchreck
Universidade Federal do Maranhão
Orientadora

Prof. Dr.(a) Josilene Lima Serra
Departamento Acadêmico de Química-IFMA

M.^aAmanda Mara Teles
Departamento de Química-UFMA

São Luís – MA
2019

Dedico este trabalho em memória de Sílvia Nina Baima muito obrigada por todos conselhos, risadas e orações te amo hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS que ao longo da minha vida e em todos os momentos me deu forças para superar todas as dificuldades, A toda minha família Agradeço em especial aos meus pais, Cláudio Nina Baima Júnior e Sidineia Costa da Silva Baima, por garantirem minha educação e por todo carinho e amor e aos meus irmãos pela força ,meus avós e avôs por compartilharem sua sabedoria, meu tio Glauco ,tia Carla por toda a ajuda .Aos meus padrinhos Carlos Baima júnior e Tânia Costa por serem essências na minha caminhada ,aos meus amigos da fé representado na pessoa de Camilo Saraiva muito obrigada por tudo, aos meus amigos do curso de química que compartilharam muitos momentos ,a família PIRES na pessoa do Jairo Fabricio que além de ser meu amigo de graduação ter cedido muitas vezes seu espaço para eu realizar meus trabalhos, e ter me dado muitos conselhos. A Coordenação de Química, ao Prof. Hildo Silva e Igor Santos por toda prestatividade. À Prof.a Josilene Serra por ser exemplo de profissional, de humildade, bondade e por todos os conselhos e ajuda, a todos os meus professores que são luz no mundo, em especial a minha orientadora Prof.a Adenilde Mouchreck por ter me acolhido, compartilhado seus conhecimentos e por todo o incentivo. Por fim a Universidade Federal do Maranhão que proporcionou este momento.

Por meio de sua palavra Sagrada, Ele nos encoraja em meio a provas atemorizantes e difíceis; e devido ao ponto de vista celestial que essa sabedoria traz, é que podemos ter "por motivo de toda alegria" o ter que passar por problemas. (Tg 1:2).

RESUMO

As lagoas costeiras são um dos mais importantes ecossistemas aquáticos mantendo uma variedade de espécies de fauna e flora a exemplo da Laguna da Jansen situada em São Luís-MA, por sua beleza e recursos naturais é considerada um dos principais pontos turísticos, além proporcionar lazer e atividades para a subsistência, pois existem um grupo de pescadores que fazem o uso da pesca no local, estes são um dos fatores que proporcionaram diversas alterações paisagística e ambiental, devido a urbanização desordenada que proporcionou a emissão de efluentes domésticos que são fonte de contaminação de bactérias, trazendo odor e impedindo os habitantes do entorno de usufruírem. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o crescimento dos isolados da laguna (enterobactérias e *Pseudomonas*) frente a metais pesados de cobre e chumbo. A sensibilidade dos isolados a metais pesados foi determinada através da inoculação em superfície do Ágar Nutriente enriquecido com diferentes concentrações de sais de chumbo e cobre (0,5; 1,5 e 3,5 g.L), para a determinação da concentração inibitória mínima utilizou-se método de microdiluição em caldo com base na metodologia adaptada. Os resultados obtidos demonstram que as bactérias foram resistentes ao chumbo, e parcialmente sensíveis ao cobre na concentração de 3,5 e 1,5 g/L na menor concentração 0,5 g/L foram resistentes a este metal demonstrando que as bactérias possuem mecanismos de resistência, possivelmente pelo estresse para sobreviver em seu habitat que possuía concentrações dos metais, diante desses resultados sugere-se a utilização dos microrganismos para a biorremediação para retirar metais pesados de água e solo contaminados.

Palavras-chaves: Laguna da Jansen. Enterobactérias. *Pseudomonas aeruginosa* Chumbo. Cobre.

ABSTRACT

The coastal lagoons are one of the most important aquatic ecosystems, maintaining a variety of fauna and flora species, such as the Laguna da Jansen located in São Luís-MA. Due to its beauty and natural resources, it is considered one of the main tourist attractions. activities for subsistence, since there is a group of fishermen who make use of fishing in the place, these are one of the factors that provided several landscape and environmental changes, due to the disordered urbanization that provided the emission of domestic effluents that are a source of contamination. bacteria, bringing odor and preventing the surrounding inhabitants from enjoying it. Thus, the objective of this work is to evaluate the growth of laguna isolates (enterobacteria and *Pseudomonas*) against copper and lead heavy metals. The sensitivity of the isolates to heavy metals was determined by surface inoculation of nutrient agar enriched with different concentrations of lead and copper salts (0,5, 1,5 and 3,5 g/L) to determine the inhibitory concentration. Broth microdilution method based on the methodology adapted. The results demonstrated that the bacteria were resistant to lead and partially sensitive to copper at a concentration of 3,5 and 1,5 g/L at the lowest concentration 0,5 g/L were resistant to this metal demonstrating that the bacterial ones have resistance mechanisms, possibly due to stress to survive in their habitat that had metal concentrations. microorganisms for bioremediation to remove heavy metals from contaminated water and soil.

Keywords: Lagoon of Jansen. Enterobacteria. *Pseudomonas aeruginosa* . Lead. Copper.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Laguna da Jansen	23
Figura 2. Enterobactérias	25
Figura 3. E. coli.....	27
Figura 4. Citrobacter	29
Figura 5. P. aeruginosa	32
Figura 6. Cobre.....	41
Figura 7. Chumbo.....	43
Figura 8. Suscetibilidade pelo método de microdiluição em ágar.....	49
Figura 9. Microdiluição em caldo	50
Figura 10. Medição de pH das 9 amostras	51
Figura 11. Percentual de cepas de bactérias retiradas da água que foram inibidas pelo Cu^{2+} na concentração de 3,5 g/L e 1,5 g/L.	52
Figura 12. Diferença das cepas no meio de cobre e chumbo na concentração de 3,5 g/L.	54
Figura 13. Percentual de cepas de bactérias retiradas do peixe que foram sensíveis ao Cu^{2+} na concentração de 3,5 g/L e 1,5 g/L.....	55
Figura 14. Crescimento das bactérias no meio de cobre e chumbo na concentração de 1,5 g/L.	57
Figura 15. Percentual das cepas de bactérias retiradas do sedimento que foram sensíveis ao Cu^{2+} na concentração de 3,5 g/L e 1,5g/L.....	58
Figura 16. Cepas no meio de cobre e chumbo na concentração de 0,5 g/L.	60
Figura 17. Resistencia de Enterobactérias isoladas da água, peixe e sedimento no meio de cobre nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.	60
Figura 18. Percentual de Pseudomonas aeruginosas no metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.	63
Figura 19. Percentual de Pseudomonas aeruginosas no metal chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.	65
Figura 20. Pseudomonas no meio de chumbo e cobre na concentração de 1,5g/L.	67
Figura 21. Fluorescência das Pseudomonas no meio de chumbo.	67
Figura 22. Fluorescência das P.aeruginosa no meio de chumbo e cobre.	69
Figura 23. Medição do pH do meio de cobre.....	71
Figura 24. Biomassa dos isolados da Laguna da Jansen da água, sedimento e peixe frente aos metais na concentração de 1,5 g/L.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medição de pH das cepas de bactérias do gênero <i>C. diversus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> isoladas da Laguna da Jansen (água, peixe e sedimento), Cu^{2+} (1,5 g/L) e Pb^{3+} (3,5g/L).....	70
--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ag⁺ - Íon Prata
AMR-Resistencia a antimicrobianos
ANVISA-Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
As- Metal Arsênio
As³⁺-Íon Arsênio
ATPASES- trifosfatos de adenosina (Adenosinatrifosfatases)
Cd-Cadmio
Cd²⁺-Íon Cadmio
CLSI - Comitê Nacional de normas de Laboratório Clínico (National Commitee for Clinical Laoratory Standards)
CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente
Co⁺²-Íon Cobalto
Cu- Metal Cobre
Cu⁺²-Íon Cobre
DAEC- *E. coli* difusamente aderente
DNA-Ácido Desoxirribonucleico
EAEC- *E. coli* enteroagreativa
EHEC- *E. coli* entero - hemorrágica
EIEC- *E. coli* enteroinvasiva
EPEC- *E. coli* enteropatogenica
ETEC- *E. coli* enterotoxigenica
EXTEC-*E. coli* patógeno extra intestinal
IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LABOHIDRO-Laboratório de Hidrobiologia da Universidade Federal do Maranhão
Mn²⁺-Íon Manganês
N-Nitrogênio
Ni- Metal Níquel
Ni²⁺ -Íon Níquel
OMS- Organização Mundial da Saúde
P-Fósforo
Pb-Metal chumbo
Pb³⁺- Íon chumbo
pH-potencial hidrogeniônico
S-Enxofre
Zn²⁺ -Íon Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	19
3.1 Laguna da Jansen	19
3.2 Os Contaminantes da qualidade da água	23
3.3 Família <i>Enterobacteriaceae</i>	24
3.4 <i>Escherichia coli</i>	26
3.5 <i>Citrobacter</i>	27
3.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.7 Resistência de bactérias a antibióticos.....	32
3.8 Resistência a metais pesados.....	34
3.9 Metais pesados.....	37
3.10 Cobre.....	39
3.11 Chumbo.....	42
3.12 Biorremediação	43
4 MATERIAL E MÉTODO.....	46
4.1 Coleta e preparo das amostras.....	46
4.1.2 Amostras de sedimento.....	46
4.1.3 Amostras de peixes	47
4.1.4 Preparo das amostras.....	47
4.1.5 Isolamento e identificação bioquímica das enterobactérias	47
4.1.6 Isolamento e Identificação bioquímica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	48
4.2 Suscetibilidade pelo método de microdiluição em ágar	48
4.3 Determinação da concentração mínima inibitória em caldo.....	50
4.4 Determinação da Biomassa e pH.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Susceptibilidade dos isolados da água frente ao cobre nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.....	52
5.1.2 Susceptibilidade dos isolados da água frente ao chumbo nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.....	53
5.2 Suscetibilidade de enterobactérias isoladas do peixe frente ao metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.....	54
5.2.1 Suscetibilidade de enterobactérias isoladas do peixe frente ao metal chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.....	56
5.3 Suscetibilidade dos isolados do sedimento frente ao metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.....	57
5.3.1 Suscetibilidade dos isolados do sedimento frente ao metal chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.....	59
5.4 Comparações das estirpes da água, sedimento e peixe isolados da laguna da Jansen frente ao metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.....	60
5.5 Suscetibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas da laguna da Jansen frente ao metal pesado cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.....	62

5.6 Suscetibilidade de Pseudomonas aeruginosa isoladas da laguna da Jansen frente ao metal pesado chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.

65

5.7 Pigmento das Pseudomonas aeruginosa no meio de ágar nutriente com os sais dos metais de cobre e chumbo.....67

5.8 A influência do pH na produção de biomassa de Enterobactérias e Pseudomonas aeruginosa69

5.9 Biomassa das bactérias.....72

6 CONCLUSÃO75

REFERÊNCIAS76

ANEXOS 100

1 INTRODUÇÃO

O ecossistema aquático é considerado, dentre os ecossistemas, o mais suscetível à poluição. A deterioração da qualidade da água está comumente associada à emissão indiscriminada de agentes poluidores, tais como efluentes domésticos, industriais ou agrícolas sem o devido tratamento, causado pelo crescimento urbano desordenado no entorno da biota aquática. Este ambiente conseqüentemente pode conter metais pesados, misturas tóxicas e uma variedade de outras substâncias (ARAÚJO et al., 2001; MORAES, JORDÃO, 2002).

Tradicionalmente, no Brasil, o controle da qualidade da água sempre esteve relacionado à eliminação de bactérias e outros microrganismos, e boa parte da matéria orgânica que contribui para a formação das vazões esgotáveis, é composta por um extenso número de microrganismos provenientes do sistema digestório humano e de outros animais de sangue quente (RUMMENIGGE, 2013; GERMANO; GERMANO, 2013).

Os organismos patogênicos são componentes normais de todos os ecossistemas, entretanto a contaminação microbiológica por bactérias fecais subsequentes à atividade antropogênica é considerada uma questão crucial. Por este motivo, existe uma forte demanda por monitoramento da qualidade da água. Logo, o estudo microbiológico das águas urbanas é indispensável, pois fornece informações sobre os impactos da poluição, a presença de riscos à saúde humana ou o potencial de conseqüências a longo prazo para esses ecossistemas e para as pessoas que deles dependem (BAYOUMI HAMUDA, PATKO, 2012; MCLELLAN et al., 2015).

A água contaminada por organismos patogênicos, provenientes de fezes de humanos e animais, pode ser fontes de transmissão de diversas doenças (BRASIL, 2006). Por isso, indicadores microbiológicos têm sido utilizados para verificar a existência de poluição. O grupo dos coliformes é um dos principais indicadores utilizados para avaliar a qualidade da água, entre eles incluem-se espécies do gênero, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*, esta última, é o microrganismo indicador de contaminação fecal mais utilizado no mundo (FORSYTHE, 2002).

A bactéria *E. coli* pertence ao grupo das enterobactérias que são bastonetes gram-negativos, aeróbios em sua maioria, que constituem os principais componentes da flora intestinal humana normal, sua presença é relativamente incomum em outros locais do organismo humano (MURRAY et al., 1992).

Segundo Costa et al. (2014), ao isolarem essa espécie de enterobactéria das águas salinas do Complexo Portuário de São Luís - MA, observaram que ela possui uma ampla adaptação e sobrevivência em diversos ambientes, devido a sua versatilidade metabólica.

Estudos alternativos demonstram que por esse microrganismo sofrer alterações metabólicas por fatores externos do ambiente (físico-químicos e clima), não são considerados bons indicadores para avaliar a qualidade da água. Portanto, faz se necessário o uso de microrganismos alternativos, tais como: *Aeromonas*, *Cloristridium perfringens*, *Vibrio*, *Pseudomonas aeruginosa* (NASCIMENTO, 2004; BASSO,2006; MARTINS,2009; GONZALEZ et al.,2010).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria patogênica gram-negativa e causa diversas lesões em seres humanos, bem como, está associada a causas de infecções hospitalares, além de apresentar resistência aos desinfetantes usados na limpeza hospitalar, o que dificulta seu controle nesses ambientes (GOUVEIA, 2007).

Outro fator preocupante é a disseminação de bactérias resistentes a fármacos comerciais (anestésicos, antibióticos, anti-inflamatórios, depressivos e hormônios) que ocorre devido ao contato de efluentes domésticos contendo resíduos de antimicrobianos, que apresentam uma boa estabilidade quando expostos ao ambiente, contribuindo portanto para o aumento da resistência de microrganismos já que favorece a transferência de genes entre bactérias (GIL, MATHIAS 2005;FENT et al .,2006).

Portanto, a resistência a antimicrobianos é uma ameaça aos países que buscam um desenvolvimento sustentável, sendo responsável por consequências clínicas e econômicas graves relacionadas ao aumento da morbidade e mortalidade. Como consequência, o uso inapropriado de antibióticos e principalmente a utilização em excesso contribui para um problema de saúde global: o aumento da frequência de

doenças infecciosas e emergentes devido à ineficácia dos antibióticos (LOUREIRO et al., 2016).

Segundo Lima et al (2011) as enterobactérias podem ser resistentes a metais pesados, pois a presença de um metal em um corpo d'água pode afetar os seres que ali habitam podendo ser tóxico ao organismo (podendo levar a morte ou comprometer suas funções metabólicas) ou pode ser bioacumulado, tendo seu efeito potencializado ao longo da cadeia alimentar.

Os metais estão distribuídos nos mais diversos meios tais como, solo, água, ar, sedimentos, organismos vivos e nas mais variadas propriedades e formas químicas (QUINÁGLIA, 2012) , a contaminação por metais ocorre em virtude dos despejos industriais em efluentes líquidos e solo, e através do destino incorreto do lixo em geral com impactos eutróficos severos sobre a fauna, a flora e aos seres humanos (RATTNER 2009) .

A busca por métodos de tratamentos convencionais de sedimentos, solo e água contaminados por metais pesados podem ser dispendiosos e ter baixa produtividade, além de possibilitar impactos ao ambiente devido à geração de resíduos .Entretanto, um dos tratamentos promissores é a biorremediação que se caracteriza por ser um processo em que se utilizam microrganismos autóctones sem qualquer interferência de tecnologias ativas (HAKEEM, 2015).

A biorremediação pode ser definida como um processo biotecnológico na qual se utiliza o metabolismo de microrganismos para a eliminação rápida de poluentes aquáticos como metais pesados, reduzindo a concentração a níveis aceitáveis, transformando-os em compostos de baixa toxicidade. Esses microrganismos podem adsorver estes metais a componentes presentes na superfície da parede celular, processo chamado de biossorção. As bactérias também podem bioacumulá-los em organelas ou ligá-los a proteínas no interior do seu material celular (YAKUBU 2007; MELO; AZEVEDO ,2008).

A localização geográfica da Laguna da Jansen contribui para a contaminação da água por enterobactérias e outros patógenos, visto que no entorno desta ocorrem lançamento de resíduos sólidos e efluentes domésticos. Diante disto propõe se o estudo para a determinação do perfil de resistência destes microrganismos a metais

pesados (Cobre e Chumbo) a fim de contribuir para o controle destas bactérias e avaliar o seu potencial para a biorremediação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do ambiente da Laguna da Jansen frente aos metais cobre (Cu) e chumbo (Pb).

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o crescimento de enterobactérias e *Pseudomonas* sp. frente a 3 diferentes concentrações de metais pesados em ágar;
- Determinar a concentração inibitória mínima de espécies de bactérias tolerantes a metais pesados;
- Avaliar a produção de biomassa das cepas de bactérias tolerantes a metais pesados;

Determinar o pH do meio de crescimento das cepas das bactérias tolerantes a metais pesados

3 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

3.1 Laguna da Jansen

Uma das regiões de maior relevância em nosso país é a zona costeira brasileira que possui 8.500 km de extensão. Considerado um local frágil, constitui-se como um ecossistema peculiar, com extrema beleza natural e, por isso, é extremamente cobiçada. Já que é um privilégio residir e apreciar a beleza da paisagem natural, por esses atributos é utilizada como recurso para a especulação imobiliária e turismo, por isso deve ser legalmente protegida. Deste modo, muitas unidades de conservação foram criadas a fim de defender o local e determinados ambientes nelas existentes (FREITAS,2019).

A zona costeira é constitucionalmente considerada como patrimônio nacional, devendo sua proteção mediante lei, nos termos do art. 225, § 4º, da Lei Maior, o que não significa ser patrimônio federal. Trata-se, na verdade, de patrimônio da Nação, de todos os entes federados, de todos os cidadãos. Essa mesma disposição constitucional determina que a utilização se fará na forma da lei, que, no caso da zona costeira, é a Lei Nacional de Gerenciamento Costeiro (nº 7.661, de 16.05.1988) (BRASIL,1995; FREITAS 2015).

As Lagoas costeiras são ecossistemas que advêm ao longo de todo o litoral brasileiro, apresentando todos os níveis tróficos logo um sistema autônomo, tendo variações de pequenas depressões de caráter temporário, preenchidas por água da chuva ou do mar, até corpos de água permanentemente alagados de grandes extensões. A sua principal característica é a colonização por macrófitas aquáticas. Sendo base desta cadeia, os detritos provenientes principalmente da biomassa morta destes vegetais (ESTEVES, 1998b).

As macrófitas aquáticas têm uma importância fundamental, devido a sua presença ser indicadora da qualidade da água, pois, estas plantas têm certas habilidades como a absorção de metais e o excesso de nutrientes. Por isso, são

eventualmente utilizadas no tratamento auxiliar de esgoto e na biomanipulação de recursos hídricos voltados para a qualidade de produção de peixe (PETR,2000).

As lagunas costeiras são um dos mais importantes ecossistemas aquáticos, pois servem como berçário e área de proteção para peixes jovens da região costeiras permitindo a continuação da espécie, tendo importância comercial e sustentam comunidades através de várias atividades, como a indústria e turismo (HERRERA-SILVEIRA et al., 2002). Ao longo do litoral brasileiro, as lagunas existentes são particularmente importantes para a pesca artesanal e atividades de lazer e turismo. (DIEGUES, 2002). No Brasil, são encontradas desde o Estado do Rio Grande do Sul até o Estado do Maranhão (THOMAZ et al., 2001).

O Parque Ecológico da “Lagoa da Jansen” , localiza se no município de São Luís do Maranhão que possui 986.826 habitantes, sendo a 16ª cidade mais populosa do Brasil. Ocupa a parte oeste da ilha do Maranhão, podendo ser localizado pelas coordenadas: 02°31'48” latitude sul 44°18'10” longitude oeste, e situa se na área do Golfão Maranhense (IBGE, 2000).

Há uma discussão entorno do termo lagoa, já que a água represada é salgada, o termo laguna é designado como uma feição geomorfológica, composta por água salobra e com uma via de comunicação com o mar de onde recebe aportes de água a cada fluxo da maré cheia (GUERRA, GUERRA, 2000).

A Laguna da Jansen encontra-se em região urbana, cercada pelos bairros São Francisco, Renascença I, Renascença II, Ponta d’Areia e Ponta do Farol. Nas áreas adjacentes, estão localizadas as praias de maior movimento de banhistas. No dia 23 de junho de 1988, foi criada a Unidade de Conservação Estadual denominada Parque Ecológico da Lagoa da Jansen, pelo decreto-lei nº 4878, visando à preservação de áreas de mangue ainda existentes (MARANHÃO, 1993).

Na década de setenta, era uma região estuarina coberta por manguezais e entrecortada pelos igarapés da Ana Jansen e Jaracati. Era notória a existência de mangues, apicuns, formações de transição e cursos d’água com extensão de 160m

hectares. Deste total, restam cerca de 150 ha, com profundidade média de 3,5 metros de lâmina d'água (MASULLO ,2009).

As primeiras alterações na área da laguna foi a ocupação desordenada das áreas de mangues do bairro da Ilhinha e dos conjuntos residenciais Renascença I e II e Ponta do Farol , continuadas com a construção da Avenida Maestro João Nunes em 1974 que causou a interceptação da rede da Av. Cel. Colares Moreira em 1969/1970 que não provocou tantos impactos para a descaracterização da área como a Avenida Maestro João Nunes que foi construída em 1974 que causou a interceptação da rede principal de drenagem que era o Igarapé da Jansen (MASULLO et al., 2014).

Durante o processo de construção da rodovia sobre o Igarapé da Ana Jansen, que se encontrava acima do nível da lâmina d'água, proporcionou a condição de armazenamento de água salgada permanente, originando a laguna, a troca de água nesse ecossistema ocorre somente nas marés de sizígia quando o nível da maré ultrapassa o piso da galeria, e na estação chuvosa, pois, o aumento do volume de água doce garante o fluxo em direção ao mar (MASULLO ,2009).

A lâmina d'água permanente cria um ambiente infra litoral com áreas não expostas às marés diminuindo a taxa de renovação da água. Estas condições favorecem a proliferação da macrófita aquática *Ruppia Marítima*, criando substrato para as algas cianofíceas, que a partir do aumento da decomposição passam a produzir gás sulfídrico, que somado à decomposição dos sedimentos do fundo da lagoa corrobora com o odor desagradável da laguna (MONTÃNO, 2002).

Segundo Araújo (2007) as ações de urbanização na Laguna da Jansen causaram modificações nos espaços permeáveis, inclusive nas áreas de manguezais, convertendo-os para locais de superfície impermeáveis, o que resultou no aumento de volume de escoamento superficial e da carga de poluentes, resultando em alterações nas características físicas, químicas e biológicas que acarretou no aumento do escoamento superficial e subseqüentes cargas de erosão e sedimentos às águas superficiais .

As alterações no fluxo da água, que são provocadas pelos mais variados tipos de degradação estética, paisagística e ambiental, proporcionam diversos prejuízos aos usuários da laguna, que são impedidos de utilizar o espaço para o lazer, atividades turísticas, comerciais e de usufruir da laguna para a pesca, por causa do aumento da mortandade dos peixes, que acaba por trazer investimentos financeiros significativos aos mais variados empreendimentos (RIBEIRO, 1988).

Os dados do LABOHIDRO (1998) demonstram que as espécies de peixes foram reduzidas pela metade em consequências da contaminação do parque ecológico. Antes dos processos de degradação, a laguna possibilitava a formação de meia centena de peixes, das quais algumas espécies (n=6), tinham importância comercial. Enquanto que, a maior parte da população que reside ou transita nas proximidades sente os efeitos adversos causados pela degradação do mangue. Foi constatado que há um grupo de pescadores artesanais que fazem o uso da pesca na laguna, e utilizam os peixes capturados como fonte de alimentação e o comercializam em pequena escala.

A Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 menciona que um corpo de água salobra destinado a proteger comunidades aquáticas (classe 1) não deve exceder o limite de 1000 coliformes fecais por 100 mL em 80% das amostras. No ano de 2018, o Ministério Público do Estado do Maranhão chegou a publicar o clipping no dia 04 de outubro de 2018 pela assessoria de comunicação anexou no seu documento dados do jornal O ESTADO, em que há descarga direta de cerca de 1000 pontos de esgoto na lagoa, demonstrando a preocupação por parte do ministério público do Maranhão (O ESTADO, 2018).

Segundo Siqueira (1995), foram encontrados valores altos de organismos mesófilos na água, indicando a contaminação. Diante disto, pesquisas mostram que a presença de bactérias mesófilas em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada. A elevada carga de resíduos líquidos provocou a eutrofização (LABOHIDRO, 1998.) Além disso, outros pesquisadores, estudando a qualidade físico química e microbiológica da Laguna da Jansen também constataram o

estado de poluição dessas águas (GOMES et al., 2000; SERRA et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2005).

A área da Laguna da Jansen possui altas concentrações de coliformes termotolerantes nas amostras de água analisadas e indicam o despejo de efluentes domésticos no corpo de água, que comprometem a qualidade ambiental do local. As alterações histológicas detectadas nas brânquias de peixes foram de primeiro e segundo estágio, causadas por contaminação ambiental de xenobióticos inespecíficos presentes no local (Pereira et al., 2014).

Figura 1.Laguna da Jansen



Fonte: <http://kamaleao.com/saoluis/4219/lagoa-da-jansen>

3.2 Os Contaminantes da qualidade da água

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a maior parte das doenças estão associadas a maior qualidade da água, por isso os problemas relacionados à qualidade da água têm despertado interesse no mundo todo. Vários são os parâmetros para avaliar a qualidade da água físicos e químicos (turbidez, teor de sais, condutividade elétrica, temperatura, odor, cor, sólidos, pH, alcalinidade, dureza, matéria orgânica e coliformes).

A água, devido as suas propriedades de solvente e à sua capacidade de transportar partículas, incorpora a si diversas impurezas, as quais definem a qualidade da água (VON SPERLING, 2005). Por isso, a qualidade das águas costeiras é regida por dois instrumentos legais: a Resolução CONAMA Nº 357/05 e CONAMA Nº 274/00, que definem as classes de águas seu uso e padrão de qualidade, os principais poluentes e a balneabilidade (BRASIL,2000; BRASIL, 2005).

O grupo de bactérias composto por espécies dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* são ótimos indicadores para avaliar se uma água apresenta contaminação por fezes humana ou de animais e a sua potencialidade para transmissão de doenças (VON SPERLING ,1995).

O grupo de coliformes totais constitui-se em um grande grupo de bactérias que têm sido isoladas de amostras de águas e solos poluídos ou não poluídos, já os termotolerantes são um grupo de bactérias indicadoras do trato intestinal humano e de outros animais, sendo a *Escherichia coli* uma das bactérias principais representantes pertencente a este grupo (AGUIAR,PINHEIRO 1999).

3.3 Família *Enterobacteriaceae*

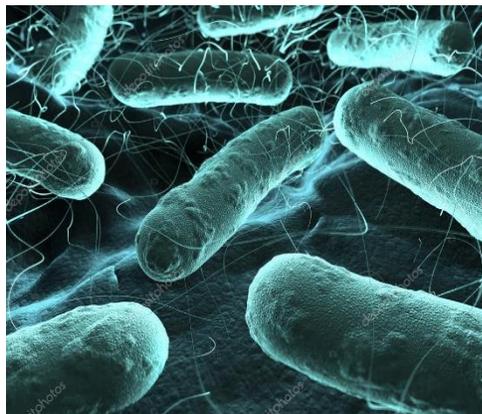
As *Enterobacteriaceae* são bactérias Gram negativas, com formato bacilar, apresentam ou não motilidade, dependendo da espécie, aeróbias ou anaeróbias facultativas, fermentam açúcares e crescem numa variedade de meios sólidos. Habitam comensalmente o trato gastrointestinal de vertebrados e estão entre os agentes patogênicos mais comuns que infectam seres humanos e animais. É também importante notar que, como residentes da microbiota intestinal, podem representar colonização ao invés de infecção verdadeira (PATERSON, 2012).

A família *Enterobacteriaceae* constitui-se como um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram negativas. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis. A maioria desses microrganismos se desenvolve bem à temperatura de 37°C, entretanto, algumas espécies são frequentemente mais ativas metabolicamente entre a temperatura de 25 e 30°C (HOLT et al. 1994).

Elas recebem esse nome devido ao local onde habitam no trato de digestivo, embora sejam bactérias onipresentes, são encontradas universalmente no solo, vegetação, frutas e água, além de fazer parte da flora intestinal normal de muitos animais (RODRÍGUEZ et al.,2009).

As enterobactérias são potencialmente patogênicas, inúmeras espécies causam doenças diarreicas, febre tifoide, disenteria bacilar e uma variedade de infecções extra intestinais, como, bacteremia, meningite, feridas, infecções do trato respiratório e urinário. Ainda são responsáveis por 50% de infecções nosocomiais, sendo as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia* as que causam um maior número de infecção (HOLT et al. 1994).

Figura 2.Enterobactérias



Fonte: <https://br.depositphotos.com/43434247/stock-photo-bacteria-under-microscope.html>

3.4 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, compreende as espécies *E. coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulneris*, sendo, a *E. coli* é a principal e a mais estudada (CAMPOS, TRABULSI, 2002). A *E. coli* é um bastonete curto, Gram-negativo, não formadora de esporos, medindo entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, podendo ser ou não móvel, e a maioria das estirpes são móveis, devido à existência de flagelos peritríqueos. A temperatura ótima de crescimento é de 35 a 37°C (BARNES et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005).

Esse microrganismo se caracteriza como anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo, capaz de fermentar o adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol, lactose, glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose, produzindo ácido e gás. Entretanto, a fermentação de arginina é variável (QUINN et al., 2005; ANDREATTI FILHO, 2007).

É encontrada em maior abundância no intestino grosso (cerca de 10^{12} bactérias), atua como comensal e impede a colonização do epitélio intestinal por patógenos. Coloniza animais e humanos logo após seu nascimento. O parto, principalmente o normal, é uma das fontes de colonização desses microrganismos por ter contato direto com a microbiota fecal da mãe (HOLT et al., 1994; PENNA; NICOLI, 2001).

No entanto, a *E. coli* pode se comportar como um microrganismo patogênico quando há a ingestão dessa bactéria através de água ou alimentos contaminados e/ou por cepas que utilizam fatores de virulência ou que produzem enterotoxinas, podendo causar doenças diarreicas, infecções urinárias e nosocomiais incluindo septicemia e meningite (SILVA; SILVA, 2005; SOUSA, 2006).

São reconhecidas algumas variantes de *E. coli* que adquiriram virulência, são elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e extraintestinal (EXPEC), etc.

(FRANCO et al, 2005; RODRIGUEZ, ANGELES, 2002). A *E. coli* faz parte do grupo dos coliformes fecais a 45°C e dentre as espécies de bactérias pertencentes a esse grupo é considerada o melhor indicador de contaminação fecal (OLIVEIRA et al., 2004).

Diversos fatores contribuem para sua disseminação no meio ambiente (água, solo, vegetação), ela é excretada nas fezes e pode sobreviver por semanas ou meses nas partículas fecais, poeira e água. Por isso, pode ser encontrada no intestino de aves saudáveis, no tálaro de granjas, água, ração, poeira. Isto ocorre devido a algumas habilidades como: utilização de vários materiais como fonte de nutrientes e crescimento acelerado (ANDRADE, 2005; SAVIOLLI, 2010).

Figura 3. *E. coli*



Fonte: <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/e-coli-bacteria-symptoms-infection-egypt-outbreak-treatment-explained-a8525486.html>

3.5 *Citrobacter*

Os microrganismos do gênero *Citrobacter* têm uma variedade de espécies que são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e são tipicamente móveis por meio de flagelos peritríticos, esse gênero foi proposto em 1932 por Werkman e Gille (1932). Antes de 1993, só existiam apenas três espécies que até então eram reconhecidas *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri* (*Citrobacter diversus*) e *Citrobacter amalonaticus*. O nome da espécie *C. koseri* foi aceito para substituir o nome *C. diversus* pela Comissão Judicial do Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática (WERKMAN; GILLEN, 1993).

No mesmo ano, classificou-se o gênero *Citrobacter* em 11 espécies, que foi realizada por hibridação do DNA, então foram classificadas em: *C.freundii*, *C.koseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii*, *C. rodentium*, *C. gillanii* e *C. murlinae* (BRENNER et al., 1993; SCHAUER et al., 1995; BRENNER et al., 1999).

O gênero *Citrobacter* ocorre nas fezes de humanos e animais, provavelmente como habitantes normais, frequentemente, isolado de espécimes clínicos como patógenos oportunistas podendo causar meningite neonatal, encontrado no solo, água, esgoto e alimentos, as espécies de *Citrobacter* crescem em vários meios de cultura, todas fermentam glicose com produção de gás. A maioria dos organismos são móveis e utilizam citrato (HOLT et al., 1994).

As espécies de *Citrobacter* são frequentemente encontradas na água, solo, vegetação, nos alimentos e no trato intestinal de animais e seres humanos. Muitas infecções por *Citrobacter* são adquiridas em ambientes hospitalares; contudo, podem também ser encontrados em outros ambientes. Estudos demonstram que a *Citrobacter* spp. pode representar de 3 a 6% de todas as *Enterobacteriaceae*, causando infecção nosocomial (LIN FY et al., 1987; LAVIGNE et al., 2007; JONES et al., 1998)

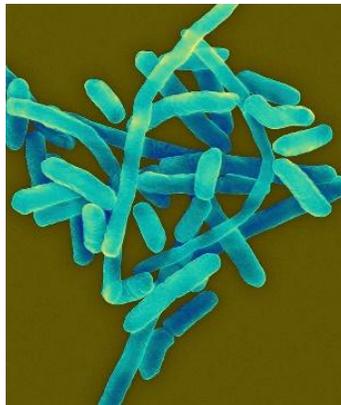
Em pacientes dos hospitais, a bactéria pode ser transmitida verticalmente da mãe para o filho ou horizontalmente de portadores ou outras fontes hospitalares. A infecção pode surgir como casos esporádicos ou surtos nosocomiais (LIPSKY et al., 1980; DORAN, 1999).

A *C. koseri* pode causar uma forma incomumente grave de meningite neonatal, associada à encefalite necrosante e abscessos cerebrais, além de um amplo espectro de infecções do trato urinário, respiratório, em feridas, nos ossos, peritônio, endocárdio, meninges e na corrente sanguínea no ser humano, sendo o do sistema urinário o mais comum, seguido pelo abdômen, pele /tecidos moles (incluindo infecção do sítio cirúrgico) e pneumonia (GRAHAM, BANDA, 1981; LIPSKY et al., 1980; KLINE, 1988; DORAN, 1999; SAMONIS et al., 2009).

Diversas espécies podem ser distinguidas por testes bioquímicos, os critérios utilizados para interpretar os testes de suscetibilidade antimicrobiana seguem o padrão do grupo *Enterobacteriaceae*. As espécies de *Citrobacter* demonstram diferentes perfis de suscetibilidade antimicrobiana como a *C. freundii* que é geralmente muito mais resistente a agentes antimicrobianos do que *C. koseri* (*C. diversus*). (JONES et al., 1973; LUND et al., 1974).

A bactéria *C. freundii* tornou-se mais resistente a muitos agentes antimicrobianos, incluindo ampicilina e carbenicilina, de modo que a classificação das espécies por padrão de suscetibilidade a antibióticos não é mais válida (HOLMES et al., 1974; VAZ MARECOS et al., 2011).

Figura 4. *Citrobacter*



Fonte: <https://fineartamerica.com/featured/citrobacter-freundii-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>

3.6 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbio estrito Gram-negativo, oxidase positiva, móvel, apresentando um ou mais flagelos polares monotríquios. Quando é cultivada em meio sólido, apresenta três tipos de colônias: grandes, lisas com centro elevado e bordas lisas; planas ou pequenas, rugosas e convexas e as do tipo mucosa (HOLT, 1984; KONEMAN et al., 2001).

A origem do seu nome é a junção das palavras grega *pseudés* (falsa) e da latina *monas* (unidade). A designação *aeruginosa* é derivada da palavra latina *aeruginosus* que tem relação com a cor verde escura ou azul (PAPAVERO, 1994). Em meio sólido, a cor das colônias pode variar de acordo com o tipo de pigmento produzido, geralmente são azul-esverdeadas, mas podem ser marrom ou mesmo não produzir pigmento (FREITAS, BARTH, 2004). O odor da colônia é bem característico, adocicado e semelhante à uva (HPA, 2003).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é considerada oportunista, pois, pode ser encontrada em qualquer ambiente (*habitat*) como água, solo, ar, vegetação, sistemas de distribuição e o ser humano. Pode oferecer risco à saúde de indivíduos sadios ou a imunocomprometido (DUBOIS, 2001).

. A *P. aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo ubíquo de vida livre encontrado em ambientes úmidos, como água, solo, plantas e detritos. Ainda que raramente possam causar patologias em pessoas saudáveis, essas bactérias são uma grande ameaça a pacientes hospitalizados, particularmente aqueles com sérias doenças de base (DUBOIS, 2001).

A *Pseudomonas aeruginosa* produz um composto extracelular com fluorescência verde amarelada, chamado *pyoverdín*. Após diversos estudos, observou-se que este funciona como um sideróforo. O sideróforo é a capacidade que alguns microrganismos desenvolveram de transportar ferro (COX, ADAMS, 1985).

Estes microrganismos são constituídos por moléculas de baixa afinidade molecular que possuem elevada afinidade com o ferro. As bactérias, que podem desenvolver sideróforo, podem ser utilizadas em processos de biorremediação, nos quais os solos poluídos são descontaminados após o metal ser quelado com o sideróforo. A produção de *pyoverdín*, anteriormente chamada fluoresceína, é concomitante com a produção de outro sideróforo, a pochelina. portanto, a ligação do ferro e a estimulação do transporte bacteriano de ferro indicaram que a piroverdina pode funcionar como um sideróforo para *P. aeruginosa* (NEILANDS, 1995; BRAUD et al, 2009).

A *P. aeruginosa*, por ser um patógeno de origem não fecal, se propõe como microrganismo indicador da qualidade de águas recreacionais, pois as fontes de poluição não são resultantes apenas de contaminação fecal, tem-se outras origens, por exemplo: através da flora presente na urina, pele, nariz e garganta. De acordo com a Organização Mundial da Saúde-OMS, a *P. aeruginosa* não é transmitida apenas por ingestão de água contaminada e sim por contato (DAMSTRA, 2002).

Na Europa, a bactéria *P. aeruginosa* é utilizada, como padrão para avaliação e controle de qualidade de origem e processo de águas potáveis de mesa e minerais, águas tratadas, águas recreacionais, e principalmente de piscinas, assim como para a avaliação das condições higiênicas dos sistemas industriais (SANCHEZ; RUOCCO Jr., 2004).

A água fresca é o reservatório ideal para esse organismo (WHO, 2003), podendo habitar regiões superficiais a médias da zona limnética, e sobrevive por vários meses à temperatura ambiente (STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2002). A bactéria pode ser encontrada também no solo, plantas e dejetos (DUBOIS, 2001).

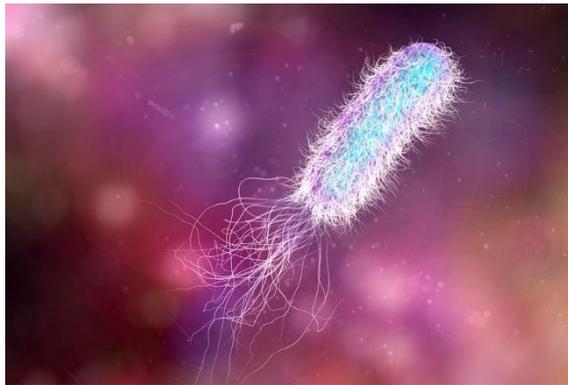
Entretanto, sua presença em hospitais, representa um grande fator de risco, pois, consegue sobreviver em superfícies de materiais inertes, além de ser resistentes a materiais de limpeza hospitalar, podendo habitar nas pias, equipamentos de ventilação, soluções detergentes, instalações de banheiro e até nas mãos dos profissionais de saúde (DUBOIS, 2001). A bactéria resiste também às altas concentrações de sais, corantes, antissépticos fracos e aos antibióticos utilizados com maior frequência (SHRIVASTAVA *et al.*, 2004)

Uma de suas principais características é sua versatilidade nutricional e metabólica. É capaz de utilizar diversos compostos orgânicos em meios desprovidos de fatores de crescimento e pode tolerar altas temperaturas como a 42°C, ainda que a faixa de crescimento ideal esteja compreendida entre 25 e 37°C (HOLT, 1994; TODAR, 2002). Na comunidade científica, esta bactéria causa preocupação por sua extrema versatilidade, poder de adaptação e resistência a vários ambientes e antibióticos (TAVARES, 2001).

Os pesquisadores Sanchez e Ruocco Jr. (2004) afirmam que a *P. aeruginosa* em altas concentrações é responsável por resultados falso-negativos das análises colimétricas, causando interferência ao grupo dos coliformes. Já Banning *et al.* (2003) observaram que a bactéria *P. aeruginosa* possui vantagem sobre *E. coli* e demais membros do gênero *Enterobacteriaceae*, representando, portanto, risco à saúde pública quando realizaram um estudo comparativo de microrganismos que crescem em comunidades mistas nos biofilmes de águas subterrâneas.

Diante disto, são necessárias mais pesquisas por métodos mais sensíveis e específicos para a detecção e identificação de *P. aeruginosa* em água e solo, para minimizar o risco e a transmissão de doenças e infecções em pessoas mais susceptíveis e ao público em geral (HARDALO; EDBERG, 1997).

Figura 5. *P. aeruginosa*



Fonte: <https://cosmosmagazine.com/biology/why-a-common-hospital-infection-is-so-hard-to-wipe-out>

3.7 Resistência de bactérias a antibióticos

Uma das maiores ameaças à saúde pública mundial e ao meio ambiente é a resistência de bactérias a antimicrobianos (HUANG *et al.*, 2012). A resistência antimicrobiana (AMR, da sigla em inglês para antimicrobial resistance) é um dos desafios aos sistemas de saúde contemporâneos. Pesquisas recentes estimam que podem haver 700 mil mortes anualmente causadas pela resistência de bactérias a antimicrobianos. De acordo com as estimativas, até 2050, a AMR poderá causar mais

mortes que o câncer, se não houver uma mudança de abordagem para conter o problema (O'NEILL, 2015).

Esse fenômeno atinge praticamente todos os antibióticos já utilizados. Por isso, são necessários estudos para compreender como ocorre a disseminação de resistência de antibióticos em microrganismos patogênicos e como se processa a seleção dos genes associados a essa evolução que confere resistência (BHULLAR et al., 2012).

O intestino do homem e dos animais servem como um reservatório, sendo um dos que mais contribui para que haja resistência de microrganismos Gram-negativo. Isto ocorre especialmente por pessoas ou animais que fazem tratamento com a utilização de antibióticos (WELLINGTON et al., 2013). Um fator preocupante a se considerar é o uso indiscriminado desses fármacos, podendo acarretar em efeitos colaterais preocupantes, como por exemplo a seleção de bactérias resistentes (RUPPÉ, LASTOURS, 2012).

Alguns estudos expuseram que o ambiente aquático, como por exemplo, (lagunas e lagos) é o mais propício para que ocorram os efeitos de toxicidade aquática, genotoxicidade, alterações endócrinas e troca de genes, conferindo resistência a microrganismos patogênicos frente a antibióticos. Isto ocorre devido à emissão de efluentes domésticos, hospitalares e industriais em ambientes aquáticos que contêm resquícios de antibióticos, contribuindo para a resistência desses patógenos aos fármacos (DAMSTRA et al., 2002; KIM et al., 2007; TAMBOSI et al., 2010; LESSA et al., 2011).

Um dos mecanismos de resistência de microrganismos mais importante é a degradação do antimicrobiano, que ocorre pela catálise de enzimas (ANVISA, 2014). O primeiro estudioso que observou a resistência natural de microrganismos aos antibióticos foi Alexander Fleming. Ao descobrir a penicilina em 1929, ele descreveu que as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* não foram mais inibidas pelo antibiótico, como eram anteriormente (BOSCARIOL, 2013).

A possível causa dessa resistência foi descoberta por Abraham e Chain, em 1940, que demonstraram em seus estudos que nos extratos de *Escherichia coli* há uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, a qual denominaram penicilinase (BOSCARIOL, 2013).

Os mecanismos de evolução podem ocorrer quando os genes de resistência fazem parte do código genético do microrganismo, ou adquirida. Quando os genes não estão presentes no código genético da bactéria, sendo a ela incorporada de diversas formas, como por um processo de mutações que ocorrem no microrganismo, durante seu desenvolvimento reprodutivo e que há alterações na cópia de sequência de bases que formam o DNA é uma forma de evolução adquirida (BOSCARIOL, 2013).

Outra causa é a incorporação, por transferência horizontal ou vertical dos genes causadores do fenômeno da resistência, na qual a transferência de genes horizontal pode ser de microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes (BAPTISTA, 2013).

Segundo Caumo et al. (2010) o resistoma é o conjunto dos genes de resistência de bactérias patogênicas a antimicrobianos e as que são utilizadas compreendem somente uma pequena fração dos genes múltiplos que codificam proteínas que tenham resistência ou que podem se ligar aos fármacos, tornando essas moléculas inativas.

Esses genes são a principal fonte externa de resistência a antibióticos, os principais mecanismos de resistência das bactérias a antibióticos são: alteração da permeabilidade, alteração do sítio de ação do antimicrobiano, bomba de *efluxo* e mecanismo enzimático (CAUMO et al., 2010).

3.8 Resistência a metais pesados

As bactérias, que possuem a capacidade de sobreviver a concentrações tóxicas de metais pesados, apresentam mecanismos genéticos específicos de resistência a esses metais, sendo isoladas de diferentes fontes ou ambientes (SILVER; MISRA, 1988; MINDLIN et al., 2001).

No meio ambiente (biota aquática ou solo), os metais pesados selecionam as espécies variantes com um maior potencial de resistência de forma semelhante à seleção de cepas aos antibióticos, uma vez que, ambos os genes de resistência estão ordinariamente localizados nos mesmos dados genéticos. Por isso, é relativamente corriqueira a associação de resistência ao metal e ao antimicrobiano em uma mesma cepa bacteriana (FOSTER, 1983; MCINTOSH et al., 2008).

Os microrganismos possuem várias vias de resistências, como transporte ativo de substâncias, bombas de efluxo, alteração da sensibilidade a íons metálicos em sítios específicos, extrusão por barreiras de permeabilidade, sequestro de metais pesados complexados e especiação de metais, isto ocorreu, devido à necessidade que estes bacilos tiveram para contornar o estresse por metais pesados, em retorno à pressão seletiva desses metais no seu habitat (BRUINS et al., 2000; LEVY, 2002; NIES, 2003).

A não susceptibilidade para com certos biocidas, conhecida como resistência bacteriana, vem se desenvolvendo em muitas bactérias Gram-negativas, como nas espécies de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e a família de Enterobacteriaceae. Esta resistência se dá por meio de plasmídeos codificados, nos cromossomos por meio de mutação ou ampliação dos genes endógenos e a associação a elementos de DNA como os transposons (MAILLARD, MOORE, PAYNE, 2004).

Matyar et al (2010) ao avaliarem cepas isoladas do Mar Mediterrâneo, observaram que 31.9% das *Pseudomonas* testadas no estudo foram resistentes a concentrações acima de 3,200 mg/L de cromo, e observaram que 54,3% dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas de biofilmes foram resistentes à concentração inibitória mínima (CIM) entre 800 a 3200 mg/L de cobre.

Já Shakoori e Muneer (2002), ao avaliarem microrganismos isolados de curtumes no Paquistão, observaram que 67% dos isolados toleraram concentrações de cobre superiores a 400 mg/L. Karbasizaed et al. (2003), observaram que cerca de 60% das bactérias de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, que foram isoladas de

infecções nosocomiais em um hospital na localidade de Isfahan/Iran foram resistentes à concentração de 1750 mg/L de cobre.

Hahn et al. (2015) ao avaliarem o perfil de resistência a metais pesados em microrganismos isolados do Rio dos Sinos, RS, Brasil, observaram que 44,39% dos microrganismos apresentaram CIM acima de 802,27 mg/L de níquel; 40,97% CIM acima de 509,24 mg/L do metal cobre e 12,92% dos microrganismos CIM acima de 707,04 mg/L de cromo. Ainda que as concentrações de metais na água estejam nos limites da legislação vigente, notou-se que, ao longo das coletas, houve microrganismos resistentes aos metais pesados.

Shakoori e Muneer (2002) ao estudarem bactérias isoladas de águas residuais de efluentes industriais no Paquistão, notaram que 100% de resistência a cromo hexavalente de concentrações de 280 até 400 mg/L. Já Sundar et al. (2011) testaram 46 microrganismos isolados na Bacia do Rio Palar/Índia e 40 desses foram resistentes a concentrações entre 100 até 500 mg/L de cromo trivalente; 5 resistentes a concentrações entre 500 e 1500 mg/L de cromo trivalente e um isolado com resistência superior a 1500 mg/L de cromo trivalente.

Os resultados do estudo Silva et al. (2003), demonstraram que a resistência ao metal pesado entre as bactérias é generalizada. As estirpes isoladas mostraram uma tolerância extrema (até 100mM) aos metais testados, tais como, Zn, Ni, Cd (exceto Cu). Silva (2011) ao estudar 91 cepas de bactérias que foram isoladas do processo de compostagem, demonstrou que 41,8% dos isolados foram resistentes ao cromo, 41,8% ao cobre, 94,5% ao zinco e 96,4% ao chumbo.

Portanto, as adaptações estruturais, fisiológicas e genéticas, bem como, na especiação dos metais para formas menos tóxicas de bactérias encontradas em água e solo poluídos é a forma que elas encontraram para sobreviver (WUERTZ, 1997).

3.9 Metais pesados

Os metais pesados são um grupo de elementos químicos que apresentam número atômico maior que 20 ou peso específico maior que 6 g.cm^{-3} (AGARWAL, 2009), portanto são oligoelementos com densidade relativamente elevada. São constituintes naturais da crosta terrestre, rochas, sedimentos, águas e em seres vivos de forma geral em baixas concentrações, geralmente em condições naturais. Eles não representam riscos para as plantas, animais e aos humanos (HOODA et al., 2008).

A realização de atividades antropogênicas como mineração, fundição e irrigação, além de outras atividades, efluentes industriais e o uso do lodo de esgoto e águas residuais para a irrigação, expõe os minerais metálicos a processos reativos naturais de oxidação, elevando a sua solubilidade e adsorção, impactando o meio ambiente e a qualidade dos ecossistemas devido, à incorporação destes metais pesados, trazendo prejuízos para o meio ambiente e à saúde humana (COSTA et al., 2004; KHAN et al., 2011; ABIOYE, 2011; MARTIN et al., 2012; HAKEEM et al., 2015).

Os elementos que estão no grupo dos metais pesados são: arsênico, cobre, chumbo, cádmio, mercúrio, zinco entre outros. Estes são os ecologicamente mais significativos. O intemperismo das rochas e atividades vulcânicas faz com que os metais liberados fiquem suspensos na atmosfera e posteriormente, são arrastados pelas massas de ar, chegando à água pela deposição e pela chuva (KHAN et al., 2011; AGARWAL, 2009; THAKUR, 2006).

Os metais pesados não são biodegradáveis e, por isso, apresentam uma tendência à bioacumulação, permanecendo ao longo do tempo nos diversos níveis tróficos no ambiente representando um risco a longo prazo (KONYA et al., 2005; LIAO et al., 2008).

Por isso, estes podem interferir no crescimento das populações microbianas e na atividade metabólica, como por exemplo, danos à estrutura da membrana celular e do DNA, alteração da especificidade de enzimas e na conformação do DNA e

rompimento de funções celulares e conseqüentemente, causa impactos sobre a diversidade microbiológica (BRUINS et al., 2000 ; ROANE et al., 2000).

Durante as duas últimas décadas, grande atenção tem sido dada à gestão da poluição ambiental e seu controle, devido aos materiais perigosos. Os metais pesados referem-se a um grande grupo que não são biodegradáveis como a matéria orgânica, portanto eles persistem no ambiente a longo prazo. Além disso, muitos são tanto industrialmente como biologicamente essenciais, mas tornam-se tóxicos com o aumento da concentração (THAKUR, 2006; HAKEEM et al., 2015; SHUKLA et al., 2011).

A contaminação no solo e na água ocorre pelo descarregamento de resíduos sem nenhum tipo de tratamento por inúmeras indústrias que são fontes para a realização das atividades ordinárias da agricultura causando riscos devido à adição destes metais pesados na cadeia alimentar dos humanos e animais (APPEROTH et al., 2010; BALIK et al., 2002).

Para analisar a mobilidade e disponibilidade do solo, são analisadas várias propriedades físico-químicas, como a dissolução, precipitação, adsorção-dessorção, troca iônica, pH e teor de matéria orgânica, garantindo a regulação do mesmo. Em alguns casos, pode ocasionar a perda total da fertilidade do solo, refletindo na estrutura da microflora no solo, a bioacumulação de metais em sedimentos marinhos e de solos. É importante para aumentar os níveis de concentração de partículas de metais em suspensão nos repositórios, como, por exemplo o cobre (HAKEEM et al., 2015; KHAN et al., 2011; SINGH et al., 2009).

Os metais pesados são os poluentes mais nocivos por causa da sua toxicidade aos seres humanos. Alimentos, água, ar ou adsorção pela pele e medicamentos são veículos para a entrada de metais pesados no ser humano. Estes metais trazem vários prejuízos à saúde humana como a alteração na função neurológica e na produção de neurotransmissores, deficiências cardiovasculares, influência nos sistemas endócrinos, imunológicos, gastrointestinal, reprodutivo e urinário (BHARTI, 2012; MANAHAN, 2010).

3.10 Cobre

O cobre é um elemento químico com o símbolo (Cu), pertencente ao grupo 11 (I-B) da tabela periódica de número atômico 29 e massa atômica 63,55 g/mol. É um Metal marrom avermelhado, dúctil, maleável, condutor de eletricidade e nobre, apresenta quatro estados de oxidação: metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^+), íon cúprico (Cu^{+2}) e o menos encontrado o íon trivalente (Cu^{+3}) (QUINÁGLIA, 2012; AZEVEDO, 2003).

Desde muito tempo, o cobre é conhecido pela humanidade (período neolítico). O homem utiliza o cobre combinado com outros metais ou puro. Na natureza, ele está presente como sulfeto, arsenito, cloreto, carbonato e na sua forma elementar, em sedimentos e partículas em suspensão, ocorre naturalmente em rochas, no solo, água e ar. Sua concentração na crosta terrestre é por volta de 60 mg/kg naturalmente, sendo por volta de 0,5 a 1000 mg/L em águas superficiais (QUINÁGLIA, 2012; APPEROTH et al., 2010; MANAHAN, 2010).

O termo cobre é de origem latina, cuprum, derivado da palavra cyprium, usada para designar a ilha de Chipre, que foi a principal fonte do metal no mundo antigo (Maar, 2008). O cobre pode ser encontrado em diversas atividades antrópicas que incluem mineração, indústrias de geração de energia, linhas de transmissão, enrolamento de motores, equipamentos hidráulicos, nas formulações de pesticidas para agricultura, algicidas, fertilizantes, tintas, corantes entre outros (PRASAD et al., 2006; SINGH et al., 2009; AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Esse metal é importante para o equilíbrio dos sistemas aquáticos em pequenas concentrações e é considerado um elemento fundamental para algumas atividades celulares da comunidade aquática, No entanto, pode tornar-se tóxico e, em organismos mais sensíveis, pode causar mortalidade ou estresse sub-letal, assim reduz a capacidade dos organismos aquáticos de competirem efetivamente no seu habitat (MAZON et al., 2000).

A toxicidade do sulfato de cobre (CuSO_4) na biota aquática varia de acordo com o organismo, levando se em consideração vários fatores: sensibilidade, estágio de

desenvolvimento, idade, tamanho, atividade, ciclo reprodutivo e *status* nutricional do organismo exposto (PELGROM, 1994).

O metal Cu é relevante para várias reações enzimáticas, no ser humano por exemplo, perfaz um oligoelemento da dieta, auxilia na síntese da hemoglobina, na absorção de ferro e no metabolismo do colágeno, entre outras funções. Já nas plantas é conhecido por ser um micronutriente essencial para a nutrição do vegetal, é necessário para a realização da atividade das metaloenzimas, ainda é um elemento chave na produção da fotossíntese e nos transportes de elétrons (ROANE, MILLER, 2005; PRASAD et al., 2006; QUINÁGLIA, 2012).

Alguns alimentos são fontes de cobre, tais como, a soja, castanhas, mexilhões, fígado, ostras, entre outros. O recomendado na dieta humana é de 1,5-2,0 mg por dia, pois, ele não se decompõe biologicamente tornando-se tóxico em altas doses (HAKEEM et al., 2015; MARTIN et al., 2012).

Em excesso, a concentração de cobre causa irritação no sistema nervoso central, distúrbios gastrointestinais, toxicidade hepática e renal. Provoca danos no DNA, nos lipídios e proteínas em animais, humanos e em certas condições nas plantas. Existem casos de pessoas que sofrem de doença de Wilson's, o cobre acumula-se principalmente no fígado (MARTIN et al., 2012; HAKEEM et al., 2015).

O CuSO_4 é utilizado contra a estratificação da água e no controle do crescimento acelerado de uma comunidade de algas (microalgas e as cianobactérias), em meio aquático, todavia pode apresentar efeitos negativos, como o acúmulo de matéria orgânica no sedimento, que estimula o metabolismo microbiano e a eliminação do oxigênio dissolvido (HANSON, STEFAN, 1984).

O pesquisador Mazon (1997), ao estudar sobre a bioacumulação de cobre, constatou que o íon acumula-se nas brânquias, no fígado, no rim, no intestino e no estômago de curimatá (*Prochilodus scrofa*) quando expostos durante 96 h, às concentrações de 0,025 e 0,029 mg/L.

Vários estudiosos demonstraram que a acumulação de cobre nos tecidos tem relação direta com a concentração deste no meio aquático, conforme tem sido observado em diversas espécies de peixes(MAZON et al., 2000; DIAS, 2003).

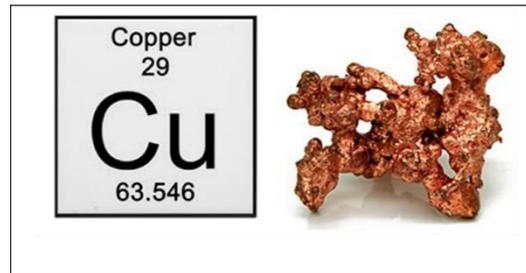
Zagatto (1995) observou o acúmulo de cobre nas vísceras de *Tilapia rendalli* e *Oreochromis niloticus*, da represa de Guarapiranga. Já Varanka (2001) verificou o acúmulo de cobre no fígado de carpas (*Cyprino carpio*) e Pelgrom et al.,(1995) estudou o acúmulo de metais em girinos de *Rana catesbeiana*, Mazon et al., (2000) notaram que o rim e o fígado são os locais de maior acumulação das espécies de peixes (MAZON et al., 2000).

O sulfato de cobre é um irritante gástrico em humanos cuja ingestão desencadeia emese quase imediata de coloração azul-esverdeada, reduz a quantidade de cobre residual disponível para a absorção. Após a ingestão exasperada de sulfato de cobre que excede aproximadamente 1 grama, ocorrem manifestações sistêmicas de intoxicação, como: ulcerações, hemorragia da mucosa gastrintestinal, hemólise aguda e hemoglobinúria, necrose hepática, nefropatia com azotemia e oligúria, cardiotoxicidade (hipotensão, taquicardia), taquipneia, rabdomiólise e manifestações do sistema nervoso central (BARCELOUX, 1999).

A presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas na corrente sanguínea caracteriza-se como um estado infeccioso generalizado(sepctemia), a invasão transmural destas bactérias no aparelho lesado pode trazer complicações ao quadro de evolução do paciente intoxicado por cobre (LEHNINGER, 2002).

Segundo Porto (2005), a intoxicação aguda que ocorre pelo sulfato de cobre é rara e acidental, a intoxicação manifesta-se por náuseas, vômitos, diarreia, anemia hemolítica e, nos casos mais graves, insuficiência renal, hepática e coma.

Figura 6. Cobre



Fonte: pt.wikipedia.org

3.11 Chumbo

O **chumbo derivado** do latim *plumbum* é um elemento químico de símbolo **Pb**, e número atômico 82, com massa atômica igual a 207,2 u, pertencente ao grupo 14 da tabela periódica, é um metal cinza azulado com uma alta densidade ($11,48 \text{ g mL}^{-1}$). Dissolve-se facilmente em solução de concentração média de ácido nítrico (8M), produzindo os íons chumbo II, e à temperatura ambiente encontra-se no estado sólido (VOGEL,1981).

O chumbo ocorre naturalmente, entretanto raramente é encontrado na sua forma natural, habitualmente encontra-se combinado com outros elementos formando compostos de chumbo, desta forma consegue tornar-se mais estável e acumula-se no ambiente. Podendo ainda existir em duas formas: orgânica e inorgânica (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2007).

Segundo Klassen (2008), o chumbo inorgânico corresponde à forma predominante, em que o chumbo se encontra tanto no ambiente como no solo, tintas antigas, gasolina e outros produtos. Já o chumbo orgânico é a forma menos comum, entretanto é a mais tóxica, devido à quantidade que o corpo consegue absorver. Por isso, o tempo de exposição ao chumbo orgânico deve ser levada a sério.

O chumbo, é um elemento tóxico, e devido seu largo emprego na indústria (petrolífera, de tintas, corantes, cerâmica e bélica, entre outras), torna-se um meio de contaminação para o meio ambiente especificamente no solo, água, no ar, por conta

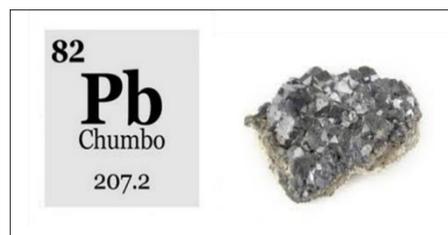
da emissão de fumaça por veículos automotores e indústrias, e no ser humano pela ingestão de alimentos sólidos e líquidos (LARINI, 1987; NRIAGU, 1988).

A toxicidade do Pb, interfere em funções celulares, por meio da formação de complexos com ligantes como enxofre, fósforo, nitrogênio e oxigênio (S, P, N e O), o metal traz casos críticos ao sistema nervoso, para a medula óssea e aos rins, devido à desmielinização e à degeneração dos axônios, prejudicando funções psicomotoras e neuromusculares, tendenciando a implicações como: irritabilidade, cefaléia, alucinações, interfere em várias fases da biossíntese do heme, e contribui para a manifestação de anemia sideroblástica (SILVA, MORAES, 1987) .

O metal Chumbo contribui para alterações de processos genéticos ou cromossômicos, inibindo a restauração do DNA e proporcionando a formação de câncer (LARINI, 1987; NRIAGU, 1988; OGA, 1996).

Estudos sobre a toxicidade do chumbo na infância revelaram que estes podem ter efeitos permanentes, trazendo como consequência diminuição nos quocientes de inteligência e deficiência cognitiva. No processo de desenvolvimento de uma criança, o sistema nervoso pode ser afetado adversamente por valores menores do que $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, níveis que antes eram considerados seguros (LANPHEAR, 2000; GENNARO 2002).

Figura 7. Chumbo



Fonte: pt.wikipedia.org

3.12 Biorremediação

A biorremediação de modo geral pode ser definida como o uso de processos bioquímicos por meio da atividade de microrganismos, para degradar, transformar e/ou

remover contaminantes de uma matriz ambiental, como água ou solo, sendo que estas bactérias, fungos ou plantas podem estar presentes no local contaminado de ocorrência natural/nativos ou ser adicionados/cultivados (BERNOTH et al., 2000).

Geralmente, os microrganismos mais utilizados para biorremediação são as bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As bactérias são as mais empregadas e, por isso, são elementos de grande importância em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. São importantes, em função de seus efeitos bioquímicos que possibilitam a destruição e a transformação de contaminantes potencialmente perigosos em compostos menos danosos ao ser humano e ao meio ambiente (NRC, 1993).

A interação entre microrganismos e metais pesados advém desde o início da vida no planeta, há aproximadamente 4 bilhões de anos, o que permitiu a evolução de sistemas biológicos das bactérias conferindo resistência e permitindo a sobrevivência em ambientes contendo elevadas concentrações de metais. Desta forma, o sucesso da técnica de biorremediação depende dos microrganismos que são resistentes e tolerantes, capazes de manter suas funções metabólicas diante destes metais (VALLS et al., 2002; SILVER, PHUNG, 2005).

Segundo Hutchinson e Symington (1997) a exposição prolongada aos metais impõe uma pressão de seleção que favorece a proliferação de microrganismos que toleram metais. Deste modo, faz-se necessário o isolamento destes microrganismos em áreas contaminadas, devido à pressão que o meio exerce nas comunidades microbianas, promovendo uma espécie de seleção natural (LIMA ,2012; SILVA et al.,2012).

A entrada do metal pesado na célula pode ocorrer por duas vias, uma inespecífica e outra de grande especificidade (BIONDO, 2008). A primeira por via de um gradiente quimiosmótico da membrana citoplasmática (transporte passivo), e a segunda envolve hidrólise de ATP (transporte ativo) (NIES, SILVER, 1995).

Muitos são os mecanismos que foram desenvolvidos para a resistência e tolerância de bactérias de metais pesados, destacam-se a bioabsorção, precipitação, biomineralização, produção de sideróforos, biossurfactantes e proteínas ligantes, que podem sobrepor-se na aquisição de metais pesados presentes no meio (CAMARGO et al., 2007).

Já os processos de biorremediação, podem ser classificados em dois grupos: o primeiro grupo explora as atividades enzimáticas metal-redutase das bactérias (redução direta) e o segundo, envolve a utilização de sulfeto de hidrogênio, produzido biologicamente para reduzir ou precipitar metais (redução indireta) (BRUSCHI, GOULHEN, 2007).

No caso das bactérias Gram negativas, por exemplo, a entrada de cátions metálicos divalentes (Mn^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Mi^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2}) ocorre passivamente pelo sistema de incorporação de Mg^{+2} (MIT), devido à similaridade estrutural (NIES, 1999).

Para haver a homeostase das bactérias o processo deve ser bem controlado, esta captação de íons pela célula microbiana ocorre por meio do transporte ativo realizado pelas ATPases, que são proteínas que fazem o transporte de metais pesados para o lado de fora da membrana celular bacteriana e com função de gerir resistência aos metais pesados (NIES, SILVER, 1995; RENSING et al., 1999).

Essas proteínas transportadoras impedem a acumulação dos íons de metais tóxicos, como o Pb^{+2} , Cu^{+} , Ag^{+} , Zn^{+2} e Cd^{+2} (NIES, 1999). No entanto, fatores como o pH, temperatura e concentração de poluente afetam o metabolismo microbiano e promovem ou inibem a atividade enzimática (WHITELEY, LEE, 2006; RODRIGUEZ, MONTELONGO et al., 2006).

Vários trabalhos têm demonstrado a influência de fatores ambientais na resistência e remoção de metais por isolados bacterianos resistentes (SILVA et al., 2009; ANDREAZZA et al., 2010; SANUTH et al., 2010; GIONGO et al., 2010;

CHATTERJEE et al.,2012; TURGAY et al .,2012; ZHANG et al .,2012; ANDREAZZA et al.,2013).

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga nos Laboratórios do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA).

4.1 Coleta e preparo das amostras

Para a coleta dos matérias na laguna da Jansen foi solicitado uma autorização no site do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, através do sistema de autorização e Informação de Biodiversidade – SISBIO, acessando os serviços de licenciamento ambiental federal gerando assim um código de autorização Nº 65972-1.

4.1.1 Amostras de água

As amostras foram coletadas em cinco pontos diferentes na laguna da Jansen no período de fevereiro a novembro de 2018. As coletas foram realizadas a uma profundidade mínima de 30cm, utilizando um frasco (esterilizados) de 500 mL, após as coletas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo trituradas e posteriormente foram transferidas para o PCQA-UFMA (Rodrigues Júnior; 2019).

4.1.2 Amostras de sedimento

As amostras foram coletadas em três pontos da laguna da Jansen sendo um localizado na região central e os outros dois próximos a áreas urbanas, usando uma draga metálica cerca de 500g de sedimento foram coletadas e armazenadas em recipientes higienizados de plástico (Rodrigues Júnior; 2019).

4.1.3 Amostras de peixes

Segundo Rodrigues Júnior, (2019), as coletas de peixes foram realizadas no período de 4 e 5 horas da manhã na Laguna da Jansen entre os meses de fevereiro a dezembro de 2018, sendo capturadas 4 espécies Tainha (*Mugil incilis*), Urubarana (*Albuba vulpes*), Tilápia (*Oreochromis urolepis*) e Pirapema (*Megalops atlanticus*).

4.1.4 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras, realizou-se uma diluição de proporção de 1:10 para as amostras de sedimento e peixe em uma solução salina a 0,85 % de cloreto de sódio (NaCl), sendo retiradas 10 gramas de amostra e transferidos 90 ml do diluente. Para o preparo dos peixes retirou-se as escamas e vísceras e com o auxílio de uma faca estéril cortou-os em forma de filé, às amostras de água foram inoculadas diretamente nos meios de cultura devidamente esterilizados (Rodrigues Júnior; 2019).

4.1.5 Isolamento e identificação bioquímica das enterobactérias

A quantificação foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos. Para isso, foi inoculada alíquotas de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL das amostras, em três séries de cinco tubos contendo caldo Lactosado em concentração simples e duplas com tubos de Durham invertidos. Após a incubação por 24 a 48 horas a 35°C na estufa, os tubos que apresentaram turvação e gás no tubo foram considerados positivos, transferiu-se alíquotas dos tubos positivos para o caldo EC com o auxílio da alça de níquel cromo, posteriormente foram incubados em banho maria a 45°C por um intervalo de 24 a 48 horas os que apresentaram turvação e produção de gás foram considerados positivos (Rodrigues Júnior; 2019).

Após utilizou-se a técnica de estrias por esgotamento com o auxílio da alça de níquel cromo no ágar eosina azul de metileno (EMB), as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas na estufa. As colônias negras com brilho metálico foram repicadas em tubos contendo ágar triptona de soja (TSA).

Posteriormente foram incubadas a estufa a 37°C por 24 horas para a identificação das cepas de realizou-se o teste de bioquímicos utilizando o sistema

Bactray para bacilos Gram -negativos (Laborclin,Paraná, Brasil),os testes realizados incluíram o teste IMVIC (Indol,caldo Vermelho de Metila e Citrato),segundo a metodologia descrita no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (BERGEY;KRIEG;HOLT,1994).

Já as cepas que não foram identificadas por os testes já descritos foram submetidas ao sistema Bactray com o preparo de uma suspensão bacteriana em água estéril com culturas ativas de bactérias de em 24 horas e distribuídas nos conjuntos de Bactray I e II sendo 20 provas no total (Rodrigues Júnior; 2019).

4.1.6 Isolamento e Identificação bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa*

A quantificação foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos. Para isso, foi inoculada alíquotas de 10 mL, 1mL e 0,1mL das amostras, em três séries de três tubos contendo caldo Asparagina em concentração simples e duplas. Após a incubação por 24 a 48 horas a 35°C na estufa, os tubos que apresentaram fluorescência com coloração esverdeada na presença de luz ultravioleta foram considerados como positivo.

Os tubos foram retirados alíquotas com uma alça de platina e inoculou-se em tubo contendo caldo acetamida, encubou-se os tubos em uma estufa a 35°C de 24 a 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, os tubos que apresentaram coloração rosa foram considerados *Pseudomonas* (Rodrigues Júnior; 2019).

4.2 Suscetibilidade pelo método de microdiluição em ágar

Neste trabalho foram selecionados 163 isolados, sendo 131 cepas de enterobactérias (70 isoladas da água,34 do sedimento, 27 do peixe) e 32 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, e analisou se a tolerância destes frente a sais de metais pesados de CuSO_4 e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ pela técnica de microdiluição em ágar.

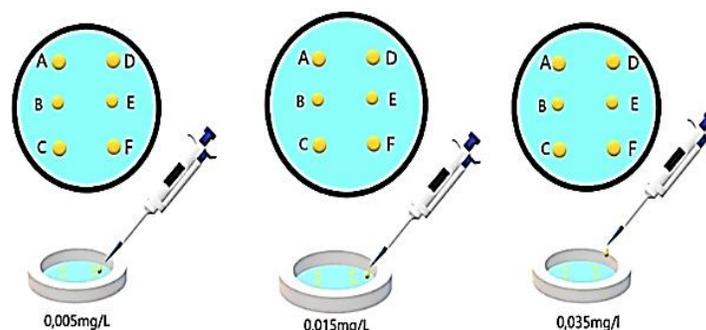
Todos os isolados identificados pertencentes a família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas aeruginosa*, foram submetidos à variadas concentrações de chumbo e cobre, para verificar a suscetibilidade destas, neste experimento as

concentrações tiveram como padrão as concentrações permitidas pela Resolução 357/2005 do CONAMA que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. A concentração máxima aceitável de chumbo e cobre é de 0,001 e 0,005 mg/L. converteu-se o valor para grama e utilizou-se como padrão mínimo o valor de 0,5 g/L. Este valor foi empregado no método de microdiluição em ágar além do triplo do valor máximo permitido (1,5 g/L), e concentração máxima de (3,5 g/L) .

Determinou-se a tolerância dos isolados da laguna da Jansen (*enterobacterias* e *Pseudomonas*), frente a sais de metais pesados pelo método de microdiluição em ágar frente a três concentrações distintas (0,5 g/L, 1,5 g/L e 3,5g/L) dos metais Cu e Pb, conforme metodologia adaptada do CLSI (2011) e Farias (2016) .Os seguintes sais metálicos foram utilizados: sulfato de cobre CuSO_4 e nitrato de chumbo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, todos os sais metálicos foram adquiridos à MERCK.

Alíquotas de 10 μL dos isolados foram depositadas de forma pontual com o auxílio de uma micropipeta na superfície de ágar nutriente suplementado com as diferentes concentrações de cobre e chumbo. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Transcorrido o período de incubação, foi avaliado o crescimento celular dos isolados nas diferentes concentrações dos metais cobre e chumbo. Os isolados que apresentarem crescimento serão classificados como bactérias tolerantes, já os que não apresentaram crescimento, ou que houver menor desenvolvimento na região da placa serão classificados como susceptíveis.

Figura 8. Suscetibilidade pelo método de microdiluição em ágar.



Fonte: o autor 2019

4.3 Determinação da concentração mínima inibitória em caldo.

A determinação da concentração inibitória mínima foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo com base na metodologia adaptada do CLSI (2011) e Nascimento et al. (2010). Neste ensaio, selecionaram-se 6 cepas de espécies de enterobactérias (*E. coli* e *Citrobacter diversus*) e 3 de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água, sedimento e peixe, totalizando 9 cepas.

As cepas foram ativadas em caldo nutriente, com crescimento de 24 horas e posteriormente, transferidas em alíquotas de 10 μ L para tubos eppendorffs contendo 1 mL do caldo nutriente enriquecido com diferentes concentrações de cobre (1,5 g/L) e chumbo (3,5 g/L), incubaram-se os tubos em uma estufa a 37°C por 48 horas.

Para controle negativo, utilizou-se o meio de cultura contendo o metal sem inoculação. Como controle positivo, foi utilizado o meio de cultura inoculado com as bactérias sem metal. Posteriormente, os tubos que apresentaram turbidez foram considerados positivos para o crescimento da bactéria e selecionados para a determinação da biomassa e pH. A concentração que for capaz de interromper o crescimento da bactéria (meio sem turvação) foi considerada a concentração inibitória mínima deste metal, em relação ao microrganismo avaliado.

Figura 9. Microdiluição em caldo

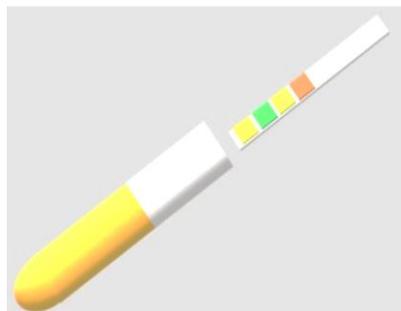


Fonte: o autor 2019

4.4 Determinação da Biomassa e pH

A determinação da biomassa e pH foi realizada após a incubação dos tubos durante 48 horas a 37°C. Os que apresentaram turbidez, portanto foram considerados positivos. Mediu-se o pH para cada amostra. Logo após, pesaram-se os tubos eppendorffs vazios, anotou-se, e logo após colocou-se 1 mL do material com os isolados da bactéria, e transferiu-se os tubos contendo a amostra para a centrífuga por cerca de aproximadamente 15 minutos para a deposição da biomassa, descartou-se o meio líquido depois os eppendorffs abertos foram colocados em um frasco fechado contendo sílica e algodão para a estufa de secagem durante 24 horas a 35 °C, depois pesou-se o eppendorff com amostra e calculou-se conforme a equação 1: $\{ Biomassa = [(eppendorff + amostra) - (eppendorff \text{ vazio})] \}$ (Equação 1).

Figura 10. Medição de pH das 9 amostras



Fonte: o autor 2019

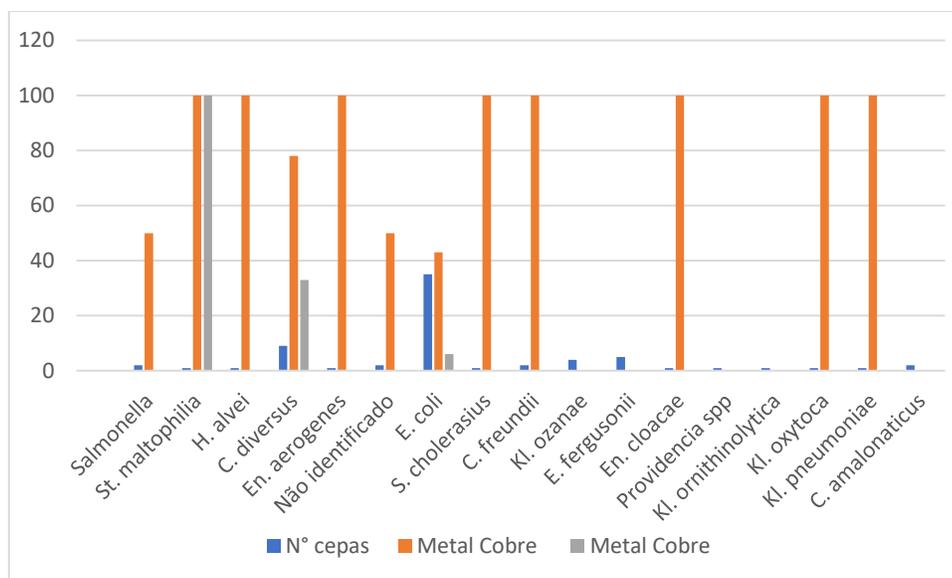
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Susceptibilidade dos isolados da água frente ao cobre nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.

Quanto a sensibilidade das estirpes isoladas da água da Laguna da Jansen, ao cobre nas concentrações de 3,5 g/L 53 % (n=37) das estirpes se apresentaram resistentes ao metal, na concentração de 1,5 g/L 91 % (n=64) das enterobactérias demonstram se resistentes ao metal pesado sensibilidade ao metal, já na concentração de 0,5 g/L todas as cepas foram resistentes, observou se então que a resistência das bactérias aumenta ao se diminuir a concentração do metal.

Gupta et al., (1997) observaram que um dos mecanismos de resistência que geralmente está relacionado ao elemento Cu, são os mecanismos de efluxo aos genes *pco* pelos quais a substância é removida ativamente da célula. Na figura 9 apresenta se o percentual das cepas de bactérias que foram inibidas apenas na concentração de 3,5g/L e 1,5g/L visto que na concentração de 0,5g/L o total de cepas que foram inibidas foi igual a zero.

Figura 11. Percentual de cepas de bactérias retiradas da água que foram inibidas pelo Cu^{2+} na concentração de 3,5 g/L e 1,5 g/L.



Fonte: o autor 2019

Dentre as espécies de enterobactérias a que apresentou maior sensibilidade foi a *Citrobacter diversus* 78% e 33 % na concentração de 3,5 e 1,5 g/L respectivamente. Das cepas de *Escherichia coli* que é a bactéria majoritária isolada da água da laguna da Jansen (n=35), apenas 43 % das cepas de foram sensíveis na concentração de 3,5g/L e 6% na concentração de 1.5 g/L.

Cardonha et al., (2004), ao estudarem 64 cepas de *E. coli* isoladas das lagoas de captação e praias da cidade de Natal, no Rio Grande do Norte, observaram que 37,5% (n=24) foram resistentes a dois ou mais metais pesados combinados, na maior concentração testada $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e que todas as cepas apresentaram resistência ao Zn e ao Cu.

No trabalho de Barros et al., (2014) ao analisarem cepas de *E. coli*, isoladas de praias de São Luís do Maranhão, observaram que o metal de CuCl_2 teve efeito bactericida em várias cepas de *E. coli* apenas 39 cepas demonstraram resistência nas concentrações de 1mM, 2mM, 4 mM do metal, sendo 61,5% na concentração de 1mM, 53,8% quando a concentração foi de 2mM e 23,1% na concentração 4 Mm. Estes valores mostram que as enterobactérias apresentam maior sensibilidade, ao se aumentar a concentração dos metais.

Segundo o IBGE (2002) A maior parte da população urbana, indistintamente ao status financeiro e social, habitam em áreas ainda não contempladas por um sistema de coleta e tratamento de esgoto. Durante os últimos 15 anos no Brasil relatos da presença de bactérias resistentes a metais pesados em ambientes aquáticos tem aumentado consideravelmente, por isso foram realizados vários estudos demonstrando que há bactérias resistentes aos metais pesados provenientes e identificadas da água de rios, lagos, oceanos, lagoas de captação e baías (Cardonha et al., 2004; Viana, 2011; Martins et al., 2014; Barros et al., 2014).

5.1.2 Susceptibilidade dos isolados da água frente ao chumbo nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.

As estirpes de enterobactérias da água foram resistentes ao metal chumbo, nas 3 concentrações testadas não interferindo no crescimento podendo então ser incorporado na biomassa das bactérias. Martinez et al. (2010), ao estudarem bactérias isoladas do Rio Almendares, notaram que estes apresentavam 100% de resistência ao chumbo em três concentrações distintas. Outros pesquisadores como Moraga et al., (2003) ao estudarem a resistência a metais pesados em bactérias isoladas da Baía de Iquique selecionaram 43 estirpes. Estes constataram que 100 % das cepas estudadas foram resistentes 100 % ao Pb e 77,7% ao Cu .

Neste contexto a concentração permitida pela Conama (CONAMA nº 274, de 2000), colabora para a evolução das bactérias conferindo resistência ao metal. Isto pode ser relacionado aos despejos dos efluentes domésticos produzidos na água pela maioria das cidades brasileiras que não são 100% tratados. A figura 10 apresenta a diferença no crescimento das cepas de *E. coli*, *Kl. ozanae* e *C. freundii* no meio de cobre e chumbo sendo na concentração de 3,5 g/L.

Demonstrando como os metais interferem no crescimento, sendo nítido o crescimento no meio contendo os sais de chumbo e a sensibilidade das mesmas estirpes ao metal cobre visto que as estirpes não crescerem no meio deste metal.

Figura 12. Diferença das cepas no meio de cobre e chumbo na concentração de 3,5 g/L.



Fonte: O autor (2019).

5.2 Suscetibilidade de enterobactérias isoladas do peixe frente ao metal cobre nas concentrações de 3,5g/L,1,5g/L e 0,5 g/L.

O lançamento inadequado de efluentes domésticos ao ambiente aquático, proporciona um acréscimo de bactérias nesse meio, principalmente as enteropatogênicas, ocasionando na contaminação dos peixes por estarem em contato

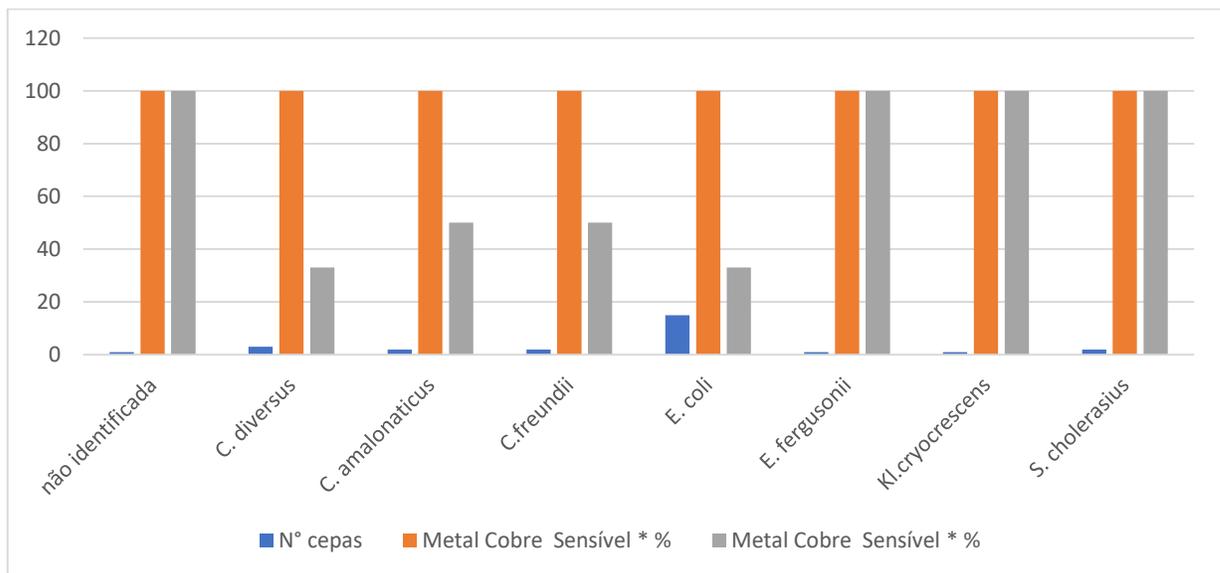
direto com água contaminada, desta forma estes contaminados por bactérias como *Aeromonas* e *Vibrio* podem levar a um ciclo de contaminação quando consumidos pela população e ocasionar danos a quem o ingere (JANDA; ABBOT, 1998; NEYTS et al., 2000; FELDHUSEN, 2000; VASUDEVAN et al., 2002; SAUTOUR et al., 2003; HÅSTEIN et al., 2006; MATTÉ et al., 2007).

Todas as cepas analisadas demonstraram se sensíveis ao metal cobre de 3,5 g/L, na concentração de 1,5 g/L 67% das estirpes foram resistentes ao cobre e numa concentração de 0,5 g/L todas as bactérias foram resistentes.

Uma das condições que pode favorecer esta resistência é absorção do cobre por estes microrganismos que são capazes de reduzi-lo, pois estas bactérias possuem metabolitos que fazem a transformação do cobre divalente (Cu(II)) para o cobre monovalente (Cu(I)) facilitando a entrada do cobre nas células, e assim melhorando a mobilidade do cobre no ambiente, conseqüentemente, aumentando a capacidade de remoção do cobre pelos microrganismos (ANDREAZZA et al., 2011c).

Na figura 13 apresenta se o percentual das cepas de bactérias isoladas do peixe que foram inibidas apenas na concentração de 3,5g/L e 1,5g/L visto que na concentração de 0,5g/L o total de cepas que foram inibidas foi igual a zero.

Figura 13. Percentual de cepas de bactérias retiradas do peixe que foram sensíveis ao Cu^{2+} na concentração de 3,5 g/L e 1,5 g/L.



Fonte: O autor (2019).

Todas as estirpes foram sensíveis na concentração de 3,5 g/L, já numa concentração de 1,5g/L as cepas de *Citrobacter diversus* e *Escherichia coli* foram 33 % sensíveis ao metal cobre. Arredondo, Núñez, (2005) dizem que existem vários fatores de resistência das bactérias como a redução de metais por enzimas, a forma como realizam o transporte de cobre por exemplo, adaptações ao meio no caso de microrganismos que cresceram em concentrações deste metal e a atividade das metalotioneínas e chaperonas que controlam a homeostase do cobre celular retendo o íon cobre não livre no citosol .

Damato et al., (1998) estudando uma espécie de peixe, *Hyphessobrycon callistus*, constatou que o cobre foi o metal mais tóxico para este peixe. Carmo (2015) , ao estudar a resistência de metais a bactérias isoladas do efluente líquido de triunfo do RS constatou que 78,6% apresentaram resistência a nitrato de chumbo($2,88\text{g.L}^{-1}$) e 42,9% dos isolados apresentaram resistência à sulfato de cobre pentahidratado ($2,4\text{g.L}^{-1}$).

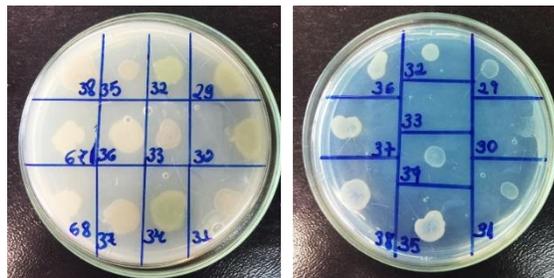
Um dos fatores que pode estar relacionado com a sensibilidade por cobre nas enterobactérias da Laguna da Jansen, deve se ao metal ser comumente encontrado em efluentes de indústrias petroquímicas, logo a concentração em que pode haver na laguna é baixa, como este metal não está presente em concentrações maiores, as bactérias não precisaram evoluir seus mecanismos para sobreviver no ambiente já que o mesmo está em concentração baixa (Barakat, 2011).

5.2.1 Suscetibilidade de enterobactérias isoladas do peixe frente ao metal chumbo nas concentrações de 3,5g/L,1,5g/L e 0,5 g/L.

Os isolados do peixe frente ao chumbo foram resistentes ao metal nas três concentrações 3,5g/L ,1,5g/L e 0,5 g/L este não interfere no crescimento dessas bactérias, podendo então ser incorporado na sua biomassa. Uma das razões para isto deve se ao chumbo ser um metal comumente encontrados em águas residuárias e industriais evidenciando uma maior probabilidade de estar na laguna e em maior concentração já que os microrganismos tiveram que se adaptar (César et al., 2012)

A contaminação de metais pesados em rios lagos ou lagoas é preocupante devido ao tempo podendo levar meses para detectar estas substancias metálicas nos organismos bentônicos (REBELO, 2005), a figura 14 demonstra algumas estirpes dos isolados de enterobactérias frente aos metais cobre e chumbo na concentração de 1,5 g/L .

Figura 14. Crescimento das bactérias no meio de cobre e chumbo na concentração de 1,5 g/L.



Legenda: *S.cholerasius* (27), *E. coli* (33,34), *C. freundii* (32,37), *C. amalonaticus* (38), *C. diversus* (36), não identificada (30).

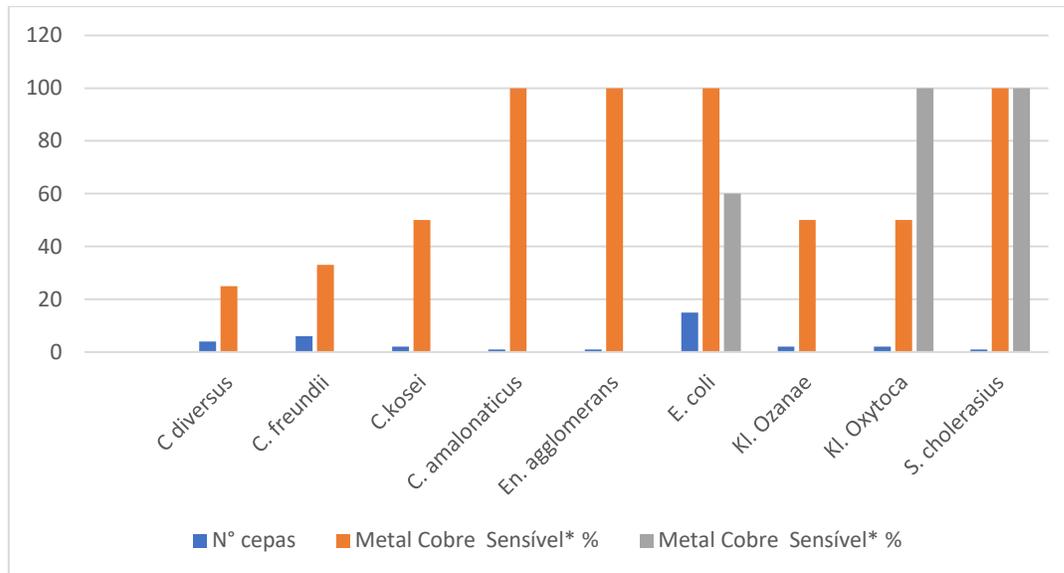
Fonte: O autor (2019).

5.3 Suscetibilidade dos isolados do sedimento frente ao metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.

O motivo para que haja diversos estudos ligados à qualidade dos ambientes aquáticos, deve se ao fato de não se levar em consideração somente a qualidade da água, mas, do mesmo modo a vegetação, os organismos aquáticos e os sedimentos suspensos e /ou fundo (MOURA,2002). Apenas 29 % dos isolados do sedimento apenas foram resistentes na concentração de 3,5 g/L já na concentração de 1,5 g/L ,68% das estirpes foram resistentes e na concentração de 0,5 todas as cepas foram resistentes.

Zampieri (2015) ao estudar bactérias resistentes a metais pesados em sedimentos da Baía do Araçá, em São Sebastião (SP), observou que à concentração inibitória mínima de 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apenas (2%) das cepas cresceram nesta concentração frente ao metal Cu e nenhuma conseguiu resistir à maior concentração 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A figura 15 apresenta a sensibilidade das enterobactérias isoladas do sedimento frente ao cobre .

Figura 15. Percentual das cepas de bactérias retiradas do sedimento que foram sensíveis ao Cu^{2+} na concentração de 3,5 g/L e 1,5g/L.



Fonte: O autor (2019).

A figura 15 mostra que todas as estirpes de *E.coli* na concentração de 3,5 g/L foram sensíveis ao cobre, seguido da *C.freundii* (n=6) 33% ,Para a avaliação da sensibilidade de isolados do sedimento a metais pesados na concentração de 1,5 g.L, somente 35 % de 34 bactérias foram sensíveis ao cobre. No trabalho de Silva et al., (2015) sobre o isolamento de *Enterococcus spp.* de sedimento do Lago Igapó na cidade de Londrina-PR demonstrou que 100% dos isolados foram tolerantes a todos os metais (Cu, K, Pb e Zn), demonstrando que outras espécies de bactérias Gram negativas já apresentam tolerância aos metais estudados.

No trabalho de Sumita et al., (2007) a avaliação da interação de Cobre em *Chromobacterium violaceum* bactéria Gram negativa mostrou que a interação entre Cobre não foi proeminente, demonstrando que para outros gêneros de bactérias Gram negativas o cobre pode se apresentar como um metal não relevante não influenciando no crescimentos destes microrganismos.

Segundo Hortellani (2005), um dos maiores repositórios de poluentes no ambiente aquático, mesmo quando as concentrações na água são baixas ou inexpressivas, este acúmulo de contaminantes nos sedimentos tende a ocorrer por

adsorção no material particulado e posterior deposição no fundo ou por mecanismos físico-químicos, como a floculação e precipitação direta. Neste sentido é importante e faz-se necessário utilizar-se o sedimento como um indicador ambiental de poluição, servindo para mapear, traçar e monitorar fontes antropogênicas de contaminação e/ou anomalias causadas por processos geoquímicos naturais.

5.3.1 Suscetibilidade dos isolados do sedimento frente ao metal chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.

Os isolados do sedimento foram resistentes ao metal chumbo nas três concentrações testadas 3,5 g/L, 1,5g/L e 0,5g/L. Segundo Vaughan e Hakenkamp (2001), afirmam que os microrganismos que vivem no sedimento são propícios a selecionarem seus genes conferindo resistência para a sua sobrevivência no meio, já que os sedimentos são um importante local de deposição de metais.

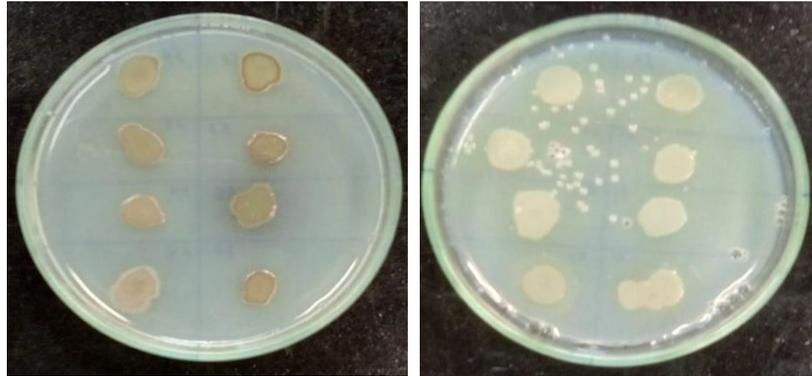
Deste modo as bactérias que residem podem atingir altas densidades em relação a outros microrganismos devido à disponibilidade de matéria orgânica como por exemplo a *Corbicula flumínea* (amêijoia asiática), que é um organismo representativo comum em muitos sistemas, geralmente reside em sedimentos onde os metais são tipicamente depositados e filtra um grande volume de água, neste contexto sugere-se que muitas bactérias entram em contato com as superfícies de *Corbicula*.

Este resultado implica em que as bactérias possuem resistência, um dos fatores que podem estar relacionados são os mecanismos potenciais que fazem uma seleção nesta se enquadram em três amplas categorias: corresistência (determinantes de resistência fisicamente ligados a um elemento genético), resistência cruzada (o mesmo determinante de resistência confere resistência a múltiplas toxinas) e coregulação: expressão de determinantes de resistência sob controle da mesma via regulatória (AENDEKERK *et al.*, 2002; PERRON *et al.*, 2004).

Como estas possuem diversos mecanismos traz dificuldades para o pesquisador discernir qual o mecanismo que está envolvido em uma comunidade bacteriana, isto se deve pela multiplicidade de vias de resistência a antibióticos e metais utilizadas por bactérias (SILVER, 1998; ALONSO *et al.* 2001; DAVIES, 2010; PERRON *et al.*,

2010). Na figura 16 tem se os crescimentos de estirpes de enterobactérias no meio de cobre e chumbo na concentração de 0,5 g/L.

Figura 16. Cepas no meio de cobre e chumbo na concentração de 0,5 g/L.

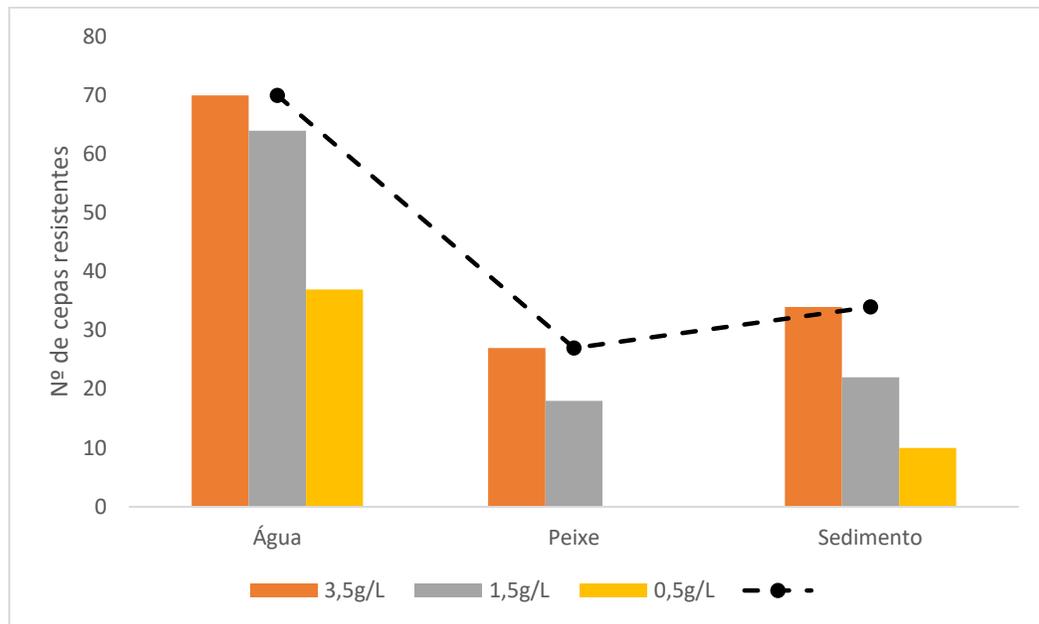


Fonte: O autor (2019).

5.4 Comparações das estirpes da água, sedimento e peixe isolados da laguna da Jansen frente ao metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5 g/L.

A suscetibilidade das enterobactérias frente ao metal pesado varia de acordo com o meio, como foi observado que estes microrganismos só foram sensíveis ao metal cobre além disso deve se levar o local na qual estas foram isoladas. Como mostra a figura 17.

Figura 17. Resistencia de *Enterobactérias* isoladas da água, peixe e sedimento no meio de cobre nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.



Fonte: O autor (2019).

A figura 17 mostra que as bactérias que possuem maior resistência ao cobre nas 3 concentrações são, os isolados da água foram os que apresentaram maior resistência seguido dos isolados do sedimento. Já os isolados do peixe foram sensíveis na concentração de 3,5 g/L e resistentes na concentração de 1,5g/L e 0,5 g/L.

No caso dos isolados do peixe, deve-se ao poder dos metais penetrarem nas plantas e animais aquáticos (peixes), através da superfície do corpo, estruturas respiratórias, e também pela ingestão que fazem do material particulado e da água, criando uma condição de toxicidade, devido a acumulação dos metais nestes organismos (MELVILLE, BURCHETT, 2002).

Já a ocorrência de contaminação por metais em ambientes naturais como o sedimento tem papel formidável no que diz respeito a conservação e desenvolvimento de resistência, devido os metais não estarem sujeitos a degradação e por esse motivo podem representar uma pressão de seleção a longo prazo (BAKER et al. 2006). Este é um dos fatores que faz os microrganismos do sedimento mais resistentes do que os isolados do peixe.

Já a água possui maior contaminação devido, a intensa ocupação humana, nas regiões costeiras causa forte pressão sobre os frágeis ecossistemas que se

encontram nestes ambiente proporcionando a poluição por efluentes domésticos e industriais , despejos de esgotos levando a contaminação da água e dos seres que ali habitam (LAMPARELLI et al.,2001;ABESSA et al. ,2008; SAMPAIO et al., 2008).

Por essa evolução das bactérias vários estudos são realizados, devido a capacidade de remoção de metais pesados pela biomassa bacteriana, estas são utilizadas por exemplo no tratamento de água e resíduos líquidos contaminados. A eficiência desse processo tem sido observada, estudos demonstram elevadas porcentagem de remoção de metais. No tratamento de efluente secundário da estação de tratamento de esgoto foi obtida a remoção de cobre e chumbo em 74,61% e 61,9% respectivamente a partir da adição de 55 mg de biomassa seca de bactérias (AL-GHEETHI et al., 2014).

No trabalho de Chandra et al., (2010), estudando a biorremediação da bactéria termofílica *Geobacillus thermodenitrificans* comprovou que esta foi capaz de remover com melhor eficiência o ferro (43,94%), seguido do cromo (39,2%) e cádmio (35,88%), e em menor taxa o chumbo, cobre, cobalto e zinco utilizado em tratamento de águas residuais industriais, demonstrando que as taxas de remoção são diferenciadas entre os metais, isto se deve aos seus mecanismos de resistência a cada metal.

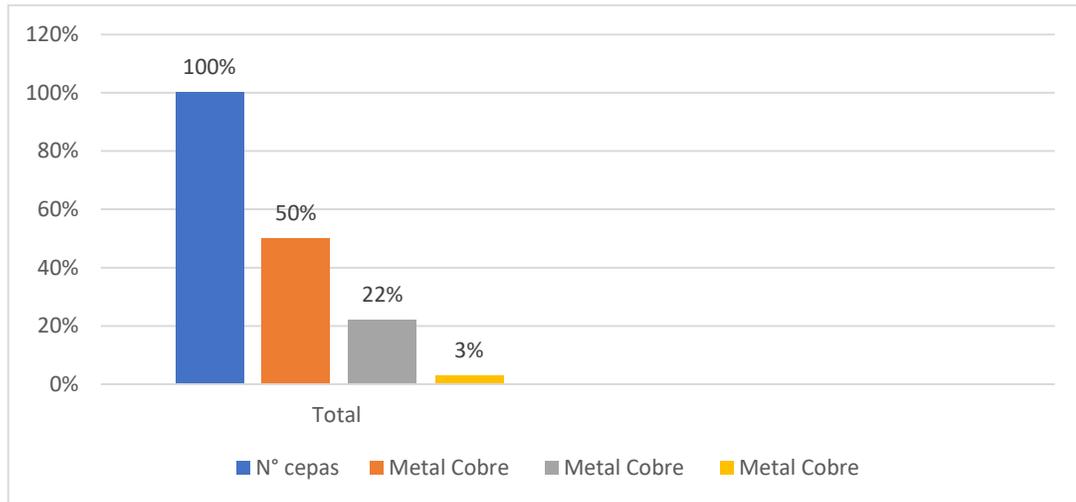
Carpio et al. (2014) ao estudarem o tratamento de água contaminada por metais em biorreatores, que obtiveram a remoção do cobre presente na água de forma mais eficiente na utilização de biofilme bacteriano associado com carvão ativado (47%) do que apenas com carvão ativado (17%).Assim a presença de bactérias entéricas na área da Laguna da Jansen que é proveniente da descarga de esgoto não tratado, colabora para a ocorrência de transferência de genes entre elas e a comunidade bacteriana nativa, proporcionando a resistência a metais pesados das bactérias isoladas neste estudo.

5.5 Suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da laguna da Jansen frente ao metal pesado cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria normalmente encontrada na água e no solo, é um patógeno de animais e plantas. Essa bactéria tem sido considerada um fenômeno de resistência devido à diversidade de mecanismos que possui, portanto,

representa um risco potencial para a população. A figura 18 mostra o percentual de *P. aeruginosa* que foram sensíveis ao metal Cu.

Figura 18. Percentual de *Pseudomonas aeruginosa* no metal cobre nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.



Fonte: o autor (2019).

Diante do exposto analisou sua sensibilidade ao metal cobre os resultados obtidos demonstram que na concentração de 3,5 g/L do metal cobre 50% das cepas de *P. aeruginosa* foram sensíveis ao cobre e ao diminuir a concentração do metal aumentou se a resistência das bactérias 78% e todas as cepas foram resistentes na concentração de 1,5 g/L . Ao se diminuir a concentração dos metais observa se que aumenta o crescimento da bactéria do gênero *Pseudomonas aeruginosa*

Estudos demonstram que a *P. aeruginosa* é uma bactéria mais sensível ao cobre, porém, é capaz de crescer em altas concentrações de cádmio, mercúrio, cobalto, lantânio, lítio e zinco. Esta utiliza vias como sistema de *efluxo*, formação de biofilme e reações de óxido-redução como vantagem para as linhagens que vivem em comunidades que contém estes metais. Desta forma é um exemplo de bacilo que é resistente a metais pesados, que são considerados os maiores poluentes da água (FILALI *et al.*, 2000; GAIL *et al.*, 2003).

Um dos compostos relacionados à tolerância de metais pesados são os sideróforos (agentes quelantes de ferro com propriedades de solubilização desse metal),isto ocorre devido ao ferro ser abundante em diversos ambientes porém sua

disponibilidade é baixa trazendo competição e proporcionando o desenvolvimento de novos mecanismos, este é essencial aos microrganismos por ser essencial na redução de oxigênio para a síntese de ATP. Uma maior sensibilidade a metais tóxicos foi observada em estirpes mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* que eram incapazes de produzir sideróforos. Além disso, foi observado um aumento na produção de sideróforos em razão da presença e aumento da concentração de cobre e níquel em meio de cultura (ABREU et al., 2007; MARTINEZ, 2006; BRAUD et al., 2010).

Carpio et al., (2016) relataram que experimentos com meio de cultura com a adição de metais pesados têm sido realizados com o intuito de estudar o potencial de remoção de metais pesados por bactérias, pois estas conseguem retirar metais pesados de lagos, rios e efluentes como por exemplo o consórcio de várias bactérias resistentes a metais pesados isoladas de rio contaminado, apresentaram capacidade de remoção de 450 mg g^{-1} de cobre em sua biomassa seca.

Os valores de CIM podem variar de acordo com o meio de crescimento utilizado, pois este interfere no nível de complexação entre os cátions metálicos e os componentes do meio de crescimento, e observaram que a uma diminuição do crescimento de *P. aeruginosa* no meio quando há a exposição a concentrações crescentes de metais pesados (Carpio et al., 2016)

Koedam et al., (1994), ao estudarem isolados de *Pseudomonas spp.* frente aos metais pesados detectaram que estas eram altamente fluorescentes e esses isolados têm alta capacidade de resistir e acumular um ou mais metais misturados como as de Cr (VI), Cu (II), Cd (II) e Ni (II).

No trabalho de Singh et al., (2010) ao estudarem oito isolados de *Pseudomonas* do esgoto de efluentes industriais de águas residuais da estação de tratamento de Paonta Sahib H.P. Na Índia, frente aos metais de: cromo, cobre, níquel, cádmio, todos os isolados exibiram alta resistência a metais pesados com um mínimo concentração inibitória (CIM) para metais pesados variando de $50 \mu\text{g / ml}$ a $350 \mu\text{g / ml}$. Todos os isolados também apresentaram múltiplas tolerâncias aos metais pesados e antibióticos. O teste de tolerância a metais pesados indicou maior tolerância ao cobre ($300 \mu\text{g / ml}$) e menor para o Cromo.

Hussein et al.,(2003) ao estudar quatro linhagens de *Pseudomonas* observaram que estas tem uma boa capacidade de resistir e acumular diferentes íons metálicos de : Cr (VI), Cu (II), Cd (II) e Ni (II) estes foram isolados da estação de tratamento de esgoto de Alexandria, Alexandria, Egito. As linhagens foram caracterizadas e identificadas como *Pseudomonas fluorescens* que resistem ao Cr (VI), três outras linhagens da espécie *P. putida*, resistentes ao Cu (II), Cd (II) e Ni (II).

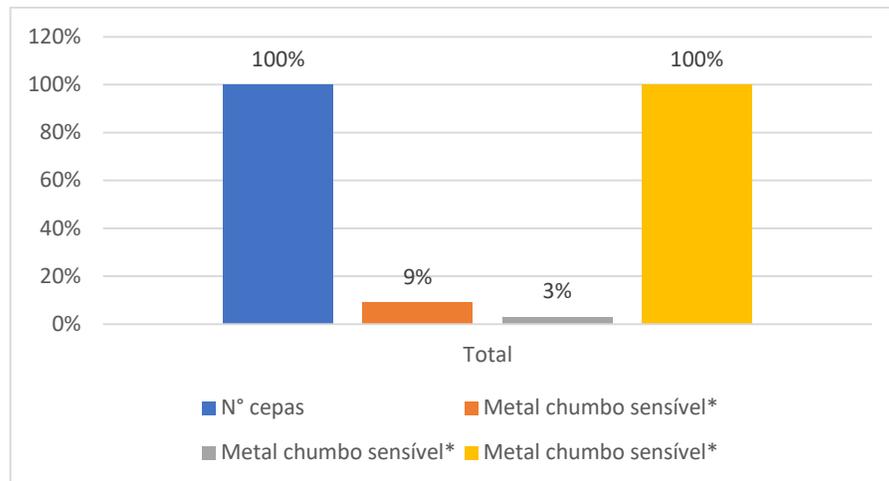
Hussein (2004) ao estudar a biossorção de *Pseudomonas* a metais obteve os seguintes resultados, já a extensão dos valores de captação de cobre Cu (II) e cromo Cr (VI) exibidos variou entre 8,9 e 238 mg / g de biomassa.

5.6 Suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da laguna da Jansen frente ao metal pesado chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.

Quanto a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* frente ao metal chumbo observou que houve um aumento na resistência das bactérias ao se diminuir a concentração do metal conforme tabela 6 os valores encontrados foram de 91%,97% e 100 % respectivamente nas concentrações de 3,5 g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L.

Diante da sua resistência comprovada de antibióticos ,matérias de limpezas e a metais e pela habilidade de transformar em energia as moléculas orgânicas por vias metabólicas como compostos alifáticos e aromáticos como o fenol ainda há relatos que esta tem a capacidade de utilizar mais de 90 compostos orgânicos diferentes como fonte de energia., faz da bactéria *P. aeruginosa* um bom agente de biorremediação (BAKER;HERSON,1994;WRENN,1996; ALEXANDER, 1999).A figura 19 demonstra o percentual de *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis ao metal chumbo .

Figura 19. Percentual de *Pseudomonas aeruginosa* no metal chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5g/L e 0,5g/L.



Fonte: o autor (2019).

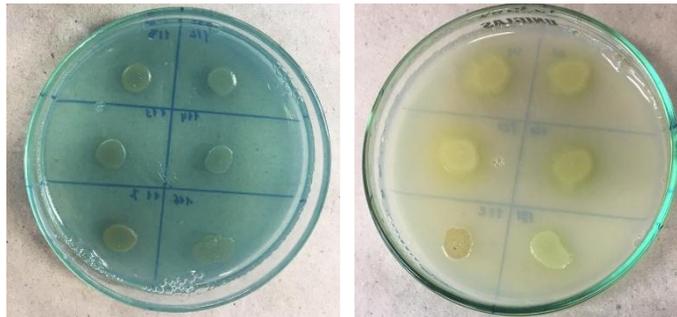
Na concentração de 3,5 g/L de chumbo 9% das bactérias foram sensíveis ao metal, na concentração de 1,5 g/L apenas 3% das cepas foram sensíveis ao chumbo, já na última concentração todas foram resistentes. No trabalho de Guilherme, Silva, (2000) identificação de *P. aeruginosa* em águas de consumo e de hemodiálise obtiveram respectivamente 8,9% e 11,6% indicando a resistência da bactéria ao cloro e sugere uma inibição do grupo coliforme.

Neubauer et al., (2000) abordou sobre a capacidade desta bactéria formar complexos estáveis entre sideróforos e outros cátions metálicos diferentes do ferro. Braud et al., (2009a,b) no seu trabalho ao estudarem os dois sideróforos (pioverdina e piochelina) mais produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* frente a 16 metais (Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{3+} , Tl^+ e Zn^{2+}) comprovaram que essa bactéria é apta a quelar todos estes metais.

Teitzel,Parsek (2003) no estudo de Resistência de metais pesados do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* planctônica analisaram a suscetibilidade ao metal pesado em duas maneiras: inibição do crescimento (CIM) e toxicidade (MBC), os autores revelam que as células de *P. aeruginosa* de natação livre eram suscetíveis aos metais pesados testados na seguinte ordem de suscetibilidade: Zn_2 Cu_2 Pb_2 , reafirmando que o cobre tem um efeito inibidor mais acentuado do que o chumbo. A CIMS medidos de chumbo e de zinco foi menor do que o relatado anteriormente para *P.aeruginosa* (24 a 48 mM para Zn e 15 mM para Pb).

Devido aos seus mecanismos de resistência alguns trabalhos já utilizam a *Pseudomonas* na biorremediação de metais pesados, No trabalho de Naz et al., (2016), utilizando diversas estirpes dessa bactéria , eles obtiveram melhor eficiência na remoção de metais com a estirpe de *Pseudomonas sp.*, em que foi possível a remoção de 37% de chumbo, 32% de níquel, 29% de cobre e 32% de cromo presente em efluente. Estes dados são importantes pois demonstra que os mecanismos de resistência da *Pseudomonas* são mais evoluídos para o chumbo ao se comparar com o cobre. Na figura 20 tem se as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no meio de cobre e chumbo na concentração de 1,5 g/L.

Figura 20. *Pseudomonas* no meio de chumbo e cobre na concentração de 1,5g/L.

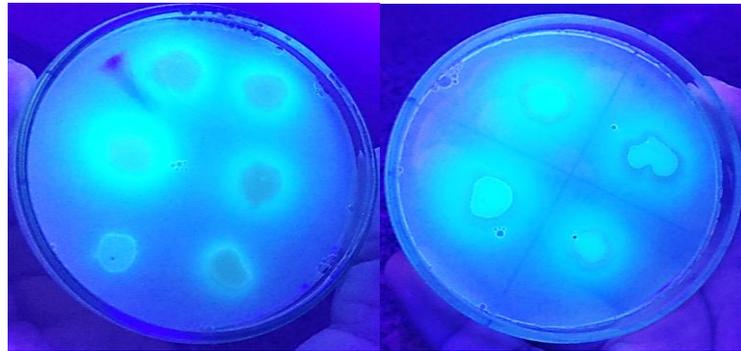


Fonte: O autor (2019).

5.7 Pigmento das *Pseudomonas aeruginosa* no meio de ágar nutriente com os sais dos metais de cobre e chumbo.

Ao realizar se o teste de suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* frente aos metais cobre e chumbo nas concentrações de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0,5 g/L percebeu se que além da resistência que aumentava ao se diminuir a concentração dos sais de Cu^{2+} e Pb^{3+} a coloração do meio de chumbo apresenta fluorescência enquanto as cepas no meio de cobre possui fluorescência sob a luz UV, a figura 21 apresenta as cepas de *Pseudomonas* no meio de chumbo sob luz ultra violeta (UV) .

Figura 21. Fluorescência das *Pseudomonas* no meio de chumbo.



Fonte: O autor (2019).

HPA (2003) relata que em meio contendo ceftriaxona a *Pseudomonas aeruginosa* produz piocianina, no meio de ágar nutriente sob luz uv, produz fluorescência no comprimento de onda de $360\pm 20\text{nm}$.

O'malley *et al.*, (2003), demonstrou no seu trabalho que o pigmento piocianina presente em células procariontes e eucariontes tem mecanismos de ação que está ligado à capacidade de produzir reações de óxido-redução, formação e acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio. este pigmento difunde se passivamente pela membrana celular e reduz o nadh e nadph sob condições aeróbicas. os elétrons são transferidos da forma reduzida da piocianina para superóxido gerando O_2 e H_2O_2 .

Segundo Tredget *et al.*, (2004). A piocianina, do latim *pio* (pus) e do grego *kýanos* (relativo ao azul escuro), é um pigmento solúvel em água e sua principal função é extrair íon ferro e nutrientes para a sobrevivência da bactéria *P. aeruginosa*. Já os autores Guilherme, Silva, (2000;) e Tancredi *et al.*, (2002) acreditam que o pigmento formado exclusivamente pela *P. aeruginosa* esteja envolvido com as interferências nas análises colimétricas.

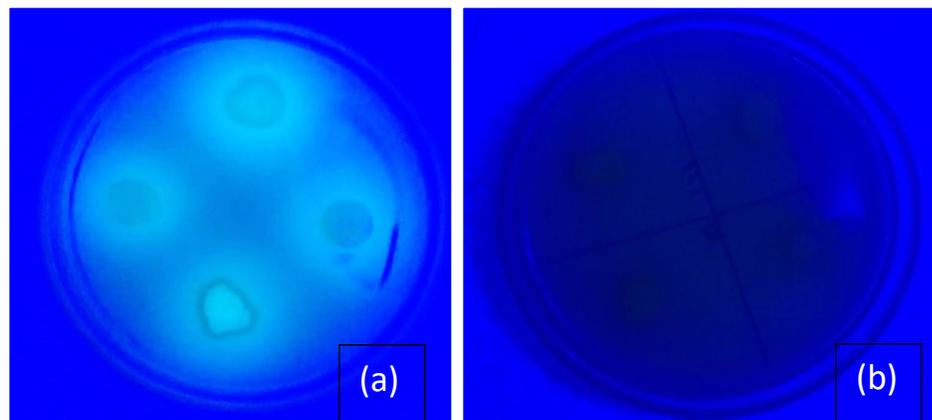
A maior parte dos trabalhos que estudam a presença da piocianina em *P. aeruginosa* foram realizadas com células eucariotas, principalmente nos episódios hospitalares de infecções respiratórias (ERGIN & MUTLU, 1999; LOUREIRO *et al.*, 2002; TODAR, 2002; PAVIANI *et al.*, 2004).

Cepa de *Pseudomonas* na figura 22 (a) no meio de chumbo apresentando fluorescência e na figura 22 (b) no meio de cobre que não possui pigmento piocianina. Ramalho *et al.*, (2002) ao estudar a *Pseudomonas aeruginosa* demonstra

que esta produz vários pigmentos. Como a pioverdina (amarelo - esverdeado), piomielina (marrom) e piorrubina (vermelho).

Freitas; Barth (2004) descrevem que geralmente o pigmento produzido por este bacilo são azul-esverdeadas, podendo também ser marrom ou mesmo não produzir pigmento. Portanto conclui se que o pigmento produzido pela *P.aeruginosa* no meio cobre não produz pigmento apresentando uma coloração cinza já no meio do chumbo é a pioverdina ,isto ocorre pela interação destas com o meio na qual está inoculado, na figura 22 tem se a comparação das mesmas cepas *Pseudomonas aeruginosa* nos diferentes meios de cobre e chumbo sob luz UV .

Figura 22.Fluorescência das *P.aeruginosa* no meio de chumbo e cobre.



Fonte :O autor (2019).

5.8 A influência do pH na produção de biomassa de Enterobactérias e Pseudomonas aeruginosa .

A importância de se estudar a influência do pH do meio, deve se para a determinar a faixa de pH na qual ocorreu maior remoção e inibição. Em paralelo com as medições de faixa de pH, realizam-se medidas do potencial da biomassa na presença e na ausência dos metais estudados. Ambos os ensaios podem fornecer dados sobre a carga geral da parede celular do microrganismo, em solução aquosa, em diferentes valores de pH. A composição da camada externa da biomassa, onde ocorrerá adsorção biológica, varia dentre os diversos organismos estudados, destacam se ainda três classes que servem de sítios para captação de metais: as proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Tais componentes possuem, em sua estrutura, as espécies químicas

amina, carboxila, hidroxila, fosfato, sulfato e outros que podem se ligar aos íons metálicos (TSEZOS et al., 1996; CALFA, TOREM.,2007).

Tabela 1. Medição de pH das cepas de bactérias do gênero *C. diversus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* isoladas da Laguna da Jansen (água, peixe e sedimento), Cu^{2+} (1,5 g/L) e Pb^{3+} (3,5g/L).

*Espécies de bactérias	N° cepas	**pH (cobre)	***pH (chumbo)
****Controle	1	6	5
<i>C. diversus</i> (água)	1	6	7
<i>C. diversus</i> (peixe)	1	9	8
<i>C. diversus</i> (sedimento)	1	7	8
<i>E. coli</i> (água)	1	6	7
<i>E. coli</i> (peixe)	1	6	6
<i>E. coli</i> (sedimento)	1	6	7
<i>P. aeruginosa</i> (água)	1	6	8
<i>P. aeruginosa</i> (peixe)	1	6	8
<i>P. aeruginosa</i> (sedimento)	1	6	6

Legenda :n
:número de
cepas,
*
estirpes,
**
medição de
pH com
adição do
metal cobre.
*** medição
de pH com
adição do
metal cobre;
controle****
:meio sem
adição do
metal.

Fonte: O

autor (2019).

Ao analisar se 2 gêneros distintos dos isolados de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo 3 cepas de cada evidenciando a fonte do isolamento água, peixe e sedimento observou que os meios que apresentaram maior pH ou que deferiram da cepa controle são os que tiveram maior turvação e maior deposição de biomassa, Sendo 2 cepas no cobre e 9 para o chumbo. O pH encontrado ideal foi de 6 já o pH =7 ou maior apresentaram maior potencial de crescimento, já menor que 7 foram os pHs de controle, outros estudos realizados que obtiveram o pH =7 como ideal ou seja o desvio do pH ideal pode levar à formação de número de substâncias dissociadas e não dissociadas, que podem penetrar na membrana celular e controlar todo o metabolismo e atividade inibitória,.

Kodukula et al. (1988) relatam que em condições de elevado pH (baixa concentração de íons H^+), a atividade enzimática das bactérias é inibida, pois cada

enzima possui um pH ótimo para a sua ação, na qual reage com uma velocidade máxima. Tendo variações do pH interno das bactérias que é diferente do pH externo, sendo que internamente seu valor oscila em torno da neutralidade, a diferença do pH interior e exterior da célula pode determinar o mecanismo através do qual a atividade celular é influenciada pela concentração de íons hidrogênio.

Nolte, (1982) relata que a maioria das bactérias patogênicas cresce melhor em meio neutro. Neste sentido a variação do pH reflete no crescimento bacteriano, uma vez que influencia a atividade enzimática, o substrato influencia a velocidade das reações químicas que são favorecidas pelas enzimas.

Estas enzimas podem estar presentes tanto intra e extracelular, as enzimas extracelulares atuam sobre os nutrientes, carboidratos, proteínas e lipídeos, que por meio das hidrolases favorecem a digestão. As enzimas que localizam-se na membrana citoplasmática estão relacionadas com o transporte de substâncias para dentro e para fora da célula, com a atividade respiratória, e com a estruturação da parede celular. O transporte pela membrana é fundamental, para suas complexas reações metabólicas, crescimento e reprodução e para o controle do fluxo de nutrientes (BAZIN, PROSSER, 1988; NEIDHART, 1990; NISENGARD & NEWMAN, 1994). Na figura 23 há registros da medição do pH do meio de cobre que obteve o maior valor de pH.

Figura 23. *Medição do pH do meio de cobre.*



Fonte: O autor (2019).

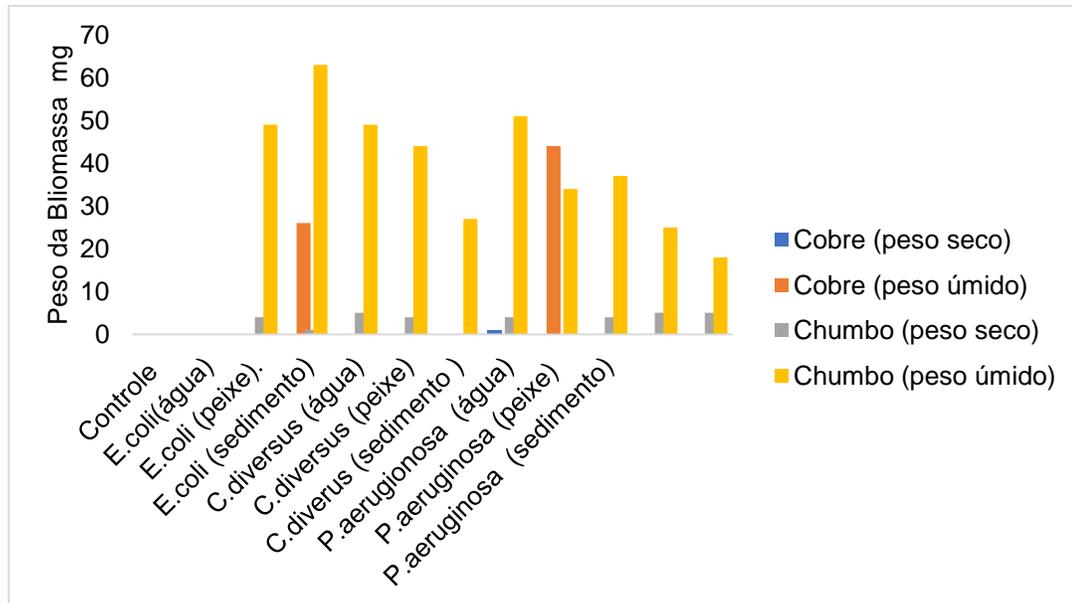
5.9 Biomassa das bactérias

A biomassa bacteriana é uma das informações fundamentais ao estudo da ecologia microbiana (MAEDA et al., 1983). Observou-se o efeito dos metais cobre e chumbo sobre cada uma das estirpes, a análise demonstrou que as estirpes cultivadas com a adição de chumbo apresenta uma maior produção de biomassa do que em meio cultivado com cobre superando a condição de controle sem adição de quaisquer metais, o metal cobre comprometeu a produção de biomassa das estirpes se compararmos com o tratamento controle. E para todas as estirpes, o Cd foi o metal mais deletério na produção de biomassa, ao se comparar a biomassa seca e úmida verificou-se que os teores de biomassa úmida são discrepantes em comparação a biomassa em peso seco demonstrando a interferência da quantidade de água na biomassa, em decorrência disto entende-se que o peso seco é o melhor indicador da biomassa real da bactéria.

Ao se avaliar os valores no meio do chumbo observou-se que o peso do controle foi igual em comparação com algumas cepas e percebeu-se que algumas obtiveram biomassas para com peso maior ou menor que as do controle demonstrando que estas

absorveram o metal. Segundo Davis et al., (2003) a bioissorção microbiana é um processo passivo e independente do metabolismo, na qual a biomassa_viva e morta podem absorver íons metálicos através de vários mecanismos físico-químicos , na figura 24 tem se a biomassa em mg dos isolados .

Figura 24. Biomassa dos isolados da Laguna da Jansen da água ,sedimento e peixe frente aos metais na concentração de 1,5 g/L.



Fonte: O autor (2019).

A estirpe de *Citrobacter diversus* do sedimento foi a única que apresentou biomassa para todos os metais, quando comparada com as demais estirpes, obtendo valores de aproximadamente 1 e 4 mg L⁻¹ de Cu e Pb, respectivamente .As estirpes que apresentaram maior concentração de biomassa para o chumbo foram as de *E.coli* e de *Pseudomonas* 5 mg L⁻¹,os resultados obtidos demonstraram que o meio de cobre interferiu na produção de biomassa do gêneros *Escherichia coli* e *Pseudomonas* nos 3 ambientes e de *Citrobacter diversus* da água e peixe, isto pode ter ocorrido por ter concentrações menores de cobre na laguna o que conferiu uma maior sensibilidade ao metal comprometendo a sua biomassa.

No trabalho de Vicentin (2016) observou se que o cobre não comprometeu a produção de biomassa do gênero *Cupriavidus Necator* ,a estirpe UFLA 01-659 quando compararam com o tratamento controle, esta estirpe foi a que apresentou

maior tolerância a todos os metais avaliados , apresentando valores de CMI de 5,00 mM de Cd, 4,95 mM de Cu e 14,66 mM de Zn. A estirpe UFLA 01-659 apresentou maiores taxas de remoção para todos os metais, quando comparada com as demais estirpes, obtendo valores de aproximadamente 9, 4,6 e 3,2 mg L⁻¹ de Cd, Cu e Zn, respectivamente.

6 CONCLUSÃO

- O metal chumbo nas três concentrações testadas não inibiu nenhuma das enterobactérias independente do meio.
- O metal chumbo inibiu uma pequena parcela das cepas de *P.aeruginosa*.
- A presença do cobre no meio interferiu no crescimento das bactérias, com maior inibição na concentração de 3,5g/L inibindo todas as cepas isolados do peixe e variando no sedimento e na água.
- A concentração inibitória mínima foi de 3,5g/L e 1,5g/L para o cobre e chumbo
- O pH ótimo encontrado foi igual a 6.
- A biomassa bacteriana demonstrou que o melhor método é peso seco que não tem discrepâncias e que as bactérias tem o poder de absorver os metais e utilizá-los para o seu crescimento.
- As enterobactérias e a *Pseudomonas aeruginosa* expressaram um potencial para a biorremediação significativo.

REFERÊNCIAS

ABIOYE, O. PETER. **Biological remediation of hydrocarbon and heavy metals contaminated soil** . Institute of Biological Sciences, University of Malaya, Kuala Lumpur Malaysia, September, p.234-240, 2011.

Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. , Baysse, C. (2002) **Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from Pseudomonas aeruginosa that confers resistance to vanadium. Microbiology** 148(8):2371-2381.

AGARWAL, S.K. **Heavy Metal Pollution**. S.B. Nangia. A.P.H. Publishing Corporation, New delhi. p, 277-282, 2009.(Vol. 4). APH .

AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T. **Avaliação bacteriológica da qualidade de água utilizada nos equipos odontológicos**. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent. São Paulo, v. 53, n. 3, p. 228-235, maio/jun. 1999.

Al-Gheethi, A,A; Ismail, Norli. (2014). **Biodegradation of Pharmaceutical Wastes in Treated Sewage Effluents by Bacillus subtilis 1556WTNC**. Environmental Processes. 1.459-489.

ANDRADE, C. L. **Histopatologia e identificação da escherichia coli como agente causal da celulite aviária em frangos de corte**. 2005. 62 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Med. Veterinária)- Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. vol. 10, p. 112-117.

ANDREAZZA, R. et al. **Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil**. Science of the Total Environment, Amsterdam, v.408, p.1501–1507, 2010.

ANDREAZZA, R. et al. **Biosorption and bioreduction of copper from different copper compounds in aqueous solution**. Biological Trace Element Research, Totowa, v.152, p.411-416, 2013.

ANDREAZZA, R. et al. **Use of high-yielding bioenergy plant castor bean (Ricinus communis L.) as a potential phytoremediator for copper-contaminated soils**. Pedosphere, Beijing, v.23, p.651-661, 2013.

Andrezza, R.; Pieniz, S.; Wolf, L.; Lee, MK.; Camargo, F.A.O. e Okeke, B.C. (2010a) - **Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil**. *Science of the Total Environment*, 408, 7: 1501-1507.

Andreazza, R.; Pieniz, S.; Okeke, B.C. e Camargo, F.A.O. (2011a) - **Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1: 66-74.

Andreazza, R.; Bortolon, L.; Pieniz, S.; Giacometti, M.; Roehrs, D.D.; Lambais, M.R. e Camargo, F.A.O. (2011b) - **Potential phytoextraction and phytostabilization of perennial peanut on copper contaminated vineyard soils and copper mining waste.** *Biological Trace Element Research*, 143, 3: 1729-1739.

Andreazza, R.; Okeke, B.C.; Pieniz, S.; Brandelli, A.; Lambais, M.R. e Camargo, F.A.O. (2011c) - **Bioreduction of Cu(II) by cell-free copper reductase from a copper resistant *Pseudomonas* sp.** *NA. Biological Trace Element Research*, 143, 2: 1182-1192.

ARAUJO.S.A.T.; SILVA, I; TACÃO, M, et al. **characterization of antibiotic resistant and pathogenic escherichia coli in irrigation water and vegetables in household farms.** *International Journal Food Microbiology*, V.257, p.192-200,2017.

Alexander, D. E. (1999). **Bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification Environmental Geology** (pp. 43–44).

Dordrecht: Springer Netherlands **Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India.** *International Journal of Food Microbiology*, 76: 165 – 168.

ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J. L. **Environmental selection of antibiotic resistance genes - Minireview.** *Environmental Microbiology* 3(1), 1-9, 2001.

APPEROTH, K. J, et al. **Soil biology: Soil Heavy Metals.** Springer. New York. p. 19-263, 2010.

ARAÚJO, Gustavo Henrique de Sousa. ALMEIDA, Josimar Ribeiro de. GUERRA, José Teixeira. **Gestão Ambiental de Áreas Degradadas.** 2º ed. Rio de Janeiro. Editora Bertrand Brasil. 2007.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: Gerenciamento da Toxicidade.** São Paulo. Atheneu.p. 24-29, 2003.

BALIK, J, et al. **Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils Earth and environmental sciences.** Springer v. 68, p. 90-340, 2002.

BAPTISTA MGF. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos,** Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Saúde. Lisboa, 2013, pp 01-28.

Barakat, M.A. (2011) **New Trends in Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater.** *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 361-377.

BARROS, T. R. B.. **Estudo de adsorção do chumbo II de efluentes utilizando casca de abacaxi como biomassa adsorvente**. 2014. 43 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

BARCELOUX, D. G. Zinc. **Journal Toxicology - Clinical Toxicology**, London, v. 37, n. 2, p. 279-292, 1999.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. **Colibacillosis In: SAIF W. M. Diseases of poultry**. (11ª ed.). Iowa, p. 138-144, 2003.

BARROS, A. L. et al. **Resistência a Metais Pesados, Antimicrobianos e Formação de Biofilme em Cepas de Escherichia coli Isoladas de Praias de São Luis - Maranhão**. Revista de Patologia Tropical, [s.l.], v. 43, n. 3, p.277-289, 9 out. 2014. Universidade Federal de Goiás. <http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v43i3.32213>.

BASSO, ER. **Monitoramento e avaliação da qualidade da água de duas represas e uma lagoa no município de Ilha Solteira**.2006.127f (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Ilha Solteira-sp,2006.

Barceloux DG. Copper. J Toxicol Clin Toxicol 1999; 37 (2): 217-230. **Health effects of excess copper. Copper in Drinking Water**. www.nap.edu/openbook/030906939.

Bayoumi Hamuda H. E. A. F., Patko I. (2012). **Ecological monitoring of Danube water quality in Budapest region**. Am J Environ Sci 8, 202–211 [10.3844/ajessp.2012.202.211](http://dx.doi.org/10.3844/ajessp.2012.202.211).

BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. & RHODES, S. **Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry**. Miner. Metall. Proc., 17:105-111, 2000.

BHARTI, P. k. **Heavy Metals Environment**. Centre for Agro-Rural Technologies (CART). 1 ed. Publisher: Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Germany. p. 114, 2012.

BHULLAR, K.; WAGLECHNER, N.; PAWLOWSKI, A.; KOTEVA, K.; BANKS, E. D.; JOHNSTON, M. D.; BARTON, H. A.; WRIGHT, G. D. **Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome**. PLoS One, 7(4): e34953. 2012.

Bhullar, K.; Waglechner, N.; Pawlowski, A.; Koteva, K.; Banks, E.D.; Johnston, M.D.; Barton, H.A.; Wright, G.D. 2012.

BIONDO, R. et al. **Plasmídeo recombinante contendo cassette de ancoragem, linhagem bacteriana contendo o plasmídeo recombinante e seu uso**. BR PI 0801282-2, 1º abr. 2008.

Boscariol R. **Resistência bacteriana: avaliação do conhecimento em profissionais farmacêuticos no estado de São Paulo** [dissertação]. Sorocaba (SP): Univ. Sorocaba; 2013.

BRASIL. **Supremo Tribunal Federal. Recurso Extraordinário**. RE 134297 SP. Primeira Turma. Recorrente: Estado de São Paulo. Recorridos: Paulo Ferreira Ramos e Cônjuge. Relator: Min. Celso de Mello. Brasília, 13 de junho de 1995. Disponível em. Acesso em: 05 ago. 2015.

BRASIL. Supremo Tribunal Federal, 1a Turma, Recurso Extraordinário 134.297/SP, Rel. Min. Celso de Mello, j. em 13.06.1995. **Revista Trimestral de Jurisprudência**, v. 158, p. 205-217.

BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. **Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional**. Publicado no D.O.U.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução N° 357, de 17 de março de 2005**, Brasília-DF, mar, 2005.

BRAUD, A. et al. **The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity**. *J Bacteriol*. V 191, p 3517-3525. 2009.

BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE.SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada a qualidade da água para consumo humano**. Brasília :Ministério da Saúde,2006.248p.

BAKER, K. H. ; HERSON, D. S. **Bioremediation**, 1sted.: New York, McGraw-Hill, 375p., 1994.

Brenner, DJ, Grimont, PA, Steigerwalt, AG, Fanning, GR, Ageron, E., Riddle, CF **"Classificação de citrobactérias por hibridação de DNA: designação de Citrobacter farmeri sp. Nov., Citrobacter youngae sp. Nov., Citrobacter braakii. sp. nov., Citrobacter werkmanii sp. nov., Citrobacter sedlakii sp. nov. e três genoespécies sem nome de Citrobacter.** " *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1993) 43: 645-658.

Brenner, DJ, O'Hara, CM, Grimont, PA, Janda, JM, Falsen, E., Aldova, E., Ageron, E., Schindler, J., Abbott, SL e Steigerwalt, AG **"identificação bioquímica de Espécies de Citrobacter definidas pela hibridação do DNA e descrição de Citrobacter gillenii sp. Nov. (Anteriormente Citrobacter genomospecies 10) e Citrobacter murliniae sp. Nov. (Anteriormente Citrobacter genomospecies 11) "**. *J. Clin. Microbiol.* (1999) 37: 2619- 2624.

Brenner DJ, O'hara CM, Grimont PA, Janda JM, Falsen E, Aldova E, Ageron E, Schindler J, Abbott SL, Steigerwalt AG. **Identificação bioquímica de espécies de Citrobacter definida por hibridação de DNA e descrição de Citrobacter gillenii sp. nov.** (anteriormente Citrobacter genomospecies e Citrobactermurliniae sp. nov. (anteriormente Genomospecies Citrobacter

. J Clin Microbiol 1999; 37: 2619-2624.

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

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. **Microbial resistance to metals in the environment**, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.45, p.198-207,1999.
Bruins, M.; Kapil, S. e Oehme, F. (2000). **Microbial resistance to metal in the environment.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 45, n. 3, p. 198-207.

BRUSCHI, M. GOULHEN, F. **New bioremediation technologies to remove heavy metals and radionuclides using Fe(III), sulfate- and sulfur- reducing bacteria.** In: S.N. SINGH; R.D. TRIPATHI (Ed.). *Environmental Bioremediation Technologies*. New York: Springer, 2007. p.35-56.

CAMARGO, F.A.O. et al. **Uso de microrganismos para remediação de metais.** In: CERETTA, C.A.; SILVA, L.S.; REIHCERT, J.M. (Ed.). *Tópicos Especiais em Ciência do Solo*. Viçosa: Editora SBCS, 2007. v. 5, p.468- 496.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. **Escherichia.** In.: TRABULSI, L.R. et al. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo : Atheneu, 2002, p.215-228.

CARDONHA, A. M. S. et al. **Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.** *International Microbiology*, Natal, v. 7, p.213-218, 2 abr. 2004.

CARPIO, I. E. M. et al. **Copper removal using a heavy-metal resistant microbial consortium in a fixed-bed reactor.** *Water Research*, New York, v. 62, p. 156- 166, Oct. 2014

Caumo, K.; Duarte, M.; Cargnin, S.T.; Ribeiro, V.B.; Tasca, T.; Macedo, A.J. 2010. **Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar.** *Revista Liberato*, 11: 89- 188.

CAVALCANTE, P. R. S.; IBAÑEZ, M. do S. R.; SILVA, M. N. S. **Avaliação de parâmetros físicos e químicos da água e colimetria em água e pescado da laguna da Jansen. (São Luís – MA).** In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Campo Grande. 2005. Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.

CHATTERJEE, S. et al. **Bioremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolated from industrial sample.** *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Delaware, v.3, p.290-295, 2012.

CARDONHA, A. M. S. et al. **Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.** *International Microbiology*, Natal, v. 7, p.213-218, 2 abr. 2004.

CESAR, R.; SILVA, M.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; EGLER, S.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H. (2012) **Influence of the properties of tropical soils in the toxicity and bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended lands.** *Environmental Earth Sciences*, v. 66, n. 8, p. 2281-2292.

Cervantes, C. e S. Vaca. 1990. **Resistência bacteriana a metais pesados tóxicos.** *Science and Development*, 17 (102): 86-96.

Cervantes, C. & S. Vaca. 1990. **Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos.** *Ciencia y Desarrollo*, 17(102): 86-96

COSTA, C.F.M.ET AL. **Enterobacteria Identification and detection of diarrheagenic Escherichia Coli in a port complex.** *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.45, n.3, p.945-952,2014.

COSTA, C.N.; MEURER, E.J.; BISSANI, C.A.; SELBACH, P.A. **Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente.** In: Meurer, E.J. *Fundamentos de Química do Solo*. 2ª ed. Porto Alegre: Gêneses, p. 239-282, 2004.

Costagliona, M.; Seigneur, G. & Jurquiza, V. **Estudio químico y bacteriológico del Río Baradero (Argentina): calidad sanitaria del agua y aptitud de los peces para consumo humano.** *Inf. Téc., Inst. Nac. Inv. Desar. Pesq.*, n.50, 2003.

COX, C. D. **Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin,** *Infection and immunity*, v. 52, n.1, p. 263-270, 1986.

DAMATO, M; SOBRINHO, P.A.; MORITA, D.M. **Emprego de uma Espécie Indicadora Sul-Americana na Determinação da Toxicidade Aguda de Metais Pesados.** Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária.1998.

DAVIES, J.; DAVIES, D. **Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74:417-433. 2010.

DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G. (2002) **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disrupters.** **Suíça: World Health Organization (WHO);** International Programme on Chemical Safety (IPCS).

Dias, M.T.; Ferreira Santos, P.C.R.; Trindade Oliveira, L.A.; Marin, V.A. 2010. **Avaliação da sensibilidade de cepas de Escherichia coli isoladas de mexilhões**

(Perna perna Linnaeus, 1758) à antimicrobianos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 30: 319-324.

Dias, Cláudia Franco de Salles . **Retenção do cátion do sulfato de cobre nos compartimentos biótico e abiótico de mesocosmos com sistema de fluxo contínuo de água/ Cláudia Franco de Salles Dias.** Jaboticabal, 2003 xii, 66 f. : il. ; 28 cm Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2003.

DIEGUES, A. C.S (Org.). **Povos e Águas : Inventário de áreas úmidas brasileiras.** 2.ed. São Paulo. NUPAUB/USP, 2002. p. 15-18,597p.

Doran,T.I. **The role of Citrobacter in clinical disease of children:** review Clin Infect Dis 1999; 28: 384-394.

DUBOIS, V. ; ARPIN, C. ; MELON, M. ; MELON, B. ; ANDRE, C.; FRIGO,C.; QUENTIN, C. **Nosocomial outbreak due to a multiresistent strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime-Amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance,** Journal of clinical microbiology, v. 39, n.6, p. 2072-2078, 2001.

ERGIN, Ç. ; MUTLU, G. **Clinical distribution and antibiotic resistance of *Pseudomonas* species,** Eastern journal of Medicine, v. 4, n.2, p. 65-69, 1999.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia.** 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 1998b. 602p.

Feldhusen F. **The role of seafood in bacterial foodborne diseases.** Microbes Infect 2000; 2(13): 1651-60.

FENT, K; WESTON, A. A; **caminhada, d. Ectotoxicology of human pharmaceuticals.** Aquatic Toxicology,N76,P122-159,2006.

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas.** São Paulo, 2002. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, C.M.; LOMBARDI, J.V.; MACHADO-NETO, J.G.; BUENOGUIMARÃES, H.M.; SOARES, S.R.C.; SALDIVA, P.H.N. **Effects of Copper Oxychloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects.** Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.73, p.465-470, 2004.

FORSYTHE, S. J. **Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. cap. 5, p. 169-173.

FRANCO, Bernadette D. G. M; LANDGRAF, Mariza, Maria Tereza Destro. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.p27-171.

FREITAS, Mariana Almeida Passos de. **Zona costeira brasileira: delimitação, questões jurídicas, unidades de conservação e natureza de patrimônio nacional**. Revista de Doutrina da 4ª Região, Porto Alegre, n.66, jun 2015. Disponível em: <http://www.revistadoutrina.trf4.jus.br/artigos/edicao066/Mariana_deFreitas.html> Acesso em: 02 dez. 2019.

FREITAS, Vladimir Passos de. **A Constituição Federal e a efetividade das normas ambientais**. 2. ed. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2002. p. 152.

FREITAS, Vladimir Passos de; FREITAS, Dario Almeida Passos de. **A proteção do meio ambiente na zona costeira**. In: GRANZIERA, Maria Luiza Machado;

Freitas AL, Barth AL (2004) **Tipagem de Pseudomonas aeruginosa em pacientes hospitalizados: uma comparação dos perfis de suscetibilidade e bioquímicos com o genótipo**. Braz J Med Biol Res 37: 77–82.

FOSTER, T. J. **Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria**. Microbiological Reviews, Dublin, v. 47, n. 3, p.361-409, set. 1983.

GAIL, M.; PARSEK, M. A. **Heavy metal resistance of biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa**, Applied and environmental microbiology, v. 69, n. 4, p. 2313-2320, 2003.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO.; M.I.S. **Sistema de gestão: Qualidade e segurança dos alimentos**. São Paulo: Manole, (2013).

Gennaro LD. **Lead and the developing nervous system**. Growth Dev Aging. 2002; 66(1):43-50.

GIL, E. S.; MATHIAS, R. O. (2005). **Classificação e Riscos Associados aos Resíduos Químico - Farmacêuticos**. Revista Eletrônica de Farmácia, Vol. 2(2).

GIONGO, A. et al. **Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (Lupinus albus) in sandy soil**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.34, p.361-369, 2010.

GOMES, L. V.; IBAÑEZ, M. S. R. **Variação Nictimeral de Parâmetros Físicos e Químicos da Lagoa da Jansen em Duas Fases do Ciclo Hidrológico**. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, São Luís, v. 13, p. 19-32, 2000.

GONÇALVES, Alcindo (Org.). **Os problemas da zona costeira no Brasil e no mundo**. Santos: Universitária Leopoldiana, 2012. p. 257-277.

GONZALEZ, A.M.; PARANHOS, R, LUTTERBACH, M.S. **Relationships Between fecal Indicators and Pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil.** *enviromonit assess* (2010) 164: 207-219.

Graham DR, Anderson RL, Ariel FE, Ehrenkranz NJ, Rowe B, Boer HR, Dixon RE. **Meningite hospitalar epidêmica por *Citrobacter diversus* em neonatos.** *J Infect Dis* 1981; 144: 203-209.

Graham, D. R., R. L. Anderson, F. E. Ariel, N. J. Ehrenkranz, B. Rowe, H. R. Boer, and R. E. Dixon. 1981. **Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates.** *J. Infect. Dis.* 144:203-209.

Graham, D. R., and J. D. Band. 1981. ***Citrobacter diversus* brain abscess and meningitis in neonates.** *JAMA* 245:1923-1925 .

GUERRA, Antonio Teixeira e GUERRA, Antonio José Teixeira. **Dicionário geológico geomorfológico.** Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1997.

GUILHERME, E. F. M. ; SILVA, J.A.M. ***Pseudomonas aeruginosa* como indicador de contaminação hídrica,** *Revista Higiene Alimentar*, v. 14, n.76, p.43-47,2000.

Gupta RK, Prasad S, Sessa-Sai MVR & Viswanadham TS (1997) **The estimation of surface temperature over an agricultural area in the state of Haryana and Panjab, India, and its relationship with the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI),** using NOAA-AVHRR data. *International Journal of Remote Sensing*, 18:3729-3741 .

HAKEEM, K ET AL. **SOIL Remediation and plants: prospects and challenges.** Elsevier, p. 2-90, 2015.

HAHN, A.B.B., BAHLIS, M., BASSO, A.P. & SAND, S.T.V.D. 2015. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do rio dos Sinos, RS, Brasil.** *Revista Brasileira de Biociências*, 13(3): 155-164.

HANSON, M.J.; STEFAN, H.G. **Side effects of 58 years of copper sulfate treatment of the Fairmont Lakes, Minnesota,** *Water Resources Bulletin*, v. 20, n. 6, p. 889-900, 1984.

HARDALO C. ; EDBERG, S. C. ***Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water,** *Critical Reviews on Microbiology*. , v. 23, n.1, p.47-75,1997.

Håstein T, Hjeltnes B, Lillehaug A, Utne Skare J, Berntssen M, Lundebye AK. **Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry.** *Rev Sci Tech* 2006; 25(2): 607-25.

HPA. Health Protection Agency. **Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration**, issue 2.2, 11p.,2003.

HERRERA-SILVEIRA, J.A.; MEDINA-GOMEZ, I. & COLLI, R. (2002) **Trophic status based on nutrient concentration scales and primary producers community of tropical coastal lagoons influenced by groundwater discharges**. *Hydrobiol.*, 475 (1): 91-98.

Hortellani MA, Sarkis JES, Bonetti J, Bonetti C. **Evaluation of mercury contamination in sediments from Santos – São Vicente estuarine System, São Paulo State, Brazil**. *J Braz Chemistry Society*. 2005; 16(6A):1140-9.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Facultatively anaerobic gram-negative rods**. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

Holmes B, Rei A, Phillips I, Lapage SP. **Sensibilidade de *Citrobacter freundii* e *Citrobacter koseri* a cefalosporinas e penicilinas**. *J Clin Pathol* 1974; 27: 729-733.

Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. **Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance**. *Lancet* [Internet]. 2016 [citado em 20 jan. 2017]; 387(10014):176-87. Disponível em: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)00473-0/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)00473-0/abstract).

HOODA, P.S. et al. **Chemical bioavailability in terrestrial environments**. *Developments in soil science*. 1ed. Elsevier, v. 32. p. 169-657, 2008.

HPA. Health Protection Agency. **Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration**, issue 2.2, 11p.,2003.

Hussein, H .; FARAG, S. e MOAWAD, H. **Isolamento e caracterização de *Pseudomonas* resistentes a contaminantes de metais pesados**. *Arab Journal of Biotechnology* , 2003, vol. 7, p. 13-22.

Hussein, H .; FARAG, S. e MOAWAD, H. **Biossorção de metais pesados a partir de águas residuais utilizando *Pseudomonas* sp**. Vol.7 No.1, Issue of April 15, 2004.

Huang, X-Z.; Frye, J.G.; Chahine, M.A.; Glenn, L.M.; Ake, J.A.; Su, W.; Nikolich, M.P.; Lesho, E.P. 2012. **Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant Enterobacteriaceae isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq**. *PLoS ONE*, 7: e40360.

Hutchinson T.C. & Symington M.S. 1997. **Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed**. *Journal of Geochemical Exploration*, 58:323-330.

IBGE: Instituto de Geografia e Estatística. **Censo demográfico**. Rio de Janeiro, IBGE, 2000.

Ikpi, G. & Offem, B. **Bacterial infection of mudfish *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) fingerlings in tropical nursery ponds**. J. Trop. Biol.. v.59 n.2 p.751-759, 2011.

Janda JM, Abbott SL. **Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions**. Clin Infect Dis 1998; 27: 332-44.

JONES, L.R.; OWEN, S.A.; HORRELL, P.; BURNS, R.G. (1998). **Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of antrazine from surface water**. Water Research, 32 (8): 2542-2549.

KARBASIZAED, V., BADAMI, N. & EMTIAZI G. 2003. **Antimicrobi-al, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran**. *African Journal of Biotechnology*, 2: 379-383.

KHAN, M. S, et al. **Biomangement of metal contaminated soils**. *Environmental pollution* 20. Springer, p.1-95, 2011.

KIM, S.D.; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A. (2007) **Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters**. *Water Research*, v. 41, n. 5, p. 1013-1021.

KLAASSEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology, **the Basic Science of Poisons**. **Kansas City**: Mc.Graw Hill, 2008. 1309p.

Kline MW, Kaplan SL, Hawkins EP, Mason EO. **Patogênese da formação de abscesso cerebral em modelo infantil de rato de bacteremia e meningite por *Citrobacter diversus***. J Infect Dis 1988; 157: 106-112.

Kline MW. **Meningite por *Citrobacter* e abscesso cerebral na infância: epidemiologia, patogênese e tratamento**. J Pediatr 1988; 113: 430-434.

Koedam, N., Wittouck, E., Gaballa, A., Gillis, A., Hbftte, M. & Cornelis, P. (1994). **Detection and differentiation of microbial siderophores by isoelectric focusing and chrome azurol S overlay**. *BioMetals* 7, 287-291.

KODUKULA, P.S.; PRAKASAM, T.B.S.; ANTHONISEN, A.C. **Role of pH in biological wastewater treatment process**. Apud BAZIN, M.J.; PROSSER, J.I. *Physiological models in microbiology*. Florida, CRC Press, 1988, p. 113-134.

KONEMAN, W. E.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Bacilos Gram-Negativos não-fermentadores**. In: KONEMAN, E.

W. Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. p. 263-329.

LABOHIDRO. 1998. Diagnóstico Ambiental do Estuário do Rio Bacanga, Ilha de São Luís-MA: **Caracterização química e biológica (Relatório Final jan-dez/97)**, São Luís, UFMA, 122p.

LABOHIDRO, Laboratório de Hidrologia – UFMA. Departamento de Oceanografia e Limnologia. **Diagnóstico Ambiental da Lagoa da Jansen**. Relatório Final. São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 2002.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, 1987. 315p.

Lanphear, BP, Dietrich, K., Auinger, P., & Cox, C. (2000). **Déficits cognitivos associados a concentrações de chumbo no sangue <10 µg / dL em crianças e adolescentes dos EUA**. *Public Health Reports*, 115 (6), 521-529. <https://doi.org/10.1093/phr/115.6.521>.

Lavigne JP, Defez C, Bouziges N, Mahamat A, Sotto A. **Epidemiologia clínica e molecular de *Citrobacter spp* multirresistente a drogas . infecções em um hospital universitário francês**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 439-441.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

Lessa, S.S.; Paes, R.C.S.; Santoro, P.N.; Mauro, R.A.; Vieira-da-Motta, O. 2011. **Identification and antimicrobial resistance of microflora colonizing feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian Pantanal**. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 740-749.

Levy SB (2002) **Factors impacting on the problem of antibiotic resistance**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:25-30.

Levy RL, Saunders RL. **Meningite por *Citrobacter* e abscesso cerebral na primeira infância: cura pelo moxalactam**. *Neurology* 1981; 31: 1575-1577.

LIMA, V. F.; MERÇON, F. **Metais pesados no ensino de química. Química nova na escola**. Vol. 33, no. 4, p. 199-202, 2011.

LIMA e SILVAI, A.A. et al. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.43, n.4, p.1620-1631, 2012.

Lin FY, Devoe WF, Morrison C, et al. **Surto de meningite neonatal por *Citrobacter diversus* em um hospital suburbano**. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 50-55.

Lipsky, B. A., Hook, E. W., III, Smith, A. A. & Plorde, J. J. (1980). **Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature.** Rev Infect Dis 2, 746–760.

Lipsky BA, Hook EW III, Smith AA, Plorde JJ. **Infecções por Citrobacter em humanos: experiência no Seattle Veterans Administration Medical Center e uma revisão da literatura.** Rev Infect Dis 1980; 2: 746-760.

LOMBARDI, J.V. **Toxicidade aguda de agrotóxicos para o camarão de água doce Macrobrachium rosenbergii De Man (Decápoda, Palemonidae).** Rio Claro, 1999. Departamento de Zoologia, UNESP – Rio Claro.110p. Tese (doutorado em zoologia).

LOUREIRO, R, J. ET AL. **O Uso de antibiótico e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução.** Revista Portuguesa de Saúde Publica, V.34, n.1, p.77-84, 2016.

LOUREIRO, M. M.; DE MORAES, B. A. ; MENDONÇA, V. L. F. ; QUADRA, M. R. R., PINHEIRO, G. S.; ASENSI, M. D. **Pseudomonas aeruginosa : Study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil.** Memento do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 3, p. 387-394, 2002.

LUND, B. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. **Mol Microbiol**, v.2, n.2, p.255-263, 1988.

MAAR, J. H. **História da química - Primeira Parte - dos primórdios a Lavoisier.** Florianópolis: Conceito, 2008.

MAEDA, M.; LEE, W.J. & TAGA, N. 1983. **Distribution of lipopolysaccharide, an indicator of bacterial biomass, in subtropical areas of the sea.** Marine Biology, 76: 257-262.

MAILLARD, J. Y. P.; MOORE, S.L; PAYNE, D.N. **Principles and Practice of Disinfection Preservation & Sterilization.** Blackwell. 4 ed. P. 59-230, 2004.

MANAHAN. S. E. **Environmental Chemistry.** 5 ed. Crc Press. 9 ed. p. 200-765, 2010.

MARANHÃO, Governo do Estado. **Programa de Saneamento e recuperação ambiental da Lagoa da Jansen.** Estudo de Impacto Ambiental/ EIA. São Luís: 1993.

MARTIN. O.V et al. **Pollutants, Human Health and the Environment: A Risk Based Approach.** 5 ed. John Wiley&sons. 2012.

Martinez, R.J., Wang, Y.L., Raimondo, M.A., Coombs, J.M., Barkay, T., and Sobecky, P.A. (2006) **Horizontal gene transfer of PIB-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils.** Appl Environ Microbiol 72: 3111–3118.

MARTINS, L.; FONSECA, R.; DIAS, N.; ARAÚJO, A. A. & PINHO. **Evaluation of sediments contamination under tropical climate: Preliminary characterization of the contamination in the vicinity of a processing plant of heavy metals, Minas Gerais, Brazil.** Comunicações Geológicas, Geologia Ambiental e Sustentabilidade, tomo 101(3), 2014.

MARTINS, V. V. et al. **Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard.** Environmental Science and Pollution Research, [s.l.], v. 21, n. 9, p.5873-5878, 22 jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2509-4>.

MARTÍNEZ A, CRUZ M, VERANES O, CARBALLO ME, SALGADO I, OLIVARES S, LIMA L AND RODRÍGUEZ D (2010). **Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares.** Rev. CENIC. Ciencias Biol. 41:1-10.

MARÍN, C.; FONSECA, C.; ARIAS, S.; VILLEGAS, I.; GARCÍA, A. & ISHIHARA, H. **Carga bacteriana de los peces *Cynoscion squamipinnis* (Perciformes: Sciaenidae) y *Lutjanus guttatus* (Perciformes: Lutjanidae) en la cadena de comercialización, Costa Rica.** J. Trop. Biol., v.57 n.1-2, p.45-52, 2009

MATA, P. T. G. et al. **Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*.** Mudi. 11(2):20-25, 2007.

MASULLO, Y. A. G. et al. **Caracterização e Risco Ambiental na Área da Laguna da Jansen, São Luís – Maranhão.** XIII Simpósio de Geografia Física Aplicada. Viçosa, Brasil, 06 - 10 jul. 2009.

MASULLO, Y. A. G., FERREIRA, A. R. F., SANTOS, A. F., SOARES, A. B. C., & FERREIRA, A. P. (2014). **Análise multitemporal do uso e ocupação do solo na Lagoa da Jansen-MA.**

MATTÉ, M. H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, M. L.; MALUCELLI, M. I. C.; NITRINI, S. M. O.; MATTÉ, G. R. **Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil.** Food Control, v.18, n.6, p.747- 751, 2007.

MATYAR, F., AKKAN, T., UÇAK, Y. & ERASLAN, B. 2010. ***Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea).** Environmental Monitoring Assessment, 167: 309-320.

MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. **Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae)** p.327-340. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.;

NETO, A.L.O., *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. 1.ed. São Carlos, RIMA, 2000. 575p.

Mazon, A.F. 1997. **Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 160p.

MAZON, A.F. et al. **Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae)** p. 327-340. In: *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. ESPINDOLA, E.L.G. et al. 1. ed. São Carlos, RiMa, 2000. 575p.

MCINTOSH, D. et al. **Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an *IncA/C* plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid *pSN254***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s.l.], v. 61, n. 6, p.1221-1228, 28 mar. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn123>.

MECLELLAN, S, L.; FISHER, J.C.; NEWTON, R.J. **The Microbiome of Urban Water**. *Int microbiol*.V.18, n.3, p.141-149,2015.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**.2.ed.rev.e. ampl.Jaguariúna :Embrapa Meio Ambiente,2008.

Mergeay, M., 1997.**Recursos microbianos para biorremediação de locais poluídos por metais pesados**. In: **Perspectivas em Biorremediação: Tecnologias para Melhoria Ambiental**, Wild, JR, SD Varfolomeyev, A. Scozzafova, (Eds.). Editores acadêmicos, Kluwer, pp: 65-73.

MINDLIN, S. et al. **Mercury resistance transposons of Gram-negative environmental bacteria and their classification**. *Research in Microbiology*, [s.l.], v. 152, n. 9, p.811- 822, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01265-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01265-7).

MONTAÑO, Marcelo. **Recursos Hídricos e o zoneamento ambiental: o caso do município de São Carlos (SP)**. São Carlos, 129 p. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.2002.

MOURA, C.L. **Distribuição de Metais Pesados (Cr, Cu, Ni e Zn) em Sedimentos de Fundo do Rio Embu-Mirim-SP**. Dissertação de Mestrado. USP, São Paulo. 2002.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana**. *Rev. Saúde Pública*, v.36, n. 3, p. 370-374. Jun. 2002. Disponível em: <www.scielo.br>. Acesso em: 10 Set. 2019.

MONTUELLE, B., LATOUR, X., VOLAT, B., GOUNOT, A. 1994. **Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53(5):753-8.

MURRAY, P.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, J.H. **Microbiologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

NASCIMENTO, A.R. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente as bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*).** Lavras. 2004, 91F. Tese (Doutorado em Microbiologia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2004.

NAZ, T. et al. **Biosorption of heavy metals by Pseudomonas species isolated from sugar industry.** Toxicology and Industrial Health, Princeton, v. 32, n. 9, p. 1619-1627, Sept. 2016.

NEIDHART, F.C. **Physiology of the bacterial cell - a molecular approach.,** Masschesutts, Ed. Sinaver, 1990, p. 226-246.

NEILANDS, J. B. Siderophores - structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v.270, p. 26723-26726, 1995.

Nelson, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIES, D.H. **Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes.** FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 27, p.313- 339, 2003.

NIES, D.H.; SILVER, S. **Ion efflux system involved in bacterial metal resistances.** J. Ind. Microbiol. v.14, p.186-199, 1995.

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

NIES, D.H.; SILVER, S. **Ion efflux system involved in bacterial metal resistances.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire, v.14, p.186-199, 1995.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral Microbiology and Immunology.** 2 ed., . Philadelphia, Sauders, 1994, 477 p.

NOLTE, W.A. **Oral microbiology.** 4 th ed., London, Mosby. 1982, p. 55-125.
NRC: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **In Situ Bioremediation: When Does It Work?** Washington, DC, National Academy Press, 1993.

NRIAGU, J.O. **A silent epidemic of environmental metal poisoning?** Environ. Pollution, v.50, p.139- 61, 1988.

BENAVENTUNTO, M. 1000 Pontos de lançamentos de esgoto identificados na Lagoa da Jansen. O ESTADO .acesso em :<imirante.com/oestadoma/noticias/2018/10/04/1000-pontos-de-lancamentos-de-esgoto-identificados-na-lagoa-da-jansen/> 08/OUT/2019.

OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu , 1996. 515p.

OLIVEIRA, W.F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. RPCV (2004) 99 (552) 211-214.

O'NEILL, J. Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste. The Review on Antimicrobial Resistance. 2015. Disponível em: . Acesso em: 23 jan. 2018.

O'Neill J., The Review on Antimicrobial Resistance. **“Tackling a crisis for the health and wealth of nations”**. Londres, Reino Unido, 2014.

O'Neill J., **“The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations”**. Reino Unido, 2016.

Paterson, D.L. 2012. Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. Goldman's Cecil Medicine, 2: 1874–1877.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade de Pseudomonas aeruginosa. Infarma. v. 15, n. 12, 2004. p. 66 - 70.

PENNA, F. J.; NICOLI, J. R. Influência do colostro na colonização bacteriana normal do trato digestivo do recém-nascido. Jornal de Pediatria, v. 77, 2001;

PEREIRA, D. P. et al. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE Oreochromis niloticus (Pisces, Cichlidae) COMO BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA NA LAGUNA DA JANSEN, SÃO LUÍS, MA (BRASIL), Biosci. J., Uberlandia, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, July/Aug. 2014.

PERRON, G.; HALL, A.; BUCKLING, A. Hipermutability and compensatory adaptation in antibiotic – resistant bacteria. The American Naturalist, July 2010.

PRASAD, M.N.V; SAJWAN. K.S; NAIDU, R. Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation. Taylor & Francis. p. 256- 278, 2006.

PELGROM S.M.G.J. et al. Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia Oreochromis mossambicus: influence

of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. *Aquatic Toxicology*, v. 30, p. 117-135, 1994.

PETR, T. 2000. **Interactions between fish and aquatic macrophytes in inland waters.** A review. FAO Fisheries Technical Paper. Nº. 396. Rome, FAO. 185 p.

Porto,A,Santos,R,Santos,A,Leitão,S,Ruiz,Victor,Lebre ,R. **Intoxicação aguda por sulfato de cobre: caso clínico** .VOL.12 | Nº 4 | OUT/DEZ 2005.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas.** 1ª ed. Porto Alegre: editora Artmed 512p, 2005.

QUINÁGLIA, G. A. **Caracterização dos níveis basais de concentração de metais nos sedimentos do sistema estuarino da baixada santista,** São Paulo, 1 ed. p. 31-50, 2012.

RAMALHO, R.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. **Modified *Pseudomonas* agar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water,** *Journal of Microbial Methods*, v. 49, n. 1, p. 69-74, 2002.

RATTNER, H. **Meio ambiente, saúde e desenvolvimento sustentável. Ciência & Saúde Coletiva,** v.14, n.6, 2009.

REBELO, M. **Cientistas usam gene de ostra para identificar poluição da água. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.** UFRJ.2005. In: [http:// www. ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br). Acesso em 18/10/2019.

RIBEIRO, Benjamin Adiron. **Lições práticas e teóricas de planejamento urbano.** São Paulo: 1988.

RENSING, C.; GHOSH, M.; ROSEN, B.P. **Families of soft-metal-ion-transporting ATPases.** *Journal of Bacteriology.* Oxford v.181, p.5891–589, 1999.

RODRIGUES, J. R. D. D.; JORGE, A. O.; UENO, M. **Evaluation of the quality of waters of two areas used for recreation of the River Piracuama-SP.** *Revista Biotécnicas*, v. 15, n. 2, p. 88–94, 2009.

RODRIGUEZ-ANGELES, G..Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, vol.44, n.5, sep.-oct., 2002.

RODRIGUEZ-MONTELONGO, L.R. et al. **The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydrogen peroxide.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Waltham, v.451, p.1-7, 2006.

ROANE, T.M.; MILLER, R. M. **Bioremediation: principles applications. Microbial remediation of metals.** 1ed. Cambridge. University of Idaho, Moscow, USA. p. 312-400, 2005.

ROANE, T.M.; PEPPER, I.L. **Microorganisms and metal pollutants.** In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C. Environmental Microbiology. San Diego: Academic Press, 2000a. chapter 17.

ROANE, T.M.; PEPPER, I.L. **Microbial responses to environmentally toxic cadmium.** Microbiol. Ecol., v. 38, p. 358– 64, 2000b.

RUMMENIGE, K. **A Utilização da Água no Mundo.** Sete Lagoas: MG, 2013.

RUPPÉ, E.; LASTOURS, V. de. 2012. **Entérobactéries résistantes aux antibiotiques et microbiote intestinal : a face cachée de l'iceberg.** Réanimation, 21: 252-259.

SANTOS, DMS; MELO, MRS; MENDES, DCS; ROCHA, IKBS; SILVA, JPL; CANTANHÊDE, SM; MELETTI, PC. **Alterações Histológicas nas Brânquias de Duas Espécies de Peixes como Indicadores da Qualidade da Água na Lagoa Jansen (São Luís, Maranhão, Brasil).** *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014 , 11 , 12927-12937.

SAMONIS G, KARAGEORGOPOULOS DE, KOFTERIDIS DP, MATTHAIUO DK, SIDIROPOULOU V, MARAKI S, FALAGAS ME. **Infecções por *Citrobacter* em um hospital geral: características e resultados.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 61-68.

SCHAUER DB, ZABEL BA, PEDRAZA IF, O'HARA CM, STEIGERWALT AG, BRENNER DJ. **Caracterização genética e bioquímica de *Citrobacter rodentium* sp. nov.** *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2064-2068.

SANUTH, H.A.; OGUNJOBI, A.A.; FAGADE, O.E. **The growth and survival of lead solubilizing strains of *Pseudomonas* in the presence of carbon and nitrogen sources supplements in a lead culture medium.** *AU JOURNAL of Technology*, Bangkok, v.14, p.88-96, 2010.

SANCHEZ, P. S. ; RUOCCO Jr., J. **Controle de qualidade de águas minerais naturais: novos conceitos e tendências recentes da legislação internacional.** In: SEMINÁRIO, 16 abr 2004, Recife. Apostila do participante. ABINAM- sucursal nordeste, 95 p., 2004.

SAVIOLLI, J.Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo.** 2010. 84 f. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo.

SERRA, J. L.; Nascimento, A. R.; Filho Moucherek, J. E ; Almeida, A. G. L. **Efeitos da emissão de efluentes doméstico na proliferação de bactérias em águas em águas da Lagoa da Jansen, São Luís/MA.** In: 47° Congresso Brasileiro de Química. 2007. Natal. Anais do 47° Congresso Brasileiro de Química.

SHAKOORI, A.R. & MUNEER, B. 2002. **Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in waste- water.** *Folia Microbiology*, 47: 43-50.

SHRIVASTAVA, R. ; UPRETI, R. K. ; JAIN, S. R. ; PRASAD, K. N. ; SETH,P. K.; CHATURVEDI, U. C. **Suboptimal Chlorine treatment of drinking water leads to selection of mutidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*,** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 58, n. 2, p. 277- 283, 2004.

SHUKLA, D. et al. **Biotechnology and biology of trichoderma.** Elsevier. Amsterdam, p. 400-412, 2011.

SILVA, J. A.; SILVA, D. da. *Escherichia coli* enteropatogênica (epec) ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. *Revista de Patologia Tropical* Vol. 34 (3): 175-196. set.-dez. 2005.

Silva, K. M. D.; Rezende, L. C. S. H.; Bergamasco, R.; da Silva, C. A.; Silva Gonçalves, D.; *Engevista* , 15, 43. 2012.

SILVA, N.R., MORAES, E.C.F. **Papel dos indicadores biológicos na avaliação da exposição ocupacional ao Chumbo.** *Rev. Bras. Saúde Ocupac.*, v.15, n.58, p.7-5, 1987.

SILVA,P.B. **Identificação de Bactérias Isoladas de Elementos Metálicos de Torres de Transmissão de Energia Elétrica e Avaliação de Resistência à Metais Pesados.**2011.125.dissertação (mestrado em biotecnologia). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan.

SILVA, R.M.P. et al. **Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum.** *Bioresource Technology*, Philadelphia, v.100, p.1533–1538, 2009.

SILVA, F. C. DA; SILVA, C. A.; BERGAMASCO, A. F.; RAMALHO, A. L. **Efeito do período de incubação e de doses de composto de lixo urbano na disponibilidade de metais pesados em diferentes solos.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.3, p.403-412, 2003.

SILVER, S. & T. MISRA. 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Ann. Rev. Microbiol.*, 53: 2725-2732.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32(11-12):587-605, 2005.

SILVER, S. e T. MISRA. 1988. **Resistências de metais pesados mediadas por plasmídeos.** Ann. Rev. Microbiol., 53: 2725-2732.

SILVER, S. e M. WALDERHARG. 1992. **A regulação gênica do plasmídeo e do cromossomo determinou o transporte de íons inorgânicos nas bactérias.** Microbiol Rev., 56 (1): 195-228.

SINGH, A. Et al. **Advances in applied bioremediation.** Springer. p. 246-285, 2009.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos.** Brasília : EMBRAPA, SPI, Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995.

SOUSA, C.P. **The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review.** *J. Venom. Anim. Toxins Ind. Trop. Dis.*, v.12, p.363-373, 2006.

SOUZA, E. P.; SILVA, I. F.; FERREIRA, L. E. **Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas: tolerance mechanisms the stresses for heavy metals in plants.** R. Bras. Agrociência, Pelotas, v. 17, n. 4, p.167-173, jun. 2011. Disponível em: . Acesso em: 11 jul. 2013.

SPERLING ,M,Von, **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; UFMG, 2005 452 p. (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, v.1).

Standing Committee of Analysts (2002a) **The Microbiology of Drinking Water 2002 — Part 1 — Water Quality and Public Health.** Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, Environment Agency, London.

Standing Committee of Analysts (2002b) **The Microbiology of Drinking Water 2002 — Part 7 — The Enumeration of Heterotrophic Bacteria by Pour and Spread Plate Techniques.** Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, Environment Agency, London.

SUMITA, T. C.; PEREIRA, R. S.; SILVA, M. B.; ROSA, L. C. L.; UENO, M. **Avaliação da interação de Zinco, Alumínio, Cobre e Manganês em *Chromobacterium violaceum*.** Ambi-Água, Taubaté, v. 2, n. 3, p. 44-53, 2007. (doi:10.4136/ambi-agua.32)

SUNDAR, K.; MUKHERJEE, A.; SADIQ, M.; CHANDRASEKARAN, N. **Cr (III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin.** *Journal of Hazardous Materials.* 187, 553–561, 2011.

TAMBOSI, J.L.; YAMANAKA, L.Y.; JOSÉ, H.J.; MOREIRA, R.F.P.M. (2010) **Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP)**. Química Nova, v. 33, n. 2, p. 411-420.

TANCREDI, R. C. P. ; CERQUEIRA ,E. ; MARINS, B. R. **Águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro**, Superintendência de controle de zoonoses, vigilância e fiscalização sanitária -Boletim de divulgação técnica e científica, ano 4, n.13 , 14p.,novembro de 2002.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**, 3^a. ed., São Paulo: Atheneu, 1216p., 2001.

THAKUR, I. S. **Industrial biotechnology problems and remedies**. Indu shekhar thakur. School of environmental Sciences. New Delhi, p. 190-195, 2006.

THAKUR, I. S. **Industrial biotechnology problems and remedies**. Indu shekhar thakur. School of environmental Sciences. New Delhi, p. 190-195, 2006.

THOMAZ, S. M.; ESTEVES, F. A. **Comunidades de macrófitas aquáticas**. In: ESTEVES, F. A. (Org.). Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 790 p.

TODAR, K. **Pseudomonas aeruginosa**. Disponível em <http://www.bact.wisc.edu/bact330/lecturepseudomonas> > acesso em 10 mar. 2004.

TOREM, M. L., PINO, G. H., MESQUITA, L. M. S., PINTO, G. A. S. **Biosorption of cadmium by green coconut shell powder**. Minerals Engineering. v. 19, n. 5, p. 380–387, 2006.

TSEZOS, M., REMOUDAKI, E., ANGELATOU, V. A Study of the effects of competing ions on the biosorption of metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 38, n. 1, p. 19–29, 1996.

TURGAY, O.C.; GÖRMEZ, A.; BILEN, S. **Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey**.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (HHS). **Centers for Disease Control and Prevention. ATSDR- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY**. Toxicological Profile for Lead, 2007. Disponível em: . Acesso em: abr. 2007.

VALLS, M. et al. **Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil**. Nat. Biotechnol., v.18, p.661-5, 2000.

VARANKA Z., Rojik I., Varanka I., Nemcsók J. & Ábrahám, M. 2001. **Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid.** Comp. Biochem. Physiol. C 128:467-478.

Vasudevan P, Marek P, Daigle S, Hoagland T, Venkitanarayanan KS. **Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets.** J Food Safety 2002; 22(4): 209–17.

Vaz Marecos CV, Ferreira M, Ferreira MM, Barroso MR. **Sepse, meningite e abscessos cerebrais causados por *Citrobacter koseri*.** BMJ Case Rep 2012; doi: 10.1136 / bcr.10.2011.4941.

Vaughn, C. C. and Hakenkamp, C. C. (2001), **The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems.** Freshw. Biol., 46, 1431-1446.

VIANA, E.M. **Fitoextração em solo contaminado com metais pesados.** São Paulo, Universidade de São Paulo, 2011. 133p. (Tese de Doutorado)

VIANA, M. O. **Bioprospecção de bactérias com potencial biotecnológico para biorremediação e monitoramento de praias impactadas da Baía de Guanabara/RJ.** 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa.** 5 ed. Mestre Jou, 1981.

Wellington, E.M.H.; Boxall, A.B.A.; Cross,P.; Feil, E.J.; Gaze, W.H.; Hawkey, P.M.; JohnsonRollings, A.S.; Jones, D.L.; Lee, N.M.; Otten, W.; Thomas, C.M.; Williams, A.P. 2013. **The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria.** *The Lancet Infectious Diseases*, 13: 155–165.

Werkman CH, Gillen GF. **Bactérias que produzem trimetileno glicol.** J Bacteriol 1932; 23: 167-182.

Wrenn B., Venosa AD, **Enumeração seletiva de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos por um procedimento de número mais provável,** Can. J. Microbiol., 1996, 42, 252-259 <http://dx.doi.org/10.1139/m96-037>

WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.38, p.291–316, 2006.

WHO, Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for **Medicinal Plants.** Geneva, 2003.

YAKUBU, M. B. **Biological approach to oil spills remediation in the soil.** African Journal of Biotechnology, Nigeria, v.6, n.24.

ZAGATTO, P. A. **Évaluation écotoxicologique du réservoir Guarapiranga, Brésil, em relation avec le problème des algues toxiques e algicides.** 2005. 86 f. Thèse de doctorat – Université de Metz, Metz.

ZAGATTO P.A. & ARAGÃO M.A. 1995. **Avaliação ecotoxicológica do reservatório Guarapiranga, SP, com ênfase ao problema de algas tóxicas.** São Paulo, CETESB, 78 p.

ZHANG, W. et al. **Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead–zinc mine tailings.** Chemosphere, Oxford, v.87, p.1171–1178, 2012.

ZAMPIERI, Bruna Del Busso. **Ocorrências e distribuição de bactérias resistentes a metais pesados em sedimentos da Baía do Araçá, São Sebastião (SP).** 2015. 79 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/134059>>.

ANEXOS

ANEXO I. Análise do perfil de resistência de bactérias retiradas da água da laguna da Jansen frente a sais dos metais de Cu^{2+} e Pb^{3+} na concentração de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0.5 g/L.

Identificação	Total de Cepas	Metal Cobre Resistencia * (%)		
		3,5g/L	1,5g/L	0.5g/L
Água				
<i>Salmonella</i>	2	50 (n=1)	100 (n=2)	100 (n=2)
<i>Stenatrosphomonas Maltophilia</i>	1	0 (n=0)	0 (n=0)	100 (n=1)
<i>Hafnia alvei</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Citrobacter diversus</i>	9	22 (n=2)	67 (n=6)	100 (n=6)
<i>Enterobacter Aerogenes</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100 (n=1)
Não identificado	2	50 (n=1)	100 (n=2)	100 (n=2)
<i>Escherichia coli</i>	35	57(n=20)	94(n=33)	100(n=35)
<i>Salmonella.cholerasius</i>	1	0 (n=0)	100(n=1)	100(n=1)
<i>Citrobacter; freundii</i>	2	0 (n=0)	100 (n=2)	100 (n=2)
<i>Klebisiella Ozanae</i>	4	100 (n=4)	100 (n=4)	100 (n=4)
<i>Escherichia .fergusonii</i>	5	100 (n=5)	100 (n=5)	100 (n=5)
<i>Enteroacter Cloacae</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Providencia spp</i>	1	100 (n=1)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Klebisiella; Ornithinolytica</i>	1	100 (n=1)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Klebisiella Oxytoca</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Klebisiella; . Pneumoniae</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Citrobacter amalonicus</i>	2	100 (n=2)	100 (n=2)	100 (n=2)
Total	100% (n=70)	53% (n=37)	91% (n=64)	100% (n=70)

Legenda: n: número de cepas; *Resistente: houve crescimento da bactéria; **Sensível: não houve crescimento da bactéria.

Fonte: O autor (2019).

ANEXO II. Análise do perfil de resistência de bactérias retiradas do peixe da laguna da Jansen frente a sais dos metais de Cu^{2+} na concentração de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0.5 g/L.

Identificação	Total de Cepas	Metal Cobre Resistencia * (%)		
		3,5g/L	1,5g/L	0.5g/L
Peixe				
<i>não identificada</i>	1	0 (n=0)	0 (n=0)	100 (n=1)
<i>Citrobacter diversus</i>	3	0 (n=0)	67(n=2)	100 (n=3)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	0 (n=0)	50(n=1)	100 (n=2)
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0 (n=0)	50(n=1)	100 (n=2)
<i>Escherichia coli</i>	15	0 (n=0)	67(n=10)	100(n=15)
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100 (n=1)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1	0 (n=0)	100(n=1)	100 (n=1)
<i>Salmonella cholerasius</i>	2	0 (n=0)	100 (n=2)	100 (n=2)
Total	100 % (n=27)	0%(n=0)	67%(n=18)	100%(n=27)

Fonte: O autor (2019).

Legenda: n: número de cepas; *Resistente: houve crescimento da bactéria.

ANEXO III. Análise do perfil de resistência de bactérias retiradas do sedimento da laguna da Jansen frente a sais dos metais de Cu^{2+} e Pb^{3+} na concentração de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0.5 g/L.

Identificação	Total de Cepas	Metal Cobre		
		Resistencia * (%)		
		3,5g/L	1,5g/L	0.5g/L
Sedimento				
<i>Citrobacter . diversus</i>	4	75(n=3)	100(n=4)	100
<i>Citrobacter freundii</i>	6	67 (n=4)	100 (n=6)	100
<i>Citrobacter . kosei</i>	2	50 (n=1)	100(n=2)	100
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100
<i>Enterobacter . agglomerans</i>	1	0 (n=0)	100 (n=1)	100
<i>Escherichia coli</i>	15	0 (n=0)	40 (n=6)	100
<i>Klebisiella ozanae</i>	2	50 (n=1)	100 (n=2)	100
<i>Klebisiella oxytoca</i>	2	0 (n=0)	0 (n=0)	100
<i>Salmonella. cholerasius</i>	1	0 (n=0)	50 (n=1)	100
Total de Cepas	34	29(n=10)	68 (n=23)	100 (n=34)

Legenda: n: número de cepas; *Resistente: houve crescimento da bactéria.

Fonte: O autor (2019).

ANEXO IV. Análise do perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da laguna da Jansen frente a sais dos metais de Cu^{2+} na concentração de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0.5 g/L.

Espécie (isolada da Laguna da Jansen)	N° cepas	Metal Cobre		
		Resistente* (%)	Resistente* (%)	Resistente* (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	(n=16)	(n=25)	(n=31)
***Total	100%	50%	78%	97%

Fonte: O autor (2019).

Anexo V. Análise do perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* isolados da laguna da Jansen frente ao sal de Pb^{3+} na concentração de 3,5g/L, 1,5 g/L e 0.5 g/L.

Espécie	N° cepas	Metal Chumbo Resistencia		
		3,5g/L	1,5g/L	0,5 g/L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	(n=29)	(n=31)	(n=32)
***Total	100%	91%	97%	100%

Fonte :o autor (2019).