



Avaliação da interação de Zinco, Alumínio, Cobre e Manganês em *Chromobacterium violaceum* (doi:10.4136/ambi-agua.32)

Tânia Cristina Sumita¹; Rogério Santos Pereira¹; Messias Borges Silva²; Luis Carlos Laureano da Rosa³; Mariko Ueno⁴

¹Mestrando Escola de Engenharia Lorena – EEL – Universidade de São Paulo

E-mail: sumitac@terra.com.br; pereira_rs2000@yahoo.com.br

²Escola de Engenharia Lorena – EEL – Universidade de São Paulo

E-mail: messias@dequi.eel.usp.br

³Núcleo de Pesquisa Econômico-Sociais – Universidade de Taubaté

E-mail: laureano@unitau.br

⁴Instituto Básico de Biociências – Universidade de Taubaté

E-mail: mariueno@unitau.br

RESUMO

Os metais traços liberados por atividades extrativistas, mineralógicas, industriais, agroindustriais e pelos resíduos urbanos acumulam-se no meio ambiente, afetando o equilíbrio dinâmico dos ecossistemas onde estão presentes, gerando não apenas um problema ambiental, mas também econômico. Com foco no potencial biotecnológico de *Chromobacterium violaceum*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência dessa cepa a quatro sais metálicos: sulfato de alumínio, sulfato de cobre, sulfato de manganês e sulfato de zinco, bem como um possível efeito de interação de 2^a ordem, utilizando um planejamento fatorial completo 2⁴. Para todos os sais estudados, usou-se a concentração de 100 mg/L ou a ausência do sal. Em uma microplaca de cultura com 96 orifícios, foram realizados os 16 experimentos, em duplicata. Uma suspensão do microrganismo foi preparada como inóculo e diluída em Caldo Nutriente para ser adicionada aos orifícios. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi realizada a leitura da absorbância a 410nm em leitora de microplacas Versamax. Os resultados mostraram alta capacidade de adaptação de *C. violaceum* aos sais estudados. A análise dos resultados pelo teste *t* de Student mostrou que o Manganês foi o único metal que não teve efeito significativo sobre o crescimento de *C. violaceum*, enquanto o Zinco foi o mais ativo, sendo observadas interações positivas envolvendo a presença do Zinco; a interação entre Alumínio e Cobre não foi relevante.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*; sais metálicos; interação.

Evaluation of interaction of Zinc, Aluminum, Copper and Manganese on *Chromobacterium violaceum*

ABSTRACT

The accumulation of metallic salts in the environment resulted from the exploitation, mineralogy, industrial, and agro-industrial activities and urban residues affect the dynamic balance of ecosystems, generating environmental and economic problems. The aim of this study was to evaluate the interaction of *Chromobacterium violaceum* with four metallic salts: aluminum sulphate, copper sulphate, manganese sulphate and zinc sulphate at concentration of 100 mg/L or the absence of them, as well as a possible 2nd order interaction effect, using a complete 2⁴ factorial design. The 16 experimental tests were carried out in microplate culture. Suspension of microorganism was prepared in Nutrient Broth and added to the orifices. After

incubation at 37°C during 24 hours, the absorbance was carried out using a 410nm in Versamax reader. The results showed remarkable bacterial adaptability. Student *t* test analysis showed that manganese was the only metal that did not have significant effect on the population growth of *C. violaceum* while zinc was the most influent. Positive interactions involving zinc was observed, interaction between aluminum and copper was not relevant.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*; metallic salts; interaction.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da resistência dos microrganismos aos metais é importante, não somente para a compreensão da homeostase do metal, mas também para a utilização desses microrganismos em biorremediação.

Os organismos vivos estão constantemente expostos aos metais pesados na natureza, frequentemente presentes na sua forma ionizada; esses íons exercem efeitos tóxicos aos microrganismos, portanto, essa exposição seleciona e mantém as cepas capazes de tolerar seus efeitos danosos. Mecanismos de resistência eficientes têm sido identificados em bactérias e fungos.

O estudo das interações entre microrganismos e metais pode auxiliar no conhecimento das relações tóxicas de metais com organismos superiores como plantas e animais. Alguns sistemas microbianos de tolerância ao metal poderiam ser utilizados em processos biotecnológicos, tais como a biorremediação de ambientes poluídos com metais (Cervantes et al., 2006).

Chromobacterium violaceum é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo habitante de ecossistemas tropicais e sub-tropicais principalmente em água e solo, capaz de sobreviver em condições ambientais adversas. Atualmente a seqüência genômica de *C. violaceum* ATCC 12472 está disponível e possui considerável potencial biotecnológico, como detoxificação ambiental e também para utilização na medicina e agricultura (Carepo et al., 2004 e Duran; Menck, 2001).

Chromobacterium violaceum é um microrganismo de vida livre, normalmente exposto a condições ambientais variadas, possui metabolismo energético versátil (Lima-Bittencourt et al., 2007). É capaz de utilizar varias fontes de energia por meio de suas enzimas oxidases e redutases, o que propicia o seu desenvolvimento em ambientes aeróbios e anaeróbios. Em condições aeróbias é capaz de crescer em meio mínimo suplementado com açúcares simples como glucose, frutose, galactose e ribose, utiliza a via Embden-Meyerhoff e ácidos tricarboxílicos e também o ciclo glioxilato. Em condições anaeróbias, *C. violaceum* metaboliza glicose com produção de ácido acético e fórmico e também utiliza aminoácidos e lipídios como fonte de energia (Creczynski-Pasa; Antonio, 2004).

Muitas proteínas relacionadas à tolerância contra substâncias antimicrobianas, metais pesados, temperatura e presença de ácidos promovem a sobrevivência em condições adversas e enzimas capazes de detoxificar espécies reativas de oxigênio também foram detectadas em *C. violaceum*. Esses fatores poderiam explicar a alta competitividade e habilidade em sobreviver sob diferentes tipos de estresse ambiental (Hungria et al., 2004).

O complexo conjunto de substâncias transportadoras em *C. violaceum*, seguramente é um importante fator que permite que esse microrganismo seja uma bactéria dominante em uma variedade de ecossistemas de regiões tropical e sub-tropical. Sob o ponto de vista biotecnológico, o achado mais importante são os transportadores de metais pesados, os quais podem conduzir à exploração de *C. violaceum* para biorremediação (Grangeiro et al., 2004).

Compondo a matéria inorgânica do planeta os metais encontram-se dispersos na natureza. Dessa forma, eles estão por toda parte e ativamente sendo liberados pelos resíduos urbanos, agroindustriais (Azevedo et al., 2006), industriais (Teitzel; Parset, 2003) e por atividades de mineração (Pereira; Souza, 2005; Gremion et al., 2004; Castro-Silva et al., 2003).

Em alguns ecossistemas, os metais traços podem ser absorvidos facilmente por frações orgânicas e inorgânicas, entretanto, essa incorporação depende da concentração desses metais bem como as características dos componentes do sistema tanto biótico como abiótico. É evidente a bioacumulação de metais traços por peixes e moluscos filtradores, mesmo quando esses contaminantes se encontram em níveis quase não detectáveis, tornando esses organismos impróprios para o consumo humano (Machado et al., 2002; Lee et al., 2000).

Vários metais traços podem ser responsáveis por agravos às doenças neurológicas, sendo o alumínio um metal estudado com relação ao mal de Alzheimer e escleroses, do mesmo modo existe uma discussão sobre a influência do manganês, ferro e cobre sobre o mal de Parkinson (Brown et al., 2005). Entretanto, doses pequenas de certos metais parecem ter algum potencial terapêutico para humanos (Lowry et al., 1979) e animais (Adogwa et al., 2005) que ainda é discutível (Mandinov et al., 2003).

Contudo, Shomron et al. (2002) demonstraram que a adição de zinco inibe o segundo passo do *splicing* do cromossomo em leveduras (formação do RNA mensageiro), podendo haver correlação homóloga em humanos.

Traços de metais se encontram interagindo com biofilmes, sendo de grande interesse no aumento da aderência dessas bactérias ao substrato, podendo assim controlar sua distribuição. Assim, a avaliação tóxica desses metais pode esclarecer a influência sobre a atividade metabólica na engenharia de bioreatores bem como em aplicações médicas (Hu et al., 2005).

De forma inegável, os microrganismos têm co-existido com os metais na História da Terra, tal fato é observado quando metais divalentes ou de transição estão presentes no sítio ativo de muitas enzimas e, até mesmo sendo chave de reações bioquímicas. Entretanto, de ponto de vista fisiológico é possível observar que altas concentrações de metais (Zn, Cu, Mn, Fe, Co, Ni e Mo) passam a se tornar tóxicas para algumas espécies de microrganismos (Valls; Lorenzo, 2002).

Castro-Silva et al. (2003) relatam que subprodutos de extração mineralógica de carvão acidificam as águas que, por sua vez, aceleram o processo de solubilização de metais traços, tornando esses ambientes seletivos para vários microrganismos.

Pereira e Souza (2005) demonstram que em atividades extrativistas minerais é possível, dependendo do tipo da rocha da região, ter um valor médio de presença de vários metais na rede de drenagem principal, onde foi destacada a presença de 3,80 – 4,35% de Al; 39,0 – 40,25 mg/Kg de Cu; 1134 – 1205 mg/Kg de Mn e 93 – 79,65 mg/Kg de Zn.

Tendo em vista que as tecnologias convencionais de tratamento, tais como: precipitação, oxidação ou redução, filtração, tratamento eletroquímico, tecnologia de membranas e recuperação evaporativas, são pouco eficientes ou extremamente caras para operacionalização (Franchi; Sígolo, 2004) e que há capacidade adaptativa entre os bacilos Gram-negativos de resistência a certas concentrações de metais traços (Valls; Lorenzo, 2002) torna a biorremediação uma técnica de grande potencial para ambientes contaminados com metais (Nascimento; Chartone-Souza, 2003).

Neste trabalho foi analisada a interação de *C. violaceum* recém-isolada de poço da região rural de Pindamonhangaba, SP com metais traços o que adiciona um caráter de aplicação prática desta pesquisa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Metais, meios e microrganismo utilizados

Foi utilizada a cepa de *Chromobacterium violaceum* recém-isolada de água de poço no interior do estado de São Paulo, Brasil. A cepa foi identificada utilizando o método Api20E (BioMerieux).

Os sais estudados foram: sulfato de zinco, sulfato de alumínio, sulfato de cobre e sulfato de manganês (Merck). Para se obter o meio Caldo Nutriente (Difco) adicionado desses metais, prepararam-se soluções concentradas (1600 mg/L) de sais contendo esses íons metálicos, que foram adicionadas ao meio de cultura segundo um planejamento fatorial completo em dois níveis de concentração.

2.2. Planejamento Fatorial Completo 2⁴

Por meio desse modelo foi possível observar os efeitos principais e suas interações utilizando-se 16 experimentos diferentes entre si, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Combinação dos 16 tratamentos experimentais (Fatorial 2⁴).

Experimento	Sulfato de Zinco (mg/L)	Sulfato de Alumínio (mg/L)	Sulfato de Cobre (mg/L)	Sulfato de Manganês (mg/L)
01	0	0	0	0
02	100	0	0	0
03	0	100	0	0
04	100	100	0	0
05	0	0	100	0
06	100	0	100	0
07	0	100	100	0
08	100	100	100	0
09	0	0	0	100
10	100	0	0	100
11	0	100	0	100
12	100	100	0	100
13	0	0	100	100
14	100	0	100	100
15	0	100	100	100
16	100	100	100	100

2.3. Preparo do inóculo

A cepa de *C. violaceum* foi reativada em Caldo Nutriente (Difco) durante 24 horas a 37°C em ambiente aeróbio e, em seguida, foi repicada em Agar Sangue (Difco) para a sincronização celular e incubada novamente por 24 horas a 37°C em ambiente aeróbio. A partir desse crescimento microbiano foi preparada uma suspensão celular em solução fisiológica com turbidez equivalente ao tubo número 1 da escala de MacFarland, correspondendo a, aproximadamente, 3×10^8 UFC/mL. Essa suspensão foi diluída até 10^{-6} e as três últimas diluições decimais foram semeadas em superfície com inóculo de 0,1mL com alça de Drigalski, em duplicata. As placas que continham de 30 a 300 colônias foram contadas para estimar a proporção de células presente na suspensão.

A suspensão celular foi diluída a 10^{-2} em Caldo Nutriente e inoculado nos orifícios da placa em volumes de 0,1mL, exceto nos orifícios destinados à leitura do branco, nos quais foram colocadas 0,1mL de Caldo Nutriente.

2.4. Preparo dos experimentos

Foram preparados em tubos de ensaio esterilizados numerados de 1 a 16 de acordo com a matriz experimental. Em cada tubo foi adicionado 0,25mL de solução concentrada de sulfato metálico (1600 mg/L) e o volume foi completado a 1mL com água destilada estéril. Em seguida, foi adicionado 1mL de Caldo Nutriente preparado com concentração dupla em todos os tubos, obtendo-se o meio com 16 combinações diferentes de metais.

Numa placa de cultura de células com tampa e estéril, foram distribuídos 0,1mL dos experimentos de modo a se obter duplicatas de cada condição e 16 leituras de branco.

Posteriormente, o Caldo Nutriente contendo o inóculo foi adicionado (0,1mL) a todos os experimentos e o mesmo caldo estéril foi adicionado aos brancos, completando volume de 0,2mL em cada orifício.

Após 24 horas de incubação a 37°C em ambiente aeróbio, foi realizada a leitura da absorbância a 410nm de cada orifício da placa em uma leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices).

Os resultados obtidos, em absorbância, foram comparados entre os grupos estudados por meio do teste *t* de Student (alfa = 5%).

3. RESULTADOS

A contagem de UFC/mL proveniente da suspensão preparada mostrou que a suspensão continha $2,8 \times 10^8$ UFC/mL, confirmando o número de células desejado como inóculo de $2,8 \times 10^6$ UFC/mL, e cada orifício recebeu uma carga microbiana de aproximadamente $2,8 \times 10^5$ UFC/mL, que seria suficiente para iniciar o crescimento microbiano.

Visando obter observação de reprodutibilidade e garantindo maior confiabilidade dos resultados, os experimentos foram realizados em duplicata para todos os pontos estudados, seguindo o planejamento fatorial completo 2^4 , como apresentado na Tabela 2. A microplaca utilizada para os experimentos apresentou tonalidades diferentes de violeta em cada condição experimental, o que indica a diferença na intensidade do crescimento microbiano, tendo em vista a coloração natural de *C. violaceum*.

Tabela 2. Valores de absorvância obtidos em 24h de incubação no espectro de 410nm.

Nº Ex.	Fatores				Respostas	
	Zn	Al	Cu	Mn	Réplica 1	Réplica 2
1	-1	-1	-1	-1	0,8477	0,9776
2	1	-1	-1	-1	0,0254	0,0098
3	-1	1	-1	-1	0,7299	0,7591
4	1	1	-1	-1	0,2864	0,0772
5	-1	-1	1	-1	0,4565	0,4410
6	1	-1	1	-1	0,0511	0,0268
7	-1	1	1	-1	0,3890	0,3573
8	1	1	1	-1	0,0961	0,0962
9	-1	-1	-1	1	0,5981	0,6010
10	1	-1	-1	1	0,0472	0,0278
11	-1	1	-1	1	0,6405	0,6342
12	1	1	-1	1	0,2660	0,0928
13	-1	-1	1	1	0,5254	0,5167
14	1	-1	1	1	0,1266	0,0848
15	-1	1	1	1	0,5703	0,5744
16	1	1	1	1	0,2437	0,1359

A média global foi de 0,354 com um desvio padrão bem pequeno de 0,007. A Tabela 3 apresenta o valor da média (\bar{X}) e do desvio padrão (S) para cada experimento.

Tabela 3. Valores da média e desvio padrão de cada experimento.

Experimento	(\bar{X})	S
1	0,913	0,0920
2	0,018	0,0100
3	0,745	0,0210
4	0,182	0,1480
5	0,449	0,0110
6	0,039	0,0170
7	0,373	0,0220
8	0,096	0,0001
9	0,600	0,0020
10	0,038	0,0140
11	0,637	0,0040
12	0,179	0,1220
13	0,521	0,0060
14	0,106	0,0300
15	0,572	0,0030
16	0,190	0,0760

Para se conhecer o nível de interferência de cada fator, foi calculado o efeito para cada fator e interações de 2º ordem. Os resultados estão representados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Cálculo do efeito para cada fator.

Zn	Al	Cu	Mn
-0,49531	0,036594	-0,12056	0,00364375

Tabela 5. Cálculo do efeito de interação de 2ª ordem.

Zn-Al	Zn-Cu	Zn-Mn	Al-Cu	Al-Mn	Cu-Mn
0.075256	0.124131	0.040831	0.00734	0.042181	0.104331

Os valores *t* de Student para cada fator e interação foram obtidos, dividindo-se o módulo efeito pelo erro, denominado de *t*, calculado apresentado na Tabela 6, bem como seus *p*-valores.

Tabela 6. Valores de *t* calculado.

Fatores	<i>t</i> calculado	<i>p</i> -valor
Zn	69,60865	0,0000
Al	5,14276	0,0001
Cu	16,94256	0,0000
Mn	0,51208	0,6161
Zn-Al	10,57626	0,0000
Zn-Cu	17,44498	0,0000
Zn-Mn	5,73829	0,0000
Al-Cu	1,03207	0,3184
Al-Mn	5,92801	0,0000
Cu-Mn	14,66236	0,0000

Considerando o grau de liberdade de 15 e o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) é possível observar que exceto o efeito do Mn ($p=0,6161$) e a interação Al-Cu ($p=0,3184$) todas as outras interações apresentam efeitos significativos ($p>0,05$).

4. DISCUSSÃO

As concentrações utilizadas nos experimentos estão acima dos índices recomendados pela CETESB (São Paulo, 2006) para qualquer dos metais utilizados, no entanto, ainda menores do que os índices mais altos de poluição indicados por Pereira e Souza (2005), mesmo assim, essas concentrações se mostraram significativas no efeito sobre o crescimento microbiano de *C. violaceum*.

Vale a pena destacar o efeito causado pela presença de sulfato de zinco, no experimento de número 2, em que foi observado o menor valor de absorvância, podendo ser considerado o metal que mais afetou o crescimento do microrganismo. Porém, nos experimentos em que esse mesmo metal foi adicionado de outros, os valores foram significativamente maiores, indicando que há interação entre os efeitos dos metais. O modelo proposto poderia ser utilizado em uma situação de tratamento de um efluente em que haja zinco, por exemplo, além de uma grande carga orgânica, para viabilizar uma fermentação microbiana pela suplementação do meio com outros íons metálicos, para que, posteriormente, fosse realizado o tratamento químico para retirar o metal pesado.

Os mecanismos que envolvem a resistência aos metais traços, bem como suas interações necessitam de esclarecimento. Nascimento e Chartone-Souza (2003) sugerem que haja relação entre a resistência desses microrganismos aos metais traços e aos antibióticos.

Como microrganismo de vida livre, a *C. violaceum* está exposta às condições ambientais variadas. Essas variações requerem grande adaptabilidade e sistemas de proteção. Esses fatores poderiam explicar a alta competitividade e habilidade em sobreviver sob diferentes tipos de estresse ambiental (Hungria et al., 2004), tal como a presença de metais no ambiente.

Há interação entre os diferentes metais testados e interferência no crescimento de *C. violaceum* e o zinco foi o metal que mais influenciou o crescimento de *C. violaceum*. Para que o microrganismo consiga sobreviver em ambiente na presença de metais como ocorreu neste estudo é necessário que este possua enzimas e transportadores de metais pesados (Grangeiro et al., 2004).

5. CONCLUSÃO

Estudos mais detalhados precisam ser realizados, entretanto, este trabalho indica que *C. violaceum* é capaz de crescer em ambiente com altas concentrações dos metais traços testados, portanto, sob o ponto de vista biotecnológico, essa bactéria possui potencial para ser utilizada para biorremediação.

6. REFERÊNCIAS

- ADOGWA, A.; MUTANI, A.; RAMANAN, A.; EZEOKOLI, C. The effect of gastrointestinal parasitism on blood copper and hemoglobin levels in sheep. **Can. Vet. J.**, v. 46, p. 1017-21, 2005.
- AZEVEDO J; SILVA FILHO, EV; DAMASCENO, RN; LIMA, MW. Metais pesados nos compostos de lixo urbano da usina de Irajá, Município do Rio de Janeiro. Rede jornal do meio ambiente [on line] <<http://www.jornaldomeioambiente.com.br/JMA-Banners.asp>>. Acesso em 3 jun. 2006.
- BROWN, R.; LOCKWOOD, A. H.; SONAWANE, B. R. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. **Environ. Health Perspect.**, v. 113, p. 1250-1256, 2005.
- CAREPO, M. S.; AZEVEDO, J. S.; PORTO, J. I.; BENTES-SOUZA, A. R.; BATISTA, J. S.; SILVA, A. L. et al. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. **Gen. Mol. Res.**, v. 3, n. 1, p. 181-94, 2004.
- CASTRO-SILVA, M. A.; LIMA, A. O. S.; GERCHENSKI, A. V.; JAQUES, D. B.; RODRIGUES, A. L.; SOUZA, P. L.; RÖRIG, L. R.. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 45-7, 2003.
- CERVANTES, C.; ESPINO-SALDAÑA, A. F.; ACEVEDO-AGUILAR, F.; LEÓN-RODRIGUEZ, I. L., RIVERA-CANO, M. F. et al. Microbial interactions with heavy metals. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 48, n.2, p.203-10, 2006.
- CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANTONIO, R.V. Energetic metabolism of *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, n. 1, p. 162-6, 2004.
- DURAN N.; MENCK C. F. *Chromobacterium violaceum* : a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 201–222, 2001.

- FRANCHI, J. G.; SÍGOLO, J. B. **A utilização de turfa como absorvente de metais pesados**. 198f. 2004. Tese (Doutorado em Geociências) - Programa de Pós-Graduação em Geoquímica e Geotectônica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- GRANGEIRO, T. B.; JORGE, D. M.; BEZERRA, W. M.; VASCONCELOS, A. T.; SIMPSON, A. J. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Gen. Mol. Res.**, v. e, n. 1, p. 117-33, 2004.
- GREMION, F.; CHATZINOTAS, A.; KAUFMANN, K.; SILGLER, W. V. ; HARMS, H. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 48, p. 273-83, 2004.
- HU, Z.; HIDALGO, G.; HOUSTON, P. L.; HAY, A. G.; SHULER, M. L.; ABRUÑA, H. D. et al. Determination of spatial distributions of zinc and active biomass in microbial biofilms by two-photon laser scanning microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 7, p. 4014-21, 2005.
- HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M. F.; GUIMARÃES, C. T.; JARDIM, S. N.; GOMES, E. A.; VASCONCELOS, A. T. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Gen. Mol. Res.**, v. 3, n. 1, p. 102-116, 2004.
- LEE, B. G.; GRISCOM, S. B.; LEE, J. S.; CHOI, H. J.; KOH, C. H.; LUOMA, S. N. et al. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. **Science**, v. 287, p. 282-4, 2000.
- LIMA-BITTENCOURT, C. I.; ASTOLFI-FILHO, S.; CHARTONE-SOUZA, E.; SANTOS, F. R.; NASCIMENTO, A. M. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiol.**, v. 7, n. 58-66, 2007.
- LOWRY, S. F.; GOODGAME Jr, J. T.; SMITH Jr., J. C.; MAHER, M. M.; MAKUCH, R. W.; HENKIN, R. I.; BRENNAN, M. F. Abnormalities of zinc and copper during total parenteral nutrition. **Ann. Surg.**, v. 189, n. 1, p. 120- 7, 1979.
- MACHADO, I. C.; MAIO, F. D.; KIRA, C. S.; CARVALHO, M. F. H. Pd, Cd, Hg, Cu and Zn in mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* Cananéia stuary, São Paulo – Brazil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 13-18, 2002.
- MANDINOV, L.; MANDINOVA, A.; KYURKCHIEV, S.; KYURKCHIEV, D.; KEHAYOV, I.; KOLEV, V.; SOLDI, R. et al. Copper chelation represses the vascular response to injury. **PENAS**, v. 100, n. 11 p. 6700 – 05, 2003.
- NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONE-SOUZA, E. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. **Gen. Mol. Res.**, v. 2, n. 1, p. 92-101, 2003.
- PEREIRA, L. B. F.; SOUZA, N. J. A. Distribuição de metais pesados e cianeto total em sedimentos de drenagem e pilha de rejeito na mina de ouro e tungstênio de Bonfim, Lajes, RN. 2005. X In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOQUÍMICA, 10 E SIMPÓSIO DE GEOQUÍMICA DOS PAISES DE MERCOSUL, 2., 2005, Porto de Galinhas. Anais... Recife: SBG, 2004.

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-Agua**, Taubaté, v. 2, n. 3, p. 44-53, 2007. (doi:10.4136/ambi-agua.32)

SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **ISTO - Índice de substâncias tóxicas e organolépticas**. 2006. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/indice_iap_isto.asp>. Acesso em: 06 jun. 2006.

SHOMRON, N.; MALCA, H.; VIG, I.; AST, G. Reversible inhibition of the second step of splicing suggests a possible role of zinc in the second step of splicing. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 19, p. 4127-37, 2002.

TEITZEL, G. M.; PARSEK, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environm. Microbiol.**, v. 69, n. 4, p. 2313-20, 2003.

VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 26, p. 327-38, 2002.