

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização de bactérias resistentes a metais pesados e o potencial para
biorremediação**

Thaiane Defalco

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2022**

Thaiane Defalco
Bacharelada em Ecologia

**Caracterização de bactérias resistentes a metais pesados e o potencial para
biorremediação**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Defalco, Thaiane

Caracterização de bactérias resistentes a metais pesados e o potencial para biorremediação / Thaiane Defalco. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2022.

95 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Rejeito de mineração 2. Estuário 3. Metais tóxicos 4. Genoma bacteriano 5. Biorremediação I. Título

A todos os cientistas que tentam fazer desse mundo
um lugar melhor para as futuras gerações

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus que habita em mim. Essa luz criadora que me mantém no controle emocional e mental, me dá forças pra encarar os obstáculos da vida, dando discernimento, visão e consciência para que eu esteja em plena sintonia com as leis universais.

Ao meu companheiro Leandro pelo companheirismo, amor e por toda paciência e dedicação ao meu lado ao longo dessa jornada. Aos meus pais Carlos e Mari por sempre acreditarem na minha capacidade e por tantos ensinamentos. À minha vovó Yolanda minha rainha, meu porto seguro, a marinheira da minha vida, sempre me guiando e dando norte para o barco da vida. À minha irmã Thais e meus sobrinhos Thiago e Lívia, mesmo longe estão sempre em meus pensamentos.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Fernando Dini Andreote pela oportunidade de realizar o mestrado. Agradeço por ter acreditado no meu potencial e também pela confiança que me concedeu. Ao grupo de alunos que tive o prazer de compartilhar ideias.

À Dr^a Ana Luisa S. Vasconcelos por todo conhecimento compartilhado.

À Dr^a Kátia Nuñez-Montero pelos ensinamentos, amizade e companhia, embora a pandemia tenha obrigando-a a voltar ao Chile, mesmo longe colaborou demais para meu crescimento. Obrigada pelos conselhos, pelas correções, sugestões e ajuda no desenvolvimento de todo o meu trabalho, vou leva-los sempre comigo.

À Denise Mescolotti pelo amor, zelo e cuidado com nosso laboratório e por toda colaboração aos meus estudos. Ao Fernando por estar sempre disposto em ajudar nos percalços que enfrentamos no dia a dia dentro do laboratório. Agradeço a todos os alunos do Laboratório de Microbiologia do Solo pela receptividade, paciência e pela flexibilidade para que eu pudesse desenvolver minhas análises. À Dr^a Marina Colzato e à Bia do Laboratório de Análises Ambientais por me orientar quando mais me encontrei perdida.

Às funcionárias do setor da limpeza pelos bons papos que tivemos na copa e pelo cafezinho de todo o dia.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, sem a qual seria praticamente impossível a conclusão da presente dissertação, principalmente durante esses dois anos de pandemia do Sars-Cov-2.

À Universidade de São Paulo e aos professores dos Programas de Pós-Graduação por compartilharem conhecimentos e experiências que contribuíram para o meu crescimento profissional.

À toda minha família e amigos que sempre me apoiaram durante o decorrer do trabalho com muito amor, paciência, compreensão e carinho.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

EPIGRAFE

"Aja como se a máxima da tua ação fosse para ser transformada, através da tua vontade, em uma lei universal da natureza."

(Immanuel Kant)

*"Anda, quero te dizer nenhum segredo
Falo desse chão da nossa casa
Vem que tá na hora de arrumar*

*Tempo, quero viver mais duzentos anos
Quero não ferir meu semelhante
Nem por isso quero me ferir*

*Vamos precisar de todo mundo
Pra banir do mundo a opressão
Para construir a vida nova
Vamos precisar de muito amor
A felicidade mora ao lado
E quem não é tolo pode ver*

*A paz na terra amor
O pé na terra
A paz na terra amor
O sal da*

*Terra, és o mais bonito dos planetas
Tão te maltratando por dinheiro
Tu que és a nave nossa irmã*

*Canta, leva tua vida em harmonia
E nos alimenta com seus frutos
Tu que és do homem, a maçã*

*Vamos precisar de todo mundo
Um mais um é sempre mais que dois
Para melhor juntar as nossas forças
É só repartir melhor o pão
Recriar o paraíso agora
Para merecer quem vem depois*

*Deixa fluir o amor
Deixa crescer o amor*

*Deixa fluir o amor
O sal da terra"*

Beto Guedes

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Contaminação por rejeito de mineração	19
2.2. Metais pesados e bactérias resistentes	20
2.3 Biorremediação e mecanismos de resistência	23
2.4 Genes de resistência.....	25
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivo específico	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Área de estudo	33
4.2. Coleta.....	34
4.3. Isolamento e seleção de isolados sob diferentes condições de metais pesados... 35	
4.4. Identificação dos isolados.....	37
4.4.1. Extração e quantificação do DNA genômico	37
4.4.2. PCR do gene 16S rDNA.....	38
4.4.3. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciamento 16S rDNA.....	38
4.4.4. Sequenciamento e montagem genômica dos isolados S3 e S21	39
4.5. Obtenção das curvas de crescimento dos isolados selecionados	40
4.6. Determinação dos efeitos de Mn, Zn e Co sobre o desenvolvimento e potencial de biorremediação	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Isolamento dos microrganismos com resistência ao Manganês	43
5.2. Seleção dos isolados de bactérias sob diferentes concentrações de metais pesados e antibióticos.....	45
5.3. Identificação dos isolados.....	50
5.4. Sequenciamento e montagem do genoma	56
5.4.1. <i>Bacillus safensis</i> 3A.....	56
5.4.2. <i>Mucilaginibacter</i> sp. 21P.....	58
5.5. Curva de crescimento de <i>B. safensis</i> 3A na presença de Co, Mn e Zn.....	61

5.6. Capacidade remoção dos metais do meio de cultura	66
5.6.1. <i>Bacillus safensis</i> 3A	66
5.6.2. <i>Mucilaginibacter</i> sp. cepa S21	69
6. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74

RESUMO

Caracterização de bactérias resistentes a metais pesados e o potencial para biorremediação

A contaminação ambiental ocasionada por atividades antrópicas, provoca alterações no funcionamento e nas estruturas de diversas comunidades presentes no ambiente, modificando profundamente diversos ecossistemas existentes em todo o mundo. Dentre essas atividades, a indústria de mineração se destaca pelos desastres ambientais. As recidivas emissões e o acúmulo do rejeito com contaminantes, como metais pesados, comprometem os ecossistemas, pois os metais pesados em altas concentrações causam toxicidade, persistência, bioacumulação e biomagnificação. Visando o desenvolvimento de ferramentas para a recuperação e remediação de áreas impactadas por rejeito de mineração contendo metais pesados, vemos a necessidade de compreender como os microrganismos poderiam colaborar na restauração de ambientes estuarinos. Encontrar microrganismos resistentes que foram expostos a esse tipo de toxicidade se torna ainda mais relevante, aumentando a chance de isolamento de bactérias com potencial para aplicações biotecnológicas. Associado à crescente preocupação ambiental, o presente estudo isolou e identificou bactérias a partir de amostras de sedimento estuarino contaminado com rejeito de mineração de ferro contendo metais pesados. Entre os isolados resistentes a metais pesados e antibióticos, os gêneros *Bacillus* e *Mucilaginibacter* foram identificados pelo sequenciamento do gene RNAr 16S. Foi selecionado um representante de cada gênero para o sequenciamento genômico e para verificação do potencial desses microrganismos na biorremediação dos metais pesados zinco (Zn), manganês (Mn) e cobalto (Co). Através dos dados genômicos foi possível identificar diversos genes que conferem funções para a resistência aos metais pesados e antibióticos, mostrando o potencial biotecnológico dessas cepas. A cepa 3A de *Bacillus safensis* apresentou capacidade de remover metais pesados em altas concentrações em caldo LB (45,98% de Zn, 24,8% de Mn e 44,97% de Co). A cepa 21P de *Mucilaginibacter* sp. apresentou remoção dos metais pesados Co e Mn em concentrações mais baixas (52,7% de Co e 42,46% de Mn). Trata-se de microrganismos com muitos atributos a serem explorados. Dessa forma, essas bactérias presentes em ambientes contaminados e que passam por pressões seletivas, desenvolvem mecanismos com grande potencial biotecnológico que podem ser utilizados como bioindicadores e na biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-chave: Rejeito de mineração, Estuário, Metais tóxicos, Genoma bacteriano, Biorremediação

ABSTRACT

Characterization of heavy metal resistant bacteria and the potential for bioremediation

The environmental contamination driven by anthropic activities causes changes in the functioning and structures of various communities in the environment, profoundly modifying several ecosystems around the world. Among these activities, the mining industry stands out for its environmental disasters history. The recurrence of emissions and the accumulation of tailings extensively compromise the ecosystems due to the high concentration of contaminants such as heavy metals, causing toxicity, persistence, bioaccumulation, and biomagnification. In order to develop new tools for the recovery and remediation of areas impacted by mining tailings, we highlight the need to understand how microorganisms could collaborate in the restoration of affected estuarine environments. In this context, finding resistant microorganisms that have been exposed to this type of toxicity becomes even more relevant, increasing the chance of isolating bacteria with potential for biotechnological applications on bioremediation. In response to this growing environmental concern, the present study isolated and identified bacteria from estuarine soil samples contaminated with iron mining tailings. Among the isolates, we found bacteria resistant to heavy metals and antibiotics. The genera *Bacillus* and *Mucilaginibacter* were identified by 16S rRNA gene sequencing, showing a resistant phenotype. One representative of each genus was selected for genome sequencing to deepen their identity and potential in the bioremediation of the heavy metals zinc (Zn), manganese (Mn), and cobalt (Co). The genomic data allowed the identification of several genes that might confer functions for resistance to heavy metals and antibiotics, showing the biotechnological potential of both strains. Moreover, *Bacillus safensis* species (strain 3A) showed the ability to remove heavy metals at high concentrations in nutrient broth (45.98% of Zn, 24.8% of Mn, and 44.97% of Co). Meanwhile, *Mucilaginibacter* sp. strain 21P showed heavy metals removal at lower concentrations (52.7% Co and 42.46% Mn). Based on these results, those microorganisms have many attributes to be explored. Thus, bacteria in contaminated environments might have undergone selective pressure, developing mechanisms with great biotechnological potential that can be used as bioindicators or/and for bioremediation of contaminated environments.

Keywords: Mining tailings, Estuary, Toxic metals, Bacterial genome, Bioremediation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rejeito de minério de ferro da Mineradora Samarco chegando a Foz do Rio Doce.	33
Figura 2 – Mapa da região da Bacia do Rio Doce (A); Pontos Amostrados no estuário (B);..	33
Figura 3 – Água do Rio Doce após a chegada da lama tóxica do rejeito (A); Rejeito depositado sobre sedimento estuarino (B). Foto: Queiroz et al., 2018.....	34
Figura 4 – Amostras de sedimento e rejeito agregado (RES); Sedimento sem contaminação (PRIS); Rejeito (REJ)	34
Figura 5 – Amostras a partir da diluição seriada inoculada em placa de Petri e inoculação do Mn no meio de cultura com filtro de membrana.	35
Figura 6 – Placas de Petri com meio de cultura e Mn inoculadas com técnica de estriamento para obtenção de colônias puras.	36
Figura 7 – Placas de Petri com antibiótico inoculadas com colônias resistentes a metais pesados e antibiótico (Foto: Vasconcelos ALS (sem publicação).....	37
Figura 8 – Meio de Cultura com tratamentos RES (RS), REJ (RJ) e PRIS (PR) inoculados na concentração 4.500 mg/L de Mn	43
Figura 9 - Crescimento bacteriano em placas de Petri com cinco concentrações de Mn (mg/L) e amostras dos sedimentos PRIS, RES e REJ inoculadas	44
Figura 10. Árvore filogenética de junção de vizinhos baseada em sequências do gene 16S rRNA mostrando a posição filogenética dos isolados. Fonte: Vasconcelos et al. (2022)	52
Figura 11 - Curva de Crescimento de <i>B. safensis</i> 3A em meio controle e com concentrações de Co.....	62
Figura 12. Curva de crescimento de <i>B. safensis</i> 3A em meio controle e com concentrações de Mn.....	63
Figura 13. Curva de crescimento de <i>B. safensis</i> 3A em meio controle e com concentrações de Zn.....	64
Figura 14. Curva de crescimento de <i>B. safensis</i> 3A em meio controle e com concentrações Mix dos metais Zn, Co e Mn	65
Figura 15. Taxa de remoção de Co (A), Mn (B) e Zn (C) em meio LB por <i>B. safensis</i> 3A	67

Figura 16. Remoção dos metais pesados associados em meio LB Mix (I, II, III, IV) por <i>B. safensis</i> 3A.....	68
Figura 17. Taxa de remoção de Co (A) e Mn (B) no meio R2A por <i>Mucilaginibacter</i> sp. 21P.....	70
Figura 18. Remoção dos metais pesados associados em meio R2A Mix (I, II) por <i>Mucilaginibacter</i> 21P.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes de resistência aos metais pesados e antibióticos.....	28
Tabela 2. Resistência dos 21 isolados à concentração mínima inibitória dos metais pesados e antibióticos.....	46
Tabela 3. Comparação e identificação das sequências do gene 16S rDNA.	51
Tabela 4. Aplicações e ecologia dos isolados neste estudo descritos na literatura	53

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental ocasionada por atividades antrópicas provoca alterações no funcionamento e nas estruturas de diversas comunidades presentes no ambiente, modificando profundamente diversos ecossistemas existentes em todo o mundo (Doelman e Haanstra, 1984; Steffen, 2011; Berendonk et al., 2015; Sawut et al., 2018). Das atividades com graves alterações e modificações no ambiente, a indústria da mineração se destaca pelos desastres ambientais e socioeconômicos (Duarte et al. 2021; Owen et al., 2020). Processando e beneficiando milhões de toneladas de minério anualmente no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, a indústria de mineração gera cerca de 90% de resíduos sólidos e líquidos, os quais são em sua maioria armazenados em barragens (Dunbar, 2017; Falagán et al., 2017). Esta atividade está associada ao despejo de metais pesados no ambiente (por exemplo, Fe, Zn, Co, Mn, Cu) (Palanques et al., 1999; Lancellotti e Stotz, 2004; Wang et al 2019). O problema se agrava sobretudo com os rompimentos das barragens de rejeitos, por exemplo nos casos dos desastres de Mariana-MG e Brumadinho-MG, os quais liberaram milhões de metros cúbicos de lama tóxica no ambiente (Segura et al., 2016; Hatje et al., 2017; Quadra et al., 2019a).

As recidivas emissões e o acúmulo do rejeito com contaminantes vêm comprometendo os ecossistemas e a saúde humana (Hadjiliadis, 1997; Moore e Ramamoorthy, 1984; Mason, 2013; Tang et al., 2014; Ray et al., 2014; Lima et al., 2020, Queiroz et al., 2021b). Quando essa lama de rejeito se encontra com as bacias hidrográficas, os contaminantes presentes tendem a acumular nos leitos dos rios e nos sedimentos estuarinos e oceânicos (Hatje et al., 2017). Uma vez o rejeito sedimentado, este material tóxico pode novamente suspender-se na coluna da água através de perturbações – correntes marítimas, movimentação das marés, tempestades, bioturbação e atividades antrópicas – resultando em recorrentes contaminações de longo prazo por metais pesados (Tjahjono et al., 2018; Mahiques et al., 2014; Fields, 2001; Simón et al., 2001; Gati et al. 2016; Machado et al., 2016; Queiroz et al., 2018, 2022; Barcellos et al., 2022).

A poluição crônica por metais pesados nos sedimentos dos estuários se acumula amplamente gerando toxicidade, bioacumulação e resistências em macro e microrganismos, sugerindo uma possível biodisponibilidade desses metais (Gabriel et al. 2020; Bernardino et al., 2019; Pinto et al., 2015; Seiler e Berendonk 2012; Yang e Rose 2003; Queiroz et al., 2018). Em baixas concentrações, certos metais atuam como nutrientes essenciais (por exemplo, Zn, Fe, Mn, Co), sendo incorporados em vários processos biológicos em nível celular, como atividade dos canais de membrana, estabilizadores de cofatores enzimáticos, proteínas, DNA e RNA (Ji e Silver, 1995; Nies, 1999; Seiler e Berendonk, 2012). Porém,

todos os metais em altas concentrações têm efeitos tóxicos. Nos microrganismos, a toxicidade ocorre através de mudanças na conformação estrutural de proteínas e ácidos nucleicos, no equilíbrio osmótico e por interferir na fosforilação oxidativa (Bruins et al., 2000; Mani e Kumar 2014; Poole e Gadd, 1989).

Apesar da presença de níveis tóxicos de metais pesados no ambiente afetarem adversamente a saúde humana e dos demais organismos, diversos microrganismos se adaptam com sucesso à presença de vários metais. Essa adaptação ocorre por uma variedade de sistemas de resistências – como plasmídeos, cromossomos e transposons – e desenvolvem mecanismos de defesa com a formação de complexos metálicos, redução de íons e com bomba de efluxo da célula (Bruins et al., 2000; Nies 1999; Nies e Silver 1995; Dua et al., 2002).

Em decorrência da capacidade dos microrganismos reduzirem ou removerem a toxicidade dos metais pesados em ambientes contaminados, estudos mostram que eles são importantes ferramentas na remediação ambientes contaminados (Aka e Babalola 2017; Chen et al., 2018; Zafar et al., 2007; Rehman e Anjum 2011; Muñoz et al., 2012; Dash et al., 2013; Das et al., 2009). Bactérias que estão presentes nesses ambientes contaminados passam por pressões seletivas e desenvolvem mecanismos que podem ser utilizados como bioindicadores (Diaz-Ravina e Baath 1996; Hussain, 2019; Zampieri et al., 2016).

Devido à baixa mobilidade por processos naturais, os metais podem permanecer no ambiente por um longo tempo, resultando em biomagnificação e bioacumulação (Tchounwou et al. 2012; Chaudhary et al. 2014; Voica et al. 2016; Queiroz et al., 2021b; Sá et al., 2021). A utilização de bactérias resistentes a metais pesados, para atuar na recuperação e biorremediação de metais tóxicos de ambientes contaminados, vem mostrando vantagens nas últimas décadas, devido ao baixo custo e eficiência (Valls e Lorenzo 2002; Koçberber e Dönmez 2007; Muñoz et al. 2012; Hansda et al. 2016; Ameen et al. 2020). Entretanto, o uso de bactérias na biorremediação deve ser abordado com cautela. Isso por que, estudos mostram que bactérias resistentes a metais pesados também podem adquirir genes de resistência a antibióticos (ARGs) (Allen et al., 1977; Wireman et al. 1997; Yurieva et al. 1997; McArthur e Tuckfield 2000; Matyar 2012; Chen J et al. 2019).

Os ARGs podem ser transferidos horizontalmente pela comunidade microbiana através dos mesmos plasmídeos ou elementos genéticos móveis que transportam os genes de resistência a metais pesados (MRGs) (Wiedenbeck e Cohan 2011; Lu e Lu 2020; Timoney et al. 1978; Wright et al. 2006). Entre os mecanismos de transferência horizontal de genes (HGT) que contribuem para a flexibilidade e adaptação as mudanças no ambiente, a

conjugação bacteriana acelera a disseminação dos genes no ambiente. Contudo, essa contribuição entre as bactérias e os fatores bióticos e abióticos que envolvem a transferência de ARGs no ecossistema do solo, e a expressão e o funcionamento dos genes adquiridos precisam ser melhor compreendidos (Garbisu et al. 2017).

O impacto que os metais causam na comunidade microbiana torna-se um tópico proeminente frente a preocupação ambiental, devido sua importância no funcionamento do ecossistema, no ciclo biogeoquímico e na particularidade do microbioma presente em ambientes estuarinos, que possuem uma composição de macro e microrganismos característicos desses ambientes (Dash et al. 2013; Andreote et al. 2012). Assim, encontrar microrganismos resistentes que foram expostos a esse tipo de toxicidade se torna ainda mais relevante, aumentando a probabilidade de isolamento de bactérias potenciais para aplicações biotecnológicas, visando a remediação e recuperação de áreas contaminadas por metais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Contaminação por rejeito de mineração

No Brasil, as atividades ligadas à mineração representam uma importante fração da economia do país. Construídas desde os anos de 1930, as barragens são edificadas para receber o rejeito, subproduto proveniente do beneficiamento do minério. Das 786 barragens com a função de conter rejeitos de mineração, 54,8% estão localizadas no Estado de Minas Gerais (CBDB 2011; DNPM 2018), onde se encontra o Quadrilátero Ferrífero, depósito mineral mais importante do Brasil (Vial 1988). De acordo com Agência Nacional de Mineração (ANM, 2020), o Brasil tem 44 barragens de rejeitos consideradas de alto risco (devido a sua conservação ou modo de construção, o risco alto de rompimento e o dano associado). Em estudo realizado por Bowker e Chambers (2015), foi identificado que as ocorrências de desastres com rompimentos de barragens de rejeito vêm crescendo no mundo.

As atividades de mineração geram graves alterações e modificações no ambiente, por exemplo supressão da vegetação, exposição do solo aos processos erosivos, alterações na quantidade e qualidade dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos por substâncias lixiviadas e, carregadas ou contidas, contaminação por efluentes das áreas de mineração, tais como óleos, graxa, metais pesados, que afetam a saúde humana e demais macro e microrganismos. Somado a isso, os riscos iminentes de desastres ambientais e socioeconômicos e os graves danos às unidades de conservações intensificam os impactos gerados por este setor (Mechi e Sanches 2010; Duarte et al., 2021; Owen et al., 2020; Bernardino et al., 2019; Durán et al., 2013).

A lama de rejeito está associada, de modo significativo, à poluição ambiental por metais pesados (Segura et al., 2016; Sun et al., 2018; Quadra et al., 2019a; Duarte et al., 2021; Young et al., 2021). De acordo com Costa (2001), as associações minerais presentes em depósitos explorados (seja de ferro ou ouro) apresentam alto potencial tóxico, devido aos metais traços, e relata que além das alterações de parâmetros físico-químicos, as alterações nas concentrações dos metais pesados como Cd, Ni, Cr, Co, Hg, V, Zn, As, Pb, Cu e Li também podem ocorrer (a depender do minério e estéreis envolvidos).

No Brasil, a maior tragédia ambiental, social e econômica ocorreu em 2015, com rompimento da barragem de rejeito de Fundão da empresa Samarco no município de Mariana-MG, lançando 50 milhões de m³ da lama rejeito enriquecida com Fe na bacia do rio Doce. A lama poluente percorreu 663 km contaminando importantes rios como o Gualaxo do Norte, do Carmo e Doce. Seguindo até a foz do rio Doce, a lama tóxica chegou ao estuário de Regência

(município de Linhares-ES), onde avançou pelo Oceano Atlântico, contaminando o sedimento estuarino e oceânico, causando graves danos às áreas protegidas (IBAMA 2015ab; Marta-Almeida et al., 2016).

Segundo Queiroz et al (2018), a lama depositada no sedimento estuarino de Regência afetou a composição do sedimento, sendo composta principalmente por Fe, Mn, Cr, Zn, Ni, Cu, Pb e Co. Os resultados revelaram valores até 24 vezes maiores para Mn e até 200 vezes maiores para Zn e Cu e alerta para biodisponibilidade dos metais traços associados com oxihidróxidos de Fe (que podem ser solubilizados pelas condições anóxicas transitórias ou cíclicas e pela atividade microbiana) podendo possivelmente acarretar em contaminações crônicas pela liberação dos metais pesados.

Hatje et al. (2017) avaliaram os impactos do derramamento do rejeito de ferro da SAMARCO por meio dos metais tóxicos. Os resultados obtidos mostram que o Fe, As, Hg, Mn excedeu os critérios de qualidade para o sedimento, e o transporte de metais dissolvidos foi observado para Fe, Ba e Al (devido à falha da barragem, à mineração de Fe e à mineração artesanal de Au na região). Ainda, é importante ressaltar para o alto risco de recidivas contaminações pela erosão, remobilização e transporte de partículas contaminadas que podem favorecer entradas de material particulado em suspensão e metais, ameaçando os serviços do ecossistema.

De acordo com Sá et al. (2021), a contaminação por metais no estuário do rio Doce foi intensificada com o derramamento de rejeitos da barragem do Fundão. O estudo mostrou um aumento significativo nas concentrações de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, V e Zn ao longo dos meses que sucederam a chegada da lama de rejeito ao estuário e as concentrações excederam os níveis de segurança nacionais e internacionais de qualidade da água. As análises dos sedimentos do rio Doce e as amostras originais dos rejeitos apresentaram composição similar para Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, V e Zn, ressaltando assim, a possibilidade do uso desses elementos como marcadores geoquímicos dos rejeitos do Fundão para o monitoramento dos impactos ambientais decorrentes deste desastre ambiental.

2.2. Metais pesados e bactérias resistentes

Metais pesados são elementos que apresentam densidade maior que 5g/cm^3 . Dos elementos presentes na tabela periódica, 21 são não-metais, 16 são metais leves e 53 são metais pesados (Lide, 2005). Segundo Nies (1999), destacam-se 17 metais pesados, sendo

com baixa toxicidade o ferro, manganês e molibdênio, importantes elementos traços indispensáveis a homeostasia celular. Os elementos tóxicos zinco, níquel, cobre, vanádio, cobalto, tungstênio e crômio com alta e moderada importância como elementos traço. Arsênio, prata, antimônio, cádmio, mercúrio, chumbo e urânio apresentam função limitada, e devem ser enquadrados como elementos tóxicos.

Nies (1999) descreve o funcionamento de sistemas de resistência a metais e como esses metais se comportam no interior da célula dos microrganismos. A maioria dos metais pesados apresentam orbitais *d* incompletos (elementos de transição). Essas orbitais *d* permitem aos cátions de metais pesados formarem compostos complexos que podem vir a apresentar atividade redox, tendo papel fundamental como elemento traço em reações bioquímicas. Contudo, em elevadas concentrações, no interior da célula, os íons de metais pesados formam complexos inespecíficos promovendo efeitos tóxicos. Embora os metais pesados ocorram em ambientes naturais, a presença de metais pesados como contaminantes nos ecossistemas é resultado primariamente de atividades antropogênicas (Trevors et al., 1985).

Segundo Nies (1999), os cátions de metais pesados (sobretudo com elevado número atômico) ao entrarem nas células, tendem a se ligar à grupos sulfidrilas, levando a inibição da atividade das enzimas que regulam reações intracelulares específicas. De acordo com Silver e Misra (1988) e Mindlin et al., (2001) bactérias com capacidade de sobreviver a concentrações tóxicas apresentam mecanismos genéticos específicos de resistências aos metais.

Nas últimas décadas, diversos estudos toxicológicos analisaram a resistência e a sensibilidade de bactérias aos metais pesados isoladas de diferentes habitats (Duxbury e Bicknell, 1983; Jonas, 1989; Hiroki, 1992; Starzecka e Bednarz, 1993; Doelman et al., 1994; Bruins et al., 2000; Fashola et al., 2016; Aka e Babalola, 2017; Shuaib et al., 2021). A contaminação ambiental por metais pesados ocasionada por atividades antrópicas provoca alterações no funcionamento e nas estruturas das comunidades presentes no meio ambiente, modificando profundamente as comunidades microbianas e suas atividades (Timoney et al., 1978; Doelman et al., 1994; Guzzo e DuBow 1994; Berendonk et al., 2015; Pinto et al., 2015; Wright et al., 2006; Zampieri et al., 2016; Chen Y et al., 2018).

Apesar da presença de níveis tóxicos de metais pesados no ambiente, que geralmente exercem ação inibitória sobre os microrganismos pelo bloqueio de grupos funcionais essenciais, deslocamento de íons metálicos essenciais, ou pela modificação das conformações ativas de moléculas biológicas, diversos microrganismos se adaptam com sucesso à presença destes elementos. Essa adaptação ocorre por uma variedade de sistemas de resistências, como

plasmídeos, cromossomos e Transposons, que conferem mecanismos de defesa com a formação de complexos metálicos, redução de íons e com bomba de efluxo da célula (Gadd e Griffiths, 1977; Wood e Wang, 1983; Bruins et al., 2000; Nies, 1999; Nies e Silver, 1995).

Segundo Melo e Azevedo (2008), devido as fortes ligações iônicas, os elementos traços são capazes de se ligar a constituintes celulares dos microrganismos, deslocando os metais essenciais de seus sítios de ligação. Utilizando geralmente vias de transporte específicas, os microrganismos levam os metais da membrana celular ao citoplasma. Um dos mecanismos de adaptação microbiana à presença a contaminação é através da transformação dos metais em formas menos tóxicas, imobilizando-os na superfície da célula ou em polímeros intracelulares (precipitação ou biometilação).

Pérez (2006) relata a capacidade de alguns microrganismos afetarem a especiação dos metais, através da capacidade efetora ou mediadora nos processos de imobilização e mobilização, influenciando as fases solúveis e insolúveis de espécies metálicas. A mobilização dos metais consiste na passagem de um estado insolúvel (i. e. forma de sulfetos ou óxidos metálicos) encontrados em formas sólidas para um estado solúvel (forma aquosa), onde a capacidade de transformação dos metais em formas solúveis ocorre através da lixiviação, metilação, quelação e sideróforos microbianos. Na imobilização, os microrganismos são capazes de bioacumular intracelularmente os compostos, através da transformação dos metais que estão presentes em formas solúveis em meios aquosos, para estado insolúvel na forma sólida.

No ambiente, a resistência aos metais pesados podem selecionar, de modo semelhante, variantes resistentes aos antibióticos. Os genes de resistência geralmente estão presentes nos mesmos elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e bacteriófagos). Estudos supõem que a pressão seletiva pela presença de metais pesados contribui para a co-seleção direta de resistência aos antibióticos (Foster, 1983; McIntosh et al., 2008; Martins et al., 2014; Chen et al., 2019; Lu e Lu, 2020).

O estuário do rio Doce, de acordo com Sá et al. (2021), apresentava contaminação por metais pesados (As, Ba, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb) antes da chegada do rejeito da barragem do Fundão, indicando que o estuário vem sendo impactado pelos longos anos das operações de mineração, além da contaminação dos sedimentos (Fe, Hg, Mn, Pb e Zn) que foi atribuída a descarga de efluentes domésticos e industriais ao longo da bacia do rio Doce (Santolin et al., 2015).

Lu e Lu (2020) analisaram sedimentos estuarinos contaminados e detectaram que a diversidade de genes de resistência a antibióticos estava positivamente relacionada com os

níveis de poluição. Os resultados sugerem que a resistência em bactérias é desencadeada pela aquisição de genes através da transferência horizontal de genes, promovendo a resistência multi-antibiótica em bactérias de sedimentos estuarinos. Para Allen et al. (1977), bactérias resistentes tanto aos metais pesados quanto aos antibióticos podem ser facilmente isoladas do ambiente natural, com maior abundância para locais poluídos. Seus resultados revelam que bactérias resistentes a antibióticos estão amplamente distribuídas no ambiente estuarino e que existe uma associação de resistência a antibióticos com metais pesados. Estudo realizado por Zhu et al. (2017) em escala continental em estuários mostraram a associação da abundância e disseminação de genes de resistência a antibióticos com as atividades antrópicas.

De acordo com Castro-Silva et al. (2003), a contaminação dos ecossistemas por metais pesados acarreta em uma pressão seletiva, selecionando microrganismos capazes de sobreviver nas condições contaminantes. Portanto, encontrar microrganismos resistentes que foram expostos a esse tipo de toxicidade se torna ainda mais relevante, aumentando a probabilidade de isolamento de bactérias potenciais para aplicações biotecnológicas, visando a biorremediação e recuperação de áreas contaminadas por metais.

2.3 Biorremediação e mecanismos de resistência

O processo conhecido como biorremediação tem como base a capacidade dos organismos de converterem substâncias tóxicas em compostos menos nocivos ou inertes (Tortora et al, 2017). A biorremediação com microrganismos é apresentada como uma tecnologia ecologicamente aceitável, devido seu baixo consumo de energia, alta eficiência e segurança ambiental, na qual busca-se remediar áreas contaminadas, utilizando atividade microbiana para degradar compostos orgânicos e metais pesados, resultando na mineralização dos contaminantes ou na transformação de metabólitos (Kumar et al., 2011; Bergamasco et al., 2018).

A absorção dos metais pelos microrganismos ocorre por meio de uma variedade de mecanismos. Compreender esses mecanismos é fundamental para melhor eficiência dos processos de biorremediação (Fosso-Kankeu e Mulaba-Bafubiandi, 2014). Microrganismos desenvolveram a capacidade de se proteger da toxicidade de metais pesados através de mecanismos como absorção, adsorção (biossorção), oxidação, metilação e redução (Haferburg e Kothe, 2007). De acordo com Kavamura e Esposito (2010) algumas bactérias usam mecanismos de tolerância, desintoxicação de metais pesados e podem produzir agentes quelantes que ligam a metais e reduzem sua toxicidade.

Segundo Bruins et al. (2000), alguns mecanismos de resistência a metais pesados envolvem exclusão por barreira permeável, sequestro intra e extracelular, bombas de efluxo ou transporte ativo e redução da sensibilidade dos alvos celulares aos íons metálicos.

Caracterizado como uma tentativa do microrganismo proteger os componentes celulares essenciais que são sensíveis aos metais, o mecanismo de exclusão por barreira permeável promove alterações na parede e membrana celular. Um exemplo é a exclusão de Cu^{2+} (II), que resulta na alteração da produção da proteína porina em um canal de membrana pela *E. coli* B, alteração que constitui na mutação de um gene, reduzindo a permeabilidade da membrana aos íons metálicos (Rouch et al., 1995; Ji e Silver, 1995).

Bombas de efluxo e transporte ativo são mecanismos que visam exportar metais tóxicos do citoplasma. Esse mecanismo pode ser codificado por plasmídeos e cromossomos. Ao entrarem nas células, por sistemas normais de transportes, os metais não essenciais são imediatamente exportados (Bruins et al., 2000).

Definido como acumulação de metais dentro do citoplasma, o sequestro intracelular tem a função de prevenir a exposição de componentes essenciais das células. Esse tipo de mecanismos de resistência foi descrito por Silver e Ji (1994) presente no gênero *Synechhoccus*, onde há produção de metalotioneína (proteína que apresenta forte ligação com Zn (II) e Cd (II)) expresso por genes *smt A* e *smt B*.

O sequestro extracelular é um mecanismo que consiste na produção e excreção de proteínas que se ligam fortemente a alguns tipos de metais. Descrito por Murata et al. (1995) em espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, esse mecanismo reduz a absorção de Ni (II) pela excreção de grandes quantidades de glutatona (proteína com afinidade ao metal).

A redução de sensibilidade de alvos celulares ocorre em microrganismos que se adaptam à presença de metais tóxicos pela alteração da sensibilidade de componentes celulares essenciais (Rouch et al., 1995). Mutações ocorrem nos componentes, alterando sensibilidade a metais, sem comprometer as funções básicas. Mergeay (1991) descreve este tipo de adaptação em *E. coli* expostas à Cd (II), onde as cepas desenvolveram mecanismos de reparo do DNA.

A detoxificação enzimática de metais para formas menos tóxicas é um mecanismo realizado por enzimas. As bactérias conseguem transformar os metais em formas menos danosas ao meio ambiente e a biota. Este mecanismo é bem descrito na literatura para

resistência ao mercúrio. Misra (1992) e Ji e Silver (1995) relatam este mecanismo em bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp) e Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Thiobacillus ferrooxidans*). O conjunto de genes que formam o operon *mer* confere resistência ao Hg (II), detoxificando, transportando e autorregulando a resistência. Esses genes, ao codificarem proteínas de transportes e periplasmáticas de ligação, são responsáveis pela captura do Hg (II) no ambiente ao redor da célula e por levarem o metal para o citoplasma para a detoxificação. Este é um tipo de mecanismo muito importante na biorremediação.

2.4 Genes de resistência

A resistência conferida aos microrganismos à maioria dos metais pesados ocorre, frequentemente, pelo sistema de efluxo, que permite a extrusão e sequestro dos metais. De modo geral, todos os sistemas bacterianos de resistência aos metais tóxicos são compostos por agrupamentos de genes que funcionam como operons (unidade de transcrição de mRNA) regulados por proteínas (Silver e Phung, 2005). Um exemplo é o efluxo mediado pelo gene *czcAB* que confere resistência a cobalto (Co), zinco (Zn) e cádmio (Cd). Sugere-se que este sistema possa diminuir a concentração dos cátions dos metais pesados no citoplasma e periplasma (Nies, 2003). Algumas ações de remoção do Zn de ambientes contaminados ocorre pela aquisição de resistência conferida por plasmídeos ou através da evolução de mecanismos de resistência. Por exemplo, Gaballa et al. (2002) descrevem o *ZosA* (P-type ATPase), um sistema de captação de íons de Zn expresso em condições de estresse oxidativo. Através da bomba de efluxo ATPase (CPx), conhecida como *CadA*, o efluxo de altas concentrações de Zn é facilitado. Cavaco et al. (2010) relatam que o gene *czrC* é um dos principais associados a resistência ao Zn e pode estar associado a resistência ao antibiótico metilicina em *Staphylococcus aureus*.

No caso do arsênio (As), dois estados de oxidação tem grande relevância biológica: As^{5+} (arsenato) e As^{3+} (arsenito). Ambos são quimicamente similares aos nutrientes necessários para metabolismo microbiano. O arsenito, semelhante ao fosfato, atua como inibidor competitivo de muitas enzimas que utilizam fosfato, e o arsenato é absorvido pelos sistemas de transporte de fosfato (Yang et al., 2012). O sistema de efluxo do As inclui proteínas multirresistentes e trocadores bacterianos (*Acr3* e *ArsB*). Foi descrito em uma espécie do gênero *Bacillus* a presença do operon *arsABCD*, onde os genes *arsA* e *arsB* tem atividade ATPase translocadora, o gene *arsC* transforma o As^{3+} para As^{5+} , o gene *arsD* gera

uma proteína que atua como metalochaperona chave para o transporte seguro de íons metálicos dentro das células e o gene *arsR* gera uma proteína que age como repressora (Yang et al., 2012; Musingarimi et al., 2010).

Bactérias também desenvolveram componentes genéticos que conferem mecanismos de resistência ao cromo (Cr). Além da resistência conferida por plasmídeos, a redução do Cr⁶⁺ para o Cr³⁺ é sugerida como mecanismo de resistência regulado pela enzima cromato redutase (ChrR) (Cervantes et al., 2001). Esses componentes são constituídos de genes associados ao transporte de íons de cromato, que incluem o gene *chrA*. Este gene atua como um transportador de efluxo que exporta o cromato do citoplasma ou periplasma para fora da célula (Pimentel et al., 2002). Morais et al. (2011) descrevem a alta resistência ao cromo (Cr) conferida em bactérias que possuíam os genes *chrA* e *chrB* localizados no DNA cromossômico.

Já o mercúrio (Hg), um dos elementos mais tóxicos existentes, no ambiente acumula-se em solos, sedimentos, água, atmosfera e nos organismos vivos. Processos industriais e mineração são as principais vias de poluição deste metal (Driscoll et al., 2013). Bactérias apresentam diversos mecanismos para sobreviverem à presença do Hg. Os genes responsáveis pela resistência ao Hg são observados em plasmídeos e transposons/integrans. Os genes de resistência e operon de resistência ao Hg são conferidos pelo sistema Mer nos microrganismos. O operon Mer é regulado pela detecção de Hg por uma proteína ativadora, a MerR, responsável pela redução do Hg²⁺ em Hg⁰, os genes *merA* e *merB* atuam como enzimas mercúrio redutase e mercúrio liase, respectivamente. O transporte de íons de Hg envolve os produtos dos genes *merP*, *merT* e *merC* e na metilação incluem *hgcA* e *hgcB* (Foster, 1987; Silver e Misra, 1988).

Amplamente distribuído na Terra, o manganês (Mn) é um elemento essencial aos organismos vivos. Importante como cofator e regulador de processos biológicos, porém em altas concentrações pode ser prejudicial (Gadd, 2010). Segundo Queiroz et al. (2021b), o Mn é um potencial risco à saúde ambiental e humana no estuário do rio Doce, devido à contaminação crônica após a chegada da lama de rejeito proveniente do rompimento da barragem da SAMARCO. Microrganismos podem remover o Mn do meio através de sistemas reguladores de metais específicos. A concentração intracelular nas células bacterianas é mediada por MntR, uma proteína metalorreguladora específica ao Mn. Sugere-se que a MntR também possa detectar e regular ferro (Fe). MntR regula a expressão de bombas de efluxo (MneP e MneS) quando há altas concentrações de Mn intracelular. Em condições limitantes

de Mn, ocorre a expressão de um sistema de captação do metal dependente de ATP (*mntABCD*) e transportador associado a prótons MntH. Em concentrações extremas de Mn observa-se a transcrição de duas proteínas da família TerC (YybP e YkoY), ambas ajudam a prevenir a intoxicação pelo metal (Guedon et al., 2003; Paruthiyil et al., 2020).

Desempenhando um papel importante em processos biológicos dos organismos vivos, o Cobre (Cu) acaba sendo um problema de poluição ambiental que prejudica os ecossistemas (Rehman et al., 2019). A adaptação de algumas bactérias para sobreviver na presença de elevados níveis de Cu exige a expressão do operon *copZA* (*copZ* atua como uma chaperona de Cu que transfere Cu para os produtos de *copA* (*copA* contribui para absorção do Cu por ATPase de efluxo - CPx). O operon *copZA* é regulado por CsoR, um repressor que é responsável pela indução específica do Cu no sistema de efluxo (Smaldone e Helmann 2007).

Pertencente à família CDF (facilitadores de difusão de cátions) o gene *fieF* atua como uma bomba de efluxo de ferro (Fe). Estudos mostraram que a expressão do gene levou a diminuição do acúmulo de Fe nas células de *E. coli*, além de ser necessário na desintoxicação de Fe em células que foram forçadas a acumular muito ferro, onde a transcrição do *fieF* está correlacionada com a concentração de Fe. Há também a possibilidade de *fieF* atuar como um sistema, não apenas do efluxo de Fe, mas também é capaz transportar Zn de maneira próton-dependente. O Fe em altas concentrações catalisa a reação de Haber-Weiss, gerando radicais hidroxila a partir de superóxido e peróxidos de hidrogênio, onde a oxidação do óxido de ferro (II) também resulta em produção de radicais hidroxila pelo peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) (Grass et al., 2005).

Os microrganismos, além de expressarem genes de resistência à metais pesados que os permitem sobreviver em ambientes poluídos por metais pesados, também apresentam várias estratégias para neutralizar os efeitos tóxicos dos antibióticos (Salam, 2020). Por exemplo, o gene *fosB* confere resistência a fosfomicina (Cao et al., 2001), a resistência à bacitracina é conferida por transportador BcrABC (Cao e Helmann, 2002), o gene *ybxL* apresenta uma atividade intermediária entre proteínas de ligação à penicilina e uma beta-lactamase (Colombo et al., 2004), os genes *ebrA* e *ebrB* conferem resistência multidrogas (Kikukawa et al., 2006), a resistência a tetraciclina é expressa pelo gene *tetR* (Auerbach et al., 2007). Além de metais e antibióticos microrganismos codificam genes para neutralizarem compostos químicos. Staub et al. (2012) mostraram que o gene *yhhS* codifica um mecanismo de resistência bacteriana ao herbicida glifosato a partir da superexpressão do transportador de efluxo de membrana (MFS).

Transportadores MFS são enquadrados como uma das maiores famílias de transportes multidrogas bacterianos.

Cabral et al. (2016) revelam a presença de bactérias com genes de resistência aos antibióticos em estuários poluídos e prístino. Assume-se que comunidades microbianas que apresentem genes de resistência e suas proteínas associadas sirvam como bioindicadores de ambientes impactados por metais pesados e antibióticos.

Algumas evidências sugerem que a resistência aos metais também podem estar associadas a resistência aos antibióticos através de mecanismos de co-seleção, como a resistência cruzada onde um único mecanismo confere resistência a antibióticos e metais – bombas de efluxo –, a co-resistência que é mediada através de genes de resistência diferentes que são localizados em elementos genéticos moveis (plasmídeos e transposons), e a co-regulação que ocorre a partir de proteínas reguladoras que controlam a expressão dos genes de resistência aos metais conferindo resistência aos antibióticos (Pal et al., 2017; Salam, 2020). Alguns genes que conferem resistência aos metais e aos antibióticos encontrados na literatura são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Genes de resistência aos metais pesados e antibióticos

Contaminante	Proteína/Gene	Mecanismo de ação	Referencia
Cádmio	<i>czcAB</i>	Efluxo	Nies, 2003;
	<i>czcD</i> <i>CadA</i>	ATPase transportadora de cádmio	Solovieira e Entian, 2002; Ayangbenro e Babalola, 2020;
Zinco	<i>CadA</i>		
	<i>Zur</i> <i>ZosA</i> <i>yciABC</i> <i>yedHI-yceA</i> <i>czrCD</i>	Efluxo Biossorsão	Cavaco et al., 2011 Gaballa et al., 2002
Cobalto	<i>czcAB</i>		
	<i>czcD</i> <i>CadA</i>	Efluxo	Nies, 2003
Cobre	<i>copZA</i>		
	<i>CsoR</i> <i>ycnJ</i> <i>tcrB</i>	Efluxo por chaperona Plasmídeo	Smaldone e Helmann 2007 Amachawadi et al. 2013
Cromo	<i>chrAB</i>	Efluxo	Ayangbenro e Babalola, 2020;
	<i>ChrR</i>	Captação Redução enzimática	Cervantes et al., 2001; Pimentel et al., 2002; Morais et al., 2011;
Mercúrio	<i>MerR</i>		
	<i>merAB</i> <i>merPTC</i> <i>hgcAB</i>	Redução enzimática Transporte íons Metilação	Foster, 1987; Silver e Misra, 1988 Dash e Das, 2012
Manganês	<i>MntR</i>		
	<i>mnePS</i>	Efluxo	Guedon et al., 2003; Paruthiyil et al., 2020

	<i>mntH</i> <i>mntABCD</i> TerC (<i>yybP</i> / <i>ykoY</i>		
Ferro	<i>fieF</i>	Efluxo	Grass et al., 2005
Arsênio	<i>acr3</i> <i>arsB</i> <i>arsABCDR</i>	Efluxo Redução	Yang et al., 2012; Musingarimi et al., 2010
Níquel	<i>czcD</i> CitM	Efluxo	Nies, 2003 Moore et al., 2005
Chumbo	Pbr <i>pbrAB</i>	Efluxo	Hynninen et a., 2009 Silver e Phung, 2005
Proteína multirresistente	<i>ebrAB</i> Bmr3 NorM Stp <i>marR</i> MexA <i>mdtLAB</i>	Efluxo	Masaoka et al., 2000 Ohki e Muraya, 1997 Morita et al., 1998 Ramón-García et al., 2007 Beggs et al., 2019 Li et al., 2004 Perreten et al., 2001
Tetracycline resistance protein, class BC	<i>tetA</i> <i>tetA</i>	Efluxo Transposons conjugativos	Møller et al., 2016
Proteína de resistência à múltiplas drogas putativa	<i>emrY</i> <i>emrB</i>	Efluxo	Tanabe et al., 1997
Proteína de resistência à Colistina	<i>emrAB</i>	Efluxo	Lin et al., 2017
Proteína de resistência à Biciclomicina	<i>bcr</i>	Transportador de membrana (MF)	Nishino e Yamaguchi, 2001
Proteína reguladora de resistência à Meticilina	MecI	Elemento genético móvel	Peacock e Paterson, 2015
Proteína permease de resistência à Lineamicina	<i>lnrLMN</i>	Transportador ABC	Stubbendieck e Straight, 2017
Proteína de resistência à Bleomicina	<i>ble</i>	Elemento genético móvel	Mori et al., 2008
Proteína de resistência à Fosmidomicina	<i>fsr</i>	Efluxo	Fujisaki et al., 1996
Resistencia à Beta-Lactamático	<i>bla</i>	Efluxo Plasmídeo/Transposon	Giles e Reynolds, 1979 Naidoo et al., 2020

Cavaco et al. (2011) mostraram que existe uma associação entre a resistência ao Zn e a resistência à meticilina em isolados de *Staphylococcus aureus* CC398. Isolados que apresentavam o gene *czcC*, que confere resistência ao Zn e Cd, foram resistentes à meticilina. Amachawadi et al. (2013) revelaram a forte associação entre isolados com resistência ao Cu, conferida pelo gene *tcrB*, e resistência a tetraciclina, gene *tet*. O estudo sugere que possa existir uma relação entre bomba de efluxo usada para homeostase do Cu e a tolerância à vancomicina, apoiando a hipótese da resistência cruzada. Estudos realizado por McIntosh et al. (2008) identificaram a correlação entre genes de múltipla resistência a antibióticos [*tetA/tetR* (tetraciclina), *floR* (florfenicol), *strA/strB* (estreptomicina) e *sulIII* (sulfonamida)] e o Hg (genes *merD* e *merB*) associados a plasmídeos em *Aeromonas salmonicida*. Os resultados sustentam a hipótese de que pressões seletivas ambientais associadas a poluição por metais pesados e uso de antibióticos em ecossistemas terrestres contribuem para o desenvolvimento de mecanismos de resistência que acabam sendo disseminados para ecossistemas aquáticos (Wright, 2007; Alonso et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Associado a crescente preocupação com o meio ambiente, o presente estudo visou isolar e identificar microrganismos a partir de amostras de sedimento estuarino contaminado com rejeito de mineração de ferro contendo metais pesados, que apresentem resistência a metais e avaliar a capacidade de reduzir ou remover estes poluentes de ambientes contaminados.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar microrganismos com resistência aos metais pesados zinco, manganês, cádmio e cobalto;
- Verificar a suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos;
- Identificar os isolados resistentes aos metais avaliados;
- Sequenciar e montar o genoma completo de dois isolados;
- Verificar a presença de genes de resistências aos metais e antibióticos;
- Identificar o potencial dos isolados para biorremediação de ambientes contaminados com rejeito de mineração ricos em metais pesados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

A área amostral estuarina está localizada em Regência, um distrito do município de Linhares, no Estado do Espírito Santo, Brasil (latitude 19° 23' 28" S, longitude 40° 04' 20" O) (Figura 1 e 2). A região do estudo é caracterizada por um clima tropical úmido (Alvares et al., 2013), classificado de acordo com a Classificação climática de Köppen-Geiger (Peel et al., 2007). Existem duas estações distintas, inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março); a temperatura média anual é de 22°C e as temperaturas máximas e mínimas são de 28 a 30°C e 15°C, respectivamente (Albino et al., 2006; Bernardino et al., 2015). O estuário nessa região é essencial para a subsistência das populações locais.



Figura 1 – Rejeito de minério de ferro da Mineradora Samarco chegando a Foz do Rio Doce.
Foto: CCS/CAPES

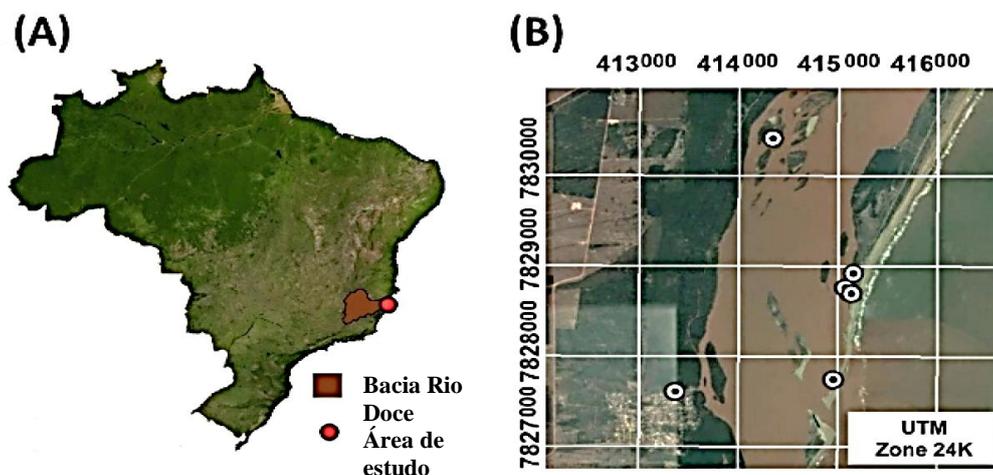


Figura 2 – Mapa da região da Bacia do Rio Doce (A); Pontos Amostrados no estuário (B);

4.2. Coleta

Amostras de sedimentos que foram utilizadas neste estudo são oriundas do Projeto Bentos do Rio Doce (CAPES-FAPEMIG-FAPES-CNPq-ANA N° 6/2016 (Figura 3). Para esse experimento, foram selecionadas amostras de sedimentos (a 10 cm de profundidade) de três áreas do estuário do rio Doce (ES): i) amostra de sedimento sem contaminação de rejeito (PRIS); ii) amostra de rejeito depositado sobre sedimento (REJ); iii) amostra de sedimento e rejeito agregado (RES) (Figura 4). As amostras foram coletadas após dois anos da chegada do rejeito no estuário.

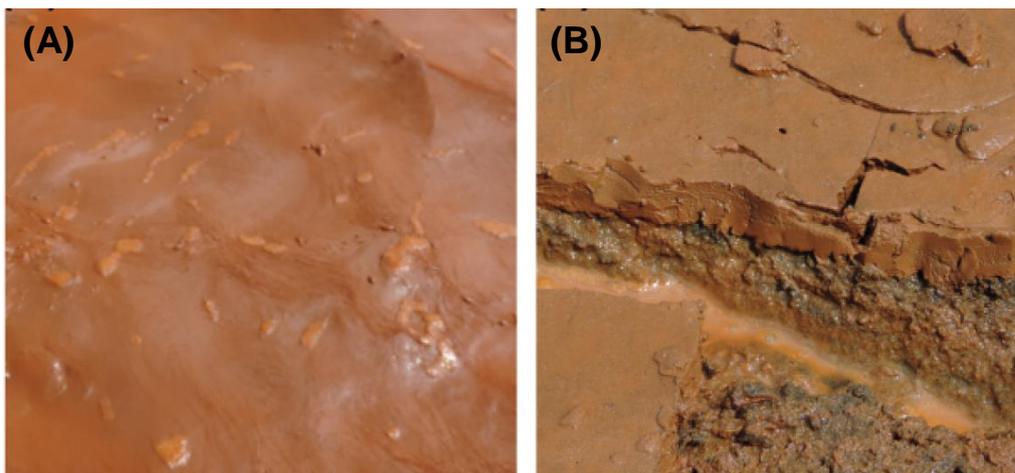


Figura 3 – Água do Rio Doce após a chegada da lama tóxica do rejeito (A); Rejeito depositado sobre sedimento estuarino (B). Foto: Queiroz et al., 2018



Figura 4 – Amostras de sedimento e rejeito agregado (RES); Sedimento sem contaminação (PRIS); Rejeito (REJ)

4.3. Isolamento e seleção de isolados sob diferentes condições de metais pesados

Foram amostrados 5 g de cada tratamento (Sedimento sem contaminação, Rejeito, e Rejeito com sedimento) e adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 45 mL de solução salina (NaCl 0,8%). Posteriormente, as amostras foram colocadas no agitador orbital a 150 rpm a 25 °C por 1 h. Após esse procedimento, foram realizadas diluições seriadas em solução de NaCl 0,8% até a diluição 10^{-5} . A partir das diluições, foram feitas inoculações, em duplicatas, em placas de Petri contendo meio de cultura TSB ágar (Caldo Soja Tripticaseína) com pH 7,0 e crescentes concentrações de manganês (300, 600, 1.600, 3.200, 4.500 mg/L), um metal presente em alta concentração no sedimento estuarino do Rio Doce com efeito genotóxico (Gomes et al. 2019). Para evitar contaminação das placas foi adicionado o agente antifúngico Nistatina, na concentração de 1 mg/mL, ao meio de cultura, como descrito por Matyar et al. (2008) com modificações.

Diferentes concentrações de metal foram preparadas dissolvendo os sais de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ em água destilada para obter concentrações de metal puro de Mn, Cd, Co e Zn. Soluções estoques foram preparadas com 1.000 mg/L de cada sal e esterilizadas a 120 °C durante 20 min e mantidas a 4 °C por no máximo um mês (Hassen et al, 1998). O Mn foi adicionado ao meio, por meio de adição de solução estéril, obtida com auxílio de filtros de membrana de 0,22 μm Millex[®] em seringa (Figura 5). Após as sementeiras as placas de cultivos foram armazenadas por 24-72 h a 25 °C.

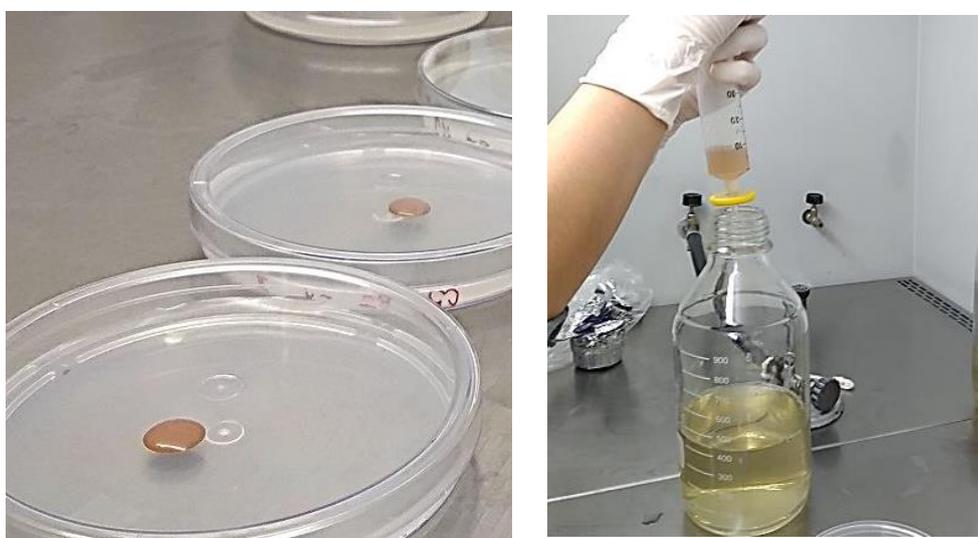


Figura 5 – Amostras a partir da diluição seriada inoculada em placa de Petri e inoculação do Mn no meio de cultura com filtro de membrana.

Posteriormente, foram realizados cálculos de unidade formadora de colônia (UFC). Colônias com morfologias diversas foram selecionadas e isoladas, através da técnica de estriamento em placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultura e concentração do Mn. Total de 21 colônias foram repicadas, a partir da técnica de estriamento, até obtenção de colônias puras (Figura 6).



Figura 6 – Placas de Petri com meio de cultura e Mn inoculadas com técnica de estriamento para obtenção de colônias puras.

As 21 colônias resistentes selecionadas nas maiores concentrações de Mn foram coletadas e inoculadas em placas contendo Zn (250 e 500 mg/L), Cd (150 e 300 mg/L), Co (400 e 800 mg/L) e cinco classes de antibióticos: Beta-lactâmicos (ampicilina 10, 200, 300 µg/ml), aminoglicosídeos (canamicina 50, 100 µg/mL, estreptomicina 20, 50, 100 µg/mL, tetraciclina 10, 30, 50 µg/mL), anfenicóis (cloranfenicol 10, 50, 70 µg/mL) e quinolonas (ácido nalidíxico 50, 100, 200 µg/mL) para serem caracterizadas quanto a possíveis resistências a estes metais e aos antibióticos (Figura 7). Os antibióticos foram diluídos em água esterilizada e preparadas soluções estoques de 1.000 µg/mL (exceto cloranfenicol que foi diluído em etanol 70%) e posteriormente adicionados ao meio, com auxílio de filtros de membrana de 0,22 µm Millex[®]. As colônias com diferentes morfologias foram repicadas por mais três vezes para obtenção de colônias puras. Os isolados foram armazenados em caldo TSB com glicerol a 20% em temperatura -80 ° C.

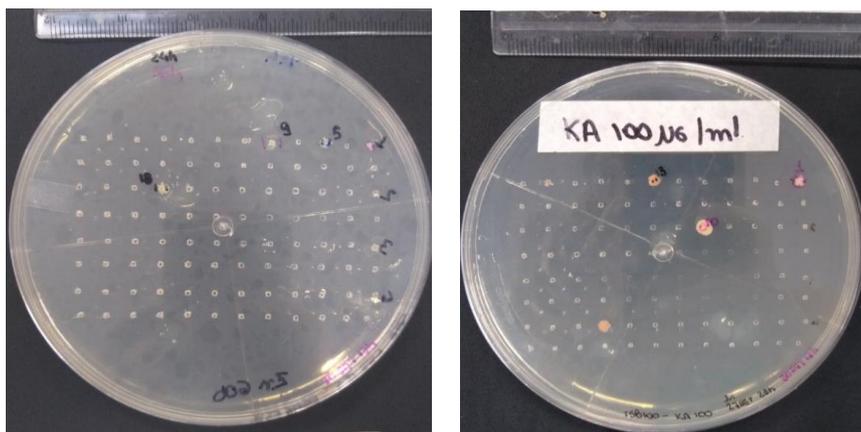


Figura 7 – Placas de Petri com antibiótico inoculadas com colônias resistentes a metais pesados e antibiótico (Foto: Vasconcelos ALS (sem publicação)).

4.4. Identificação dos isolados

4.4.1. Extração e quantificação do DNA genômico

Coletou-se uma colônia de cada isolado e inoculou-se em frasco Erlenmeyer (um para cada colônia) contendo 30 mL meio líquido TBS, o qual foi levado para o agitador por 24 h a 180 rpm. Após esse período, realizou-se a extração do DNA através do Protocolo de Extração de DNA Fenol-Clorofórmio (Adaptado de Sambrook et al. 1989). Na cabine de segurança biológica foram coletados 2 mL do meio de cultura e adicionados em microtubo de 2 mL, seguido de centrifugação por 7 min em máxima velocidade. Após, descartou o sobrenadante e adicionou 500 µL de TE e agitou-se no vórtex para suspensão e então adicionou 10 µL de SDS 0,5% e 1 µg de pérolas de vidro (*beads*) estéril. Em seguida adicionou 500 µL de fenol nos microtubos e dispostos no PowerLyzer em velocidade máxima por 1 min. Após, centrifugou por 7 min em velocidade máxima. O conteúdo no microtubo apresentou-se bifásico, onde coletou-se apenas o conteúdo da 1ª fase (em torno de 450 µL) e adicionou em microtubos de 1,5 mL. Foram adicionados 40 µL de acetato de sódio (3M) e 400 µL de propanol, passados em vortex por 10 seg, em seguida foram levados para geladeira por 5 min. Os microtubos foram centrifugados na velocidade alta por 5 min, em seguida descartou-se o sobrenadante, adicionando 500 µL de etanol 70% gelado e centrifugou-os por 2 min. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e os microtubos foram dispostos invertidos na bancada até a evaporação do etanol. Em seguida adicionou-se 50 µL de água esterilizada.

O DNA foi analisado em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1x, corado com *Lodding Buffer* e marcador de massa molecular *GeneLadder* 1k e observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

4.4.2. PCR do gene 16S rDNA

O DNA de cada isolado bacteriano foi submetido à amplificação da região V3/V4 do gene 16S rDNA através de reação de polimerização em cadeia (PCR). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 50 µl, sendo 31,75 µl água autoclavada, 5,0 µL de Buffer (10X), 7,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 0,05 µL de BSA (10 mg/mL), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL) e 0,1 µL dos pares dos iniciadores (100 pmol/µl) 1492R (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACT – 3') 27F (5' – GAGAGTTTGATCCTGGCTCA – 3') e 1,0 µL do DNA diluído (aproximadamente 50ng). Para amplificação do gene 16S rDNA, as reações foram incubadas a 94 °C por 4 min., submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., 63 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min., com uma extensão final de 72 °C por 10 min., em termociclador (Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, Applied Biosystems). Em seguida os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), podendo assim, inferir a qualidade da amplificação.

4.4.3. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciamento 16S rDNA

Os produtos de PCR dos 21 isolados foram purificadas com o Eza Cycle-Pure Kit (OMEGA bio-tek) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas em NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Uniscience) e submetidas à reação de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e sequenciadas em 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em uma mistura com volume final de 10 µL contendo 1,5X tampão de sequenciamento (Applied Biosystems) 5 pmol dos primers M13-20 ou M13 reverse para a biblioteca com 10 ng de DNA. Para a biblioteca foram usados 5 pmol dos primers *Lego CB Forward* ou *Lego CB Reverse* com 100 ng do produto de PCR purificado. A reação foi realizada em termociclador Thermo Cycler PTC-225 (MJ Research) sob as seguintes condições: 96°C por 2 min; 35 ciclos: 96 °C por 45 s, 50 °C por 30 s e 60 °C por 4 min. O sequenciamento foi realizado no Centro de Genômica Funcional, no Departamento de Zootecnia da Escola Superior Agrícola “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP).

Os eletroferogramas das sequências obtidas foram alinhadas e editadas no programa *CodonCode Aligner* v7.0.1 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, EUA). Posteriormente as sequências foram ajustadas com auxílio do programa Phred para pontuações de qualidade das bases, onde os escores do índice de qualidade Phred ficaram acima de 20. As sequências dos 21 isolados foram transformadas em dados FASTA e foram comparadas com sequências depositadas na base de dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) através do algoritmo BLASTn, a fim de determinar as espécies com maior porcentagem de similaridade com a sequência das cepas isoladas (Altschul et al., 1990).

4.4.4. Sequenciamento e montagem genômica dos isolados S3 e S21

Para a obtenção de genomas foram selecionadas duas cepas (S3 e S21), identificadas como *Bacillus safensis* e *Mucilaginibacter* sp através das porcentagem de similaridade no BLASTn. Estas cepas foram selecionadas por se tratar de uma espécie de *Bacillus*, gram-positivo, que apresentou múltipla resistência aos metais pesados e antibióticos, resultado verificado em nossos estudos, sendo um gênero bem descrito na literatura, e *Mucilaginibacter*, gênero de bactérias gram-negativa, que também apresentou múltipla resistência aos antibióticos, porém um gênero novo e ainda pouco descrito na literatura, um potencial a ser explorado.

As bibliotecas foram preparadas com kits Rapid Sequencing SQK-RBK004 (Oxford Nanopore Technologies) e o sequenciamento realizado na plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies) usando o software MinKNOW e conversão dos dados para FASTQ com Guppy v 3.6.0 (<https://staff.aist.go.jp/yutaka.ueno/guppy/>) (Wick et al., 2017b). O DNA também foi sequenciado na plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq X v.3 (Illumina, San Diego, CA) usando kit de preparação de biblioteca Nextera XT (Illumina, Inc., San Diego, CA) com método de extremidade pareada, usando tamanho médio de 350 bp em sequenciamento 2×150 -bp.

A qualidade das leituras ONT foi verificada com o nanoPLOT e os adaptadores e as leituras de baixa qualidade (qualidade > 10, comprimento > 5000 pb) foram aparadas com Porechop e NanoFilt (De Coster et al., 2018), respectivamente. As leituras do Illumina foram filtradas com fastp v.0.20.1 (Chen et al., 2018) usando parâmetros padrão e verificadas com FASTQC (Andrews, 2010). As montagens híbridas *de novo* foram realizadas com o software Unicycler v.0.4.0.8, realizando a remoção de sequências sobrepostas e polimento dos

genomas através do pipeline SPAdes e Pilon, respectivamente (Wick et al., 2017a), com os parâmetros padrão para a montagem híbrida.

A qualidade de ambas as montagens foi avaliadas com Quast v.5.0.2 (Gurevich et al., 2013) e CheckM v.1.1.3 (Parks et al., 2015). A anotação foi realizada com NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (Tatusova et al., 2016). A anotação da montagem foi realizada com NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (Tatusova et al., 2016) e a análise da identidade média dos nucleotídeos (ANI) foi calculada usando ANI blast (ANIb) e ANI MUMmer3 (ANIm) no servidor online JSpeciesWS (Richter et al., 2016). Para verificação das proteínas previstas no genoma foi utilizado o banco de dados UniProt Knowledgebase [(UniProtKB) <https://www.uniprot.org/>] (Bairoch et al., 2005).

4.5. Obtenção das curvas de crescimento

A curva de crescimento foi obtida apenas para um dos isolados. A reativação da cepa para crescimento bacteriano foi realizada em placa de Petri contendo caldo Luria-Bertani (LB). O pH do meio de cultura foi ajustado para pH 7 com solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol/L e Ácido clorídrico (HCL) 1,0 mol/L quando necessário. As placas inoculadas foram incubadas durante 48 horas a 25 °C. Colônias foram coletadas e inoculadas em frascos contendo 200 mL de caldo LB e incubados durante 48 h sob agitação orbital a 25 °C e 150 rpm para preparo de “cultura matriz”.

O isolado foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo meio LB. Estes foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 25 °C, sendo alíquotas de 2 mL coletadas de cada frasco nos tempos 4h, 8h, 12, 24h, 48h e 72h para determinação da crescimento controle microbiano. O crescimento microbiano foi verificado por análise de espectrofotometria de Densidade Óptica (OD) por absorbância a 600 nm.

4.6. Determinação dos efeitos de Mn, Zn e Co sobre o desenvolvimento e potencial de biorremediação

Para verificar o potencial de biorremediação das estirpes isoladas, essas foram cultivadas nas concentrações de metais descritas por Matyar et al (2008) e Akinbowale et al. (2007) com adaptações. As cepas bacterianas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 70 mL de caldo Luria Bertani LB e R2A (pH 7,0), em duplicata, contendo íons dos metais em duas concentrações para cada um das cepas isoladas para este experimento. A

curva de crescimento foi construída para os metais separados e associados. As concentrações dos metais utilizados para cepa S3 foram: Mn 800 e 1600 mg/L; Zn 250 e 500 mg/L; Co 400 e 800 mg/L, separadamente e em conjunto (chamado de Mix I, II, III, IV para cepa 3A). A cepa 3A foi inoculada em caldo LB com metais associados nas seguintes concentrações: Mix I - Zn 60 mg/L, Mn 200 mg/L e Co 100 mg/L; Mix II - Zn 120 mg/L, Mn 400 mg/L e Co 200 mg/L; Mix III - Zn 250 mg/L, Mn 800 mg/L e Co 400 mg/L; Mix IV - Zn 500 mg/L, Mn 1600 mg/L e Co 800 mg/L. Já para cepa S21 as concentrações dos metais utilizados foram: Mn 400 e 800 mg/L; Co 200 e 400 mg/L, separadamente. Para os metais associados, o mix para S21 foi preparado nas seguintes concentrações: Mix I - Mn 200 mg/L e Co 50 mg/L; Mix II - Mn 400mg/L e Co 100 mg/L. As cepas foram reativadas em caldo LB e R2A e incubadas em agitador a 150 rpm a 25 °C até que o meio de cultura apresentasse densidade óptica a 600 nm igual ou acima de 0,6. Coletas de 5 mL do cultivo foram realizadas de cada amostra a cada 24 h por 3 dias. Para controle negativo foi utilizado meio de cultura LB e R2A contendo os metais, sem inoculação. E para o controle positivo foi utilizado meio de cultura LB e R2A inoculado com a bactéria sem a presença de metais. A amostra coletada de 5 mL foi centrifugada a 9000 x g por 8 min a 4 °C, onde a concentração residual de metal do sobrenadante translúcido foi analisada por Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento dos microrganismos com resistência ao Manganês

O manganês (Mn) é um metal traço presente no rejeito de mineração que se depositou nos sedimentos estuarinos do Rio Doce após o desastre do rompimento da barragem da Samarco em 2015. O Mn foi escolhido para primeira etapa de seleção dos isoladas devido sua alta concentração nas águas e sedimento do estuário e por ter sido detectado nas espécies da ictiofauna em níveis tóxicos, muito acima das concentrações necessárias para funções biológicas. Devido a concentração aumentada do Mn de até 880%, o risco de exposição crônica é iminente. A possibilidade de bioacumulação por meio da contaminação do ecossistema a longo prazo pode agravar os riscos de impacto tanto na fauna e flora quanto na saúde da população local (Queiroz et al., 2018, 2021a; Gabriel et al., 2021a).

As amostras de sedimentos PRIS, RES e REJ inoculadas em placas de Petri com meio de cultura nas maiores concentrações de Mn exibiram crescimento de bactérias resistentes (Figura 8). Corroborando esse achado, outros estudos, igualmente, apresentaram isolados com resistência ao Mn (Akinbowale et al., 2007; Matyar et al., 2008; Cabral et al., 2016; Castelblanco, 2016; Barbosa et al., 2016; Huang et al., 2016; 2020). Colônias morfologicamente diferentes foram selecionadas das placas de Petri com rejeito inoculado na concentração de 3.200 µg/mL de Mn. No total foram isoladas 21 colônias.

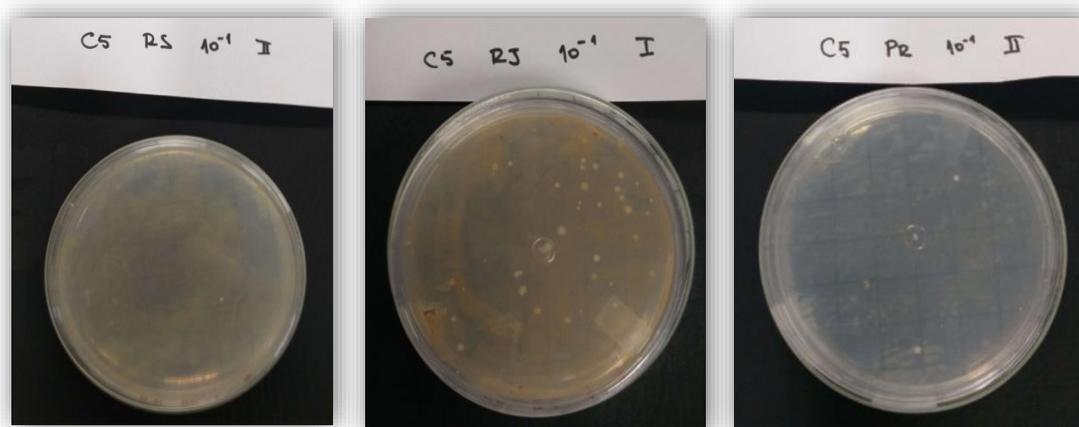


Figura 8 – Meio de Cultura com tratamentos RES (RS), REJ (RJ) e PRIS (PR) inoculados na concentração 4.500 mg/L de Mn

Ao aumentarmos a concentração do metal observou-se uma redução na abundância microbiana, bem como a diversidade (definida pela observação da morfologia das colônias),

excluindo os microrganismos menos tolerantes ao metal pesado (Figura 9). Em estudos com diversidade de bactérias em solo contaminado, como o realizado por Ellis et al. (2003), revelou-se que elevadas concentrações de metal podem exercer pressões seletivas na tolerância e na resistência da comunidade microbiana a presença de metais pesados. Dessa forma, acreditamos que o sedimento PRIS e RES podem ter, inicialmente, apresentado maior diversidade de colônias e maior ocorrência de UFC, pelo fato de ser uma amostra de sedimento que ainda não havia sofrido pressões e perturbações com poluentes tóxicos, no caso do sedimento sem contaminação (PRIS), e para amostra RES pela presença de uma comunidade microbiana já existente quando o rejeito foi agregado. Possivelmente, isto tenha acontecido em resposta adaptativa às condições de estresse provocadas pelo metal pesado no meio, já que a comunidade presente em REJ pode ter respondido previamente a entrada dos metais quando a lama tóxica se depositou no estuário. Observa-se que presença de metais pesados nos ambientes reduz a abundância e diversidade populacional dos microrganismos (Pinto et al., 2015).

Mediante ao aumento da concentração do metal, houve uma mudança na tolerância das colônias. Tal característica metabólica aponta a versatilidade e adaptabilidade desses microrganismos frente a agentes poluentes e contaminantes.

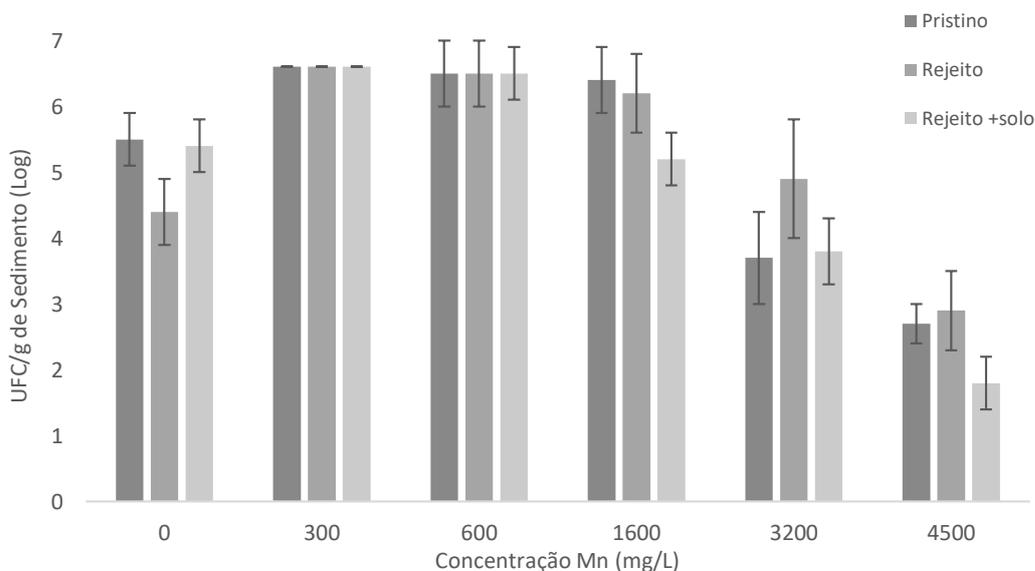


Figura 9 - Crescimento bacteriano em placas de Petri com cinco concentrações de Mn (mg/L) e amostras dos sedimentos PRIS, RES e REJ inoculadas

Os mecanismos de adaptação em um ambiente com alta concentração de Mn é variado, podendo envolver precipitação extracelular, oxidação enzimática, bombas de efluxo

ativo (Ran et al., 2021). Nies (1999) relata que a tolerância observada às altas concentrações de Mn pode ser atribuída à menor toxicidade deste elemento. Em estudos envolvendo tolerância de bactérias ao Mn, Huang et al., (2020) isolaram uma cepa com alta resistência a Mn de amostras de solo contaminadas com este metal. Trata-se de uma espécie do gênero *Bacillus* que pode sobreviver sob uma concentração de 4.000 mg/L de Mn. Outros estudos têm mostrado microrganismos com alta tolerância ao Mn, sendo importantes em oxidar e adsorver o Mn (II), podendo, alguns microrganismos, ser capazes em produzir ácido indolacético, sideróforos e potencial de solubilização de fósforo (Yan et al., 2014; Huang et al., 2018; Xu et al., 2019), colaborando no crescimento de plantas. Ran et al. (2021) mostraram que a cepa ST7 de *Bacillus safensis* se adaptou à exposição ao Mn alterando o metabolismo, regulando os transportes de cátions, inibindo a esporulação e a flagelonêse e ativando uma via relacionada ao estresse (sistema *sigB*).

A tolerância constatada nas colônias presentes nos tratamentos, principalmente no REJ, sugere que bactérias, expostas a metais pesados, podem desenvolver mecanismos de resistência com potencial adaptativo e de sobrevivência frente as pressões seletivas impostas pelo meio.

5.2. Seleção dos isolados de bactérias sob diferentes concentrações de metais pesados e antibióticos

Após a seleção dos isolados tolerantes às concentrações mais altas de Mn, os isolados foram avaliadas quando a sua tolerância aos metais Zn, Cd e Co e a sua resistência os antibióticos ampicilina (amp), canamicina (kana), estreptomicina (strep), tetraciclina (tetra), cloranfenicol (clora) e ácido nalidíxico (NA).

Dentre os 21 isolados que se desenvolveram nas placas de Petri contendo metal ou antibióticos, os isolados S3, S5, S20 e S21 foram tolerantes a todos os metais (Cd, Zn, Co e Mn). Um total de 8 isolados apresentaram resistência ao Zn, Co e Mn. Com crescimento em placas contendo Co (800 mg/L) e Mn (3.200 mg/L) 9 isolados foram resistentes as concentrações estipuladas. O isolado S10 foi o único que mostrou resistência apenas ao Mn, porém este se desenvolveu nas placas dos antibióticos ampicilina (200 mg/L), coranfenicol (10 mg/L) e canaminicina (100 mg/L). Apenas S13, S20 e S21 cresceram na placas com ácido nalidíxico nas concentrações 200 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, respectivamente. O isolado S18, crescendo em placas de Zn, Co e Mn foi resistente apenas ao antibióticos cloranfenicol 10 mg/L. O isolado S21 apresentou resistência a todos antibióticos e metais. O isolado S13 foi

tolerante a presença de antibióticos, exceto a tetraciclina. Entre os 21 isolados, 12 não resistiram as concentrações de antibióticos (Tabela 2).

Tabela 2. Resistência dos 21 isolados à concentração mínima inibitória dos metais pesados e antibióticos

Isolado	Metal pesado (mg/L)				Antibiótico (mg/L)					
	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Amp	Clora	Strep	Tetra	NA	Kana
S1		500	800	3200	200		100			100
S2			800	3200						
S3	150	500	800	3200		70	100	30		100
S4		500	800	3200						
S5	150	500	800	3200	200					100
S6		500	800	3200						
S7		500		3200						
S8		500	800	3200						
S9		500	800	3200	10	50	100	30		
S10				3200	300	10				100
S11			800	3200						
S12			800	3200						
S13			800	3200	300	10	100		200	100
S14			800	3200						
S15			800	3200						
S16			800	3200						
S17			800	3200						
S18		500	800	3200		10				
S19			800	3200						
S20	150	250	800	3200	300	10	50	10	50	
S21	150	250	800	3200	300	10	100	10	100	50

Amp = Ampicilina; Clora = Cloranfenicol; Strep = Estreptomicina; Tetra = Tetraciclina; NA = Ácido Nalidíxico; Kana = Canamicina

Sumariamente, foram identificados 9 isolados que apresentaram multirresistência a metais pesados e antibióticos. Lu e Liu (2021) mostraram que os níveis de resíduos de antibióticos em sedimentos estuarinos são fortemente correlacionados com a abundância de genes de resistência a metais pesados (MGRs) e a presença de elementos genéticos móveis (MGEs), supondo-se que os MGEs podem transferir genes de resistência aos metais pesados e antibióticos através de transferência horizontal de genes.

No ambiente, a associação de resistência a metais e antibióticos é relativamente comum, uma vez que genes que codificam resistência para metal e antibiótico podem estar localizados nos mesmos elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons

(Summers, 2002; McIntosh et al., 2008). Contudo, supõem-se que a pressão seletiva exercida em ambientes contaminados, como a contaminação por rejeito de mineração, possa contribuir para uma co-seleção aos antibióticos (Matyar, 2012; Martins et al., 2014; Sinegani e Younessi 2017). Diversos estudos mostram a co-resistência, resistência cruzada e co-regulação de vias de resistência para os metais pesados e antibióticos em bactérias de ambientes naturais (Allen et al., 1977; Foster, 1983; Hassen et al., 1998; Chapman, 2003; Baker-Austin et al., 2006; Wright et al., 2006; Martins et al., 2014; Sinegani e Younessi, 2017), podendo explicar os achados em nossos estudos.

De acordo com Allen et al. (1977), bactérias resistentes a antibióticos estão amplamente distribuídas no ambiente estuarino e existe uma associação de resistência a antibióticos com resistência a metais em bactérias nesses ambientes. Além da resistência conferida aos antibióticos pela transferência horizontal de genes, estudos mostram que as vias usadas para desintoxicação de níveis tóxicos de metais podem ser as mesmas usadas para extrusão de antibióticos (Silver e Phung, 2005; Martinez et al., 2009; Seiler e Berendok, 2012; Zhou et al., 2022).

Timoney et al. (1978) observaram que as populações de *Bacillus* sp. resistentes a metais pesados eram muito maiores em sedimentos contendo altas concentrações de mercúrio (Hg) e outros metais do que populações em sedimentos de áreas sem contaminação ou com baixas concentrações de metais pesados. As cepas de *Bacillus* sp. eram frequentemente mais resistentes a ampicilina devido a produção, principalmente, de β -lactamase. Sugere-se que os genes de resistência ao Hg e a produção de β -lactamase são selecionados ao mesmo tempo em *Bacillus*, resultante da contaminação por metais pesados no ecossistema e da pressão seletiva para resistência a antibióticos.

Semelhante ao observado por Timoney et al. (1978), outro estudo verificou a resistência em isolados de ambiente contaminados com Hg. Rasmussen e Sorensen (1998) observaram que a presença de plasmídeo era maior nos isolados do sedimento marinho poluído do que no sedimento controle, revelando alta ocorrência de resistência a Hg e tetraciclina. McArthur e Tuckfield (2000) mostraram que bactérias eram mais resistentes em um ambiente perturbado, onde se observou uma relação positiva da resistência a estreptomicina e canamicina com as concentrações de Hg nos sedimentos, concluindo que a poluição por metais pesados pode contribuir para o aumento da resistência aos antibióticos através da seleção indireta.

Estudos realizados em manguezais no litoral do estado de São Paulo (Brasil), mostraram que esses ambientes podem ser um ecossistema com forte presença de microrganismos resistente a metais pesados e antibióticos. Cabral et al. (2016; 2018) mostraram que tanto manguezais com impactos antropogênicos quanto manguezais prístinos podem apresentar microrganismos resistentes a metais e antibióticos, com maior prevalência de genes de resistência aos antibióticos no manguezal prístino. Imchen et al. (2019) isolaram bactérias de manguezais contaminados em Kerala (Índia). Os resultados mostram uma alta proporção de bactérias, em sua maioria do gênero *Bacillus*, com múltipla resistência a antibióticos, entre eles, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol, com a incidência de resistência maior à ampicilina, metilina (beta-lactâmicos) e vancomicina (glicopéptido).

A concentração e a biodisponibilidade dos metais pesados no meio ambiente pode depender das condições bióticas e abióticas do meio (Nies, 1999; Schulz-Zunkel e Krueger, 2009). Nos ecossistemas costeiros se apresenta uma alta heterogeneidade físico-química. Essa heterogeneidade, inclusive do oxigênio, associada às interações ecológicas, pode afetar os processos de degradação (Cabral et al., 2018).

Os metais utilizados neste estudo são descritos em diversos estudos como fonte de poluição (Silver e Phung, 2005). O Mn é um oligoelemento essencial aos organismos vivos, atuando como cofator em muitas enzimas. Segura et al. (2016) mostram que o Mn é um dos elementos com concentrações tóxicas presentes na área estudada por nós. Nos estudos de resistência ao Mn, Huang et al. (2020) identificaram que uma cepa de *Bacillus* mostrou resistência aos antibióticos amicacina, norfloxacina, gentamicina e ciprofloxacina. Embora o Zn também consista de um metal traço que atue em processos celulares e seja componente de DNA e RNA polimerase nos microrganismos, em altas concentrações o Zn torna-se tóxico levando a inibição do sistema respiratório de transporte de elétrons em bactérias (Schulte et al., 2014). Estudos mostram co-seleção de bactérias resistentes ao zinco e cádmio e a resistência ao antibiótico metilina (Cavaco et al., 2011). Outro estudo mostrou a resistência ao zinco co-ocorre com genes que conferem resistência as beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e a genes de resistência multidroga (Zhao et al., 2019).

O Cd apresenta alta toxicidade devido sua biodisponibilidade em água e a alta solubilidade. Íons de Cd ao se acumular nas células aumentam o estresse oxidativo, podendo induzir a quebras da fita de DNA, degradação oxidativa dos lipídeos e erros cromossômicos (Anas et al., 2008). Os isolados S3 e S5, por serem tolerantes ao Cd, acreditamos que possam

apresentar alguns mecanismos que os fazem ser capazes de tolerar níveis tóxicos de metais, como a presença de plasmídeos, que codificam sistemas de resistências para íons metálicos tóxicos, bombas de efluxo eficientes, que causam a rápida exportação do metal, evitando o acúmulo intracelular (Silver e Misra, 1984; Silver e Phung, 1996), através da biossorção do metal tóxico por meio das membranas e parede celular e a partir de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e biofilmes (Harrison et al., 2007). Alguns estudos sugerem a relação da resistência ao Cd e antibióticos meticilina, tetraciclina e imipenem, como co-seleção (Zhou et al., 2022; Perron et al., 2004).

Todas as cepas isoladas apresentaram resistência ao Co, exceto as S7 e S10. Assim como Zn e Mn, o Co é um metal essencial que em altas concentrações pode ser tóxicos, inibindo o crescimento microbiano (Nies, 1992; Gikas, 2008). Estudos mostram que a presença de Co pode afetar a síntese e degradar o RNA de *E. coli* K-12, implicando no processo de transcrição e tradução (Guha e Mookerjee, 1981). Chen et al. (1996) descrevem a resistência cruzada ao Co e a tetraciclina.

Um explicação plausível para a resistência de bactérias autóctones isoladas de ambientes contaminados é proposta por Ginn et al. (2006). Propõem-se que as respostas de tolerância das bactérias às concentrações tóxicas dos metais podem depender do tempo de contato das cepas com o contaminante, resultando em aclimação ao metal, onde esses microrganismos aclimatados podem crescer nas concentrações mais altas quando comparadas com as cepas microbianas não aclimatadas. Hajte et al. (2017) relatam que o rios afluentes do rio Doce já recebiam contaminantes tóxicos antes da chegada da pluma de rejeito em virtude na mineração artesanal de Ferro (Fe), Alumínio (Al) e Ouro (Au). Analisando áreas que não receberam o rejeito da SAMARCO, revelaram a presença de Arsênio (As) nos sedimentos da área circundante. O As está presente nos minérios de Au no Quadrilátero Ferrífero e a amálgama de mercúrio (Hg) é outro subproduto gerado na mineração artesanal do Au presente nos afluentes do rio Doce (Varejão et al., 2009).

A contaminação ambiental pelo rejeito de mineração da barragem do Fundão elevou o teor de metais pesados na bacia do rio Doce, no estuário e no oceano Atlântico. Os níveis de metais pesados presente na água superam os níveis de segurança nacionais e internacionais, e os testes de toxicidade revelam que a lama e o sedimento apresentam citotoxicidade e risco de danos ao DNA (Sá et al., 2021; Gomes et al., 2017; Segura et al., 2016; Hatje et al., 2017; Queiroz et al, 2021b). Os impactos ambientais, sociais e humanos dos desastres envolvendo rompimentos de barragens de rejeitos de mineração são imensuráveis. A longo prazo, a

presença desse rejeito contaminado com metais pesados, no estuário do Rio Doce, pode trazer maiores danos aos ecossistemas. Através da contaminação crônica desses metais pesados, pode ocorrer a elevada presença de bactérias ambientais com co-resistência a antibióticos, e conseqüentemente, maior chance do aumento da taxa de troca de genes de resistência entre bactérias ambientais e patogênicas, situação que pode agravar a dificuldade de tratamentos de infecções causadas por bactérias em humanos e animais, aumentando os riscos de saúde pública e ecológicos (Barcellos et al., 2022; Matins et al., 2014). Ações que possam mitigar os danos ambientais e sociais ocasionados por desastres gerados pelos rompimentos de barragens e que ajudem a restaurar os ecossistemas são imperativos.

5.3. Identificação dos isolados

As sequências do gene 16S rDNA das cepas selecionadas que apresentaram maior resistência aos metais e antibióticos foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI, através da ferramenta BLASTn. Os 21 isolados foram identificados ao nível de gênero e espécie, sendo para espécie a porcentagem de identificação >99% com aquelas sequências depositadas no banco de dados e para nível de gênero com porcentagem >97% (Tabela 3). O processo de identificação não obteve sucesso para o isolado S8 (falhas na PCR, má qualidade do sequenciamento).

A partir da porcentagem de similaridade dos isolados neste estudo com aqueles relacionados no banco de dados, é possível verificar um predomínio do gênero *Bacillus*, pertencentes ao grupo de bactérias gram-positivas, filo Firmicutes. Apenas três isolados, S19, S20 e S21 são do gênero *Mucilaginibacter*, pertencentes ao grupo de bactérias gram-negativas, filo Bacteroidetes.

Tabela 3. Comparação e identificação das sequências do gene 16S rDNA.

Isolado	Espécies	Código NCBI	% de identidade
S1	<i>Bacillus cereus</i>	NR_115526.1	99,71%
S2	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1	97,34%
S3	<i>Bacillus safensis</i>	CP010405.1	99,74%
S4	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_102783.2	99,05%
S5	<i>Bacillus altitudinis</i>	NR_042337.1	99,87%
S6	<i>Bacillus aryabhatai</i>	MG905876.1	99,04%
S7	<i>Bacillus deserti</i>	NR_117383.1	99,56%
S8	-	-	-
S9	<i>Bacillus safensis</i>	OM049200.1	99,86%
S10	<i>Bacillus pumilus</i>	NR_112637.1	98,88%
S11	<i>Bacillus aryabhatai</i>	NR_115953.1	99,16%
S12	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_043401.1	99,39%
S13	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_102783.2	98,24%
S14	<i>Bacillus megaterium</i>	MN100168.1	99,15%
S15	<i>Bacillus aryabhatai</i>	NR_118442.1	99,81%
S16	<i>Bacillus velezensis</i>	NR_075005.2	99,17%
S17	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_043401.1	99,28%
S18	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_112636.1	99,26%
S19	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	NR_133789.1	98,10%
S20	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	NR_148857.1	97,61%
S21	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	NR_148857.1	98,19%

Árvore filogenética de junção de vizinhos construída com base nas sequências do gene 16S ribossômico RNA (rRNA) de bactérias isoladas mostra as relações filogenéticas entre todas as linhagens isoladas. Os valores indicam porcentagens de ramificações idênticas em 100 bootstrapping. A sequência de *Escherichia coli* J01859 foi utilizada como grupo externo (Figura 10). Foram utilizados os software IQ-tree e MEGA 7 para construção da árvore filogenética e visualizada com ITOL (Vasconcelos et al., 2022).

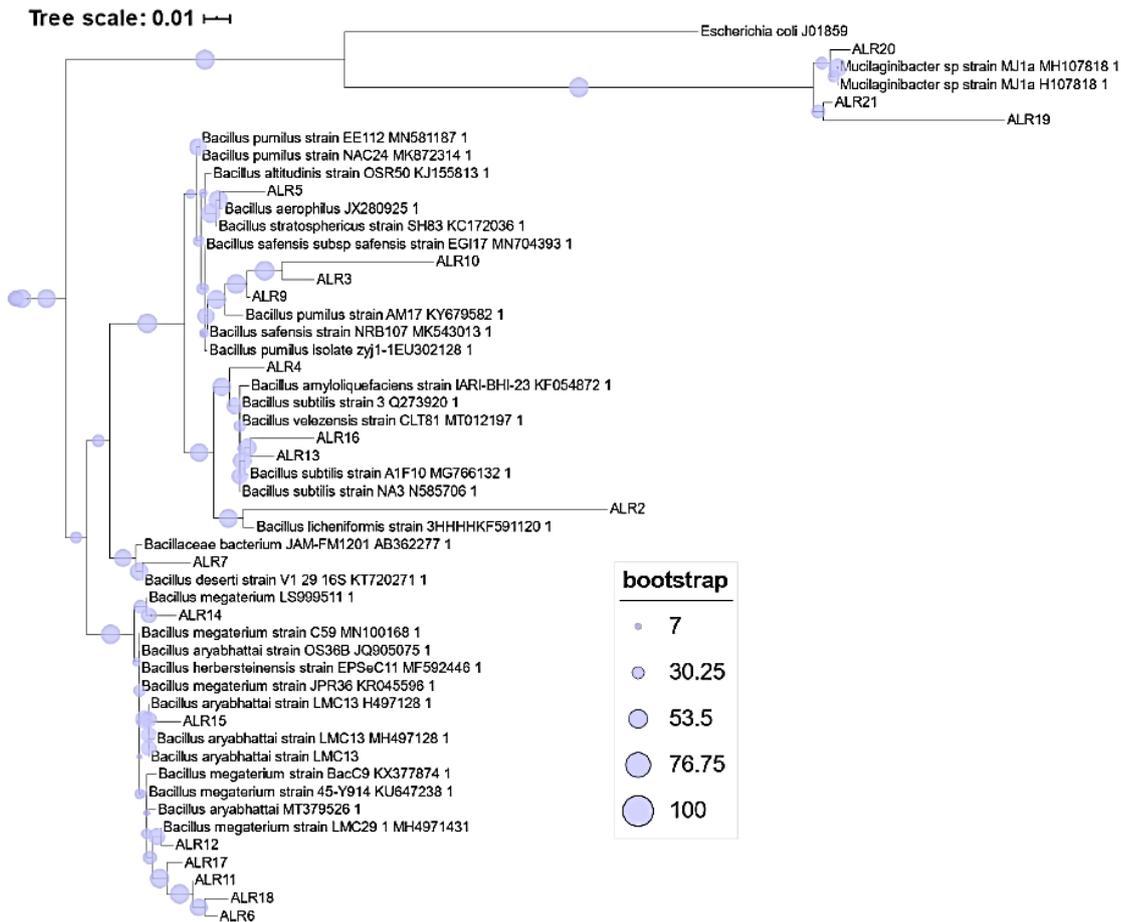


Figura 10. Árvore filogenética de junção de vizinhos baseada em sequências do gene 16S rRNA mostrando a posição filogenética dos isolados. Fonte: Vasconcelos et al. (2022)

O gênero *Bacillus*, representado por 17 dos 21 isolados identificados neste estudo, são amplamente descritos na literatura por terem aplicações biotecnológicas. Dentre as aplicações para as estirpes encontradas neste estudo, a tabela 4 expõem algumas delas e a ecologia das espécies presentes na literatura.

Tabela 4. Aplicações e ecologia dos isolados neste estudo descritos na literatura

Espécie	Ecologia	Referencia
<i>Bacillus cereus</i>	Importância - Patogênica oportunista; Intoxicação alimentar; resistente a antibióticos; atividade antimicrobiana;	Ayangbenro e Babalola, 2020; Kumar et al., 2014; Stenfors et al., 2008; Jensen et al., 2003
	Habitat - Solo, plantas, intestino de insetos e mamíferos;	
<i>Bacillus licheniformis</i>	Potencial - Resistência múltipla a metais pesados; biorremediação; antifúngica;	Muras et al., 2021; Abdelkhalik et al., 2020; Logan e Vos, 2015; Haavik, 1976; Salkinoja-Salonen et al., 1999; Syed e Chinthala, 2015
	Importância - produção de bacitracina; Atuante na transferência de genes de resistência a antibióticos; Intoxicação alimentar;	
	Habitat - Solos, penas, plantas, couro, leite;	
<i>Bacillus safensis</i>	Potencial - Compostos bioativos; produção enzimas; biorremediação; Probiótico; Atividade antiviral;	Wu et al., 2021; Domingos et al., 2015; Rong et al., 2020; Defalco et al., 2021; Romero-Severson et al., 2021; da Fonseca et al., 2015; Thite et al., 2020; Strahsburguer et al. 2019; Chakraborty et al., 2013; Satomi et al., 2006; Ran et al., 2021
	Importância - Atividade antimicrobiana; resistente a antibióticos;	
	Habitat - Superfícies de naves espaciais; solos com metais pesados e salino; campos petróleo; plantas; deserto; estuário;	
<i>Bacillus subtilis</i>	Potencial - Produção enzimas; promotora de crescimento plantas; antifúngico; biopesticidas; probiótico; atividade antimicrobiana; biorremediação; resistente a metais pesados e UV;	Kovács, 2019; Karpov et al., 2020; Stein, 2005; Tam et al., 2006; Bais et al., 2004; Earl et al., 2008; Moore et al., 2005; Paruthiyil et al., 2020; de Alencar et al., 2017;
	Importância - Modelo para estudo de divisão celular, secreção de proteínas, motilidade superficial, biofilme, transferência horizontal de genes; resistência a antibióticos.	
	Habitat - amplamente distribuída na biosfera; solos; fezes; trato gastrointestinal; plantas; ambiente marinho; ambiente ácido.	
<i>Bacillus altitudinis</i>	Potencial - Probiótico; produção enzimas, aminoácidos e vitaminas; fermentação alimentos; biocontrole; atividade antimicrobiana; biosurfactante; biorremediação;	Cavalini et al., 2021; Shivaji et al., 2006; Vijay et al 2011; Mao et al., 2013; Esakkiraj et al., 2012; Sunar et al., 2013; Lobova et al., 2015; Halder et al., 2017; Garousin et al., 2021; Goswami et al., 2020; Pranaw et al., 2020; Ohair et al., 2017; Shylla et al., 2021
	Importância - Resistencia a antibióticos; atividade antimicrobiana;	
	Habitat - Solos; lodo; peixes; plantas; ambiente marinho; solos contaminados; ambiente extremo (estratosfera, oceano ártico; fontes termais e salino);	
<i>Bacillus aryabhatai</i>	Potencial - Promotora de crescimento de plantas; tolerante a salinidade; resistência a metais pesados; biocontrole; biorremediação; antifúngico; biofertilizante; resistência à radiação UV; produção enzimas;	Yaish, 2017; Balakrishna et al., 2017a, 2017b; Guo et al., 2015; Ramos-Silva et al., 2015; Yan et al., 2016; Shavaji et al., 2009; Pawaskar et al., 2021; Banala et al., 2021
	Importância - Resistente à antibiótico; atividade antimicrobiana	
	Habitat - Ambiente marinho; esgoto; plantas; solos áridos; ambientes extremos (estratosfera, limitação de O ₂ ; baixa temperatura)	
<i>Bacillus deserti</i>	Potencial - Promotora de crescimento de plantas; tolerância à salinidade; produção de PHA e PHB; atividade antifúngica; tolerante a temperatura e seca; resistente radiação U; produção de enzimas; biorremediação;	Zhang et al., 2011; Seuylemezian et al., 2018;
	Importância - pouco explorada	
	Habitat - Solo desértico; veículos espaciais;	
<i>Bacillus pumilus</i>	Potencial - Produção de enzimas; resistente radiação UV;	Meyers et al., 1993; Kempf et al., 2005; Newcombe et al., 2005; Hafeez et al 2006; From et al., 2007; Ouoba et al., 2007; Kimouli et al., 2012;
	Importância - Contaminante ambiental; Intoxicação alimentar e corrente sanguínea; atividade antiviral e antibiótica;	
	Habitat - Alimentos; solo; plantas; intestino crustáceo; naves espaciais; efluente de resíduos agrícolas;	

	Potencial - resistente radiação UV; resistente a salinidade; inibidora de patógenos marinho; resistente ao esterilizante H ₂ O ₂ ; antifúngico; produção de enzimas; biorremediação de sistemas de águas residuais; biodegradação de contaminantes ambientais; biofertilizante; resistente metais pesados;	Hill et al., 2009; Thomas et al., 2014; Saranya et al., 2014; Ziganshina et al., 2018;
<i>Bacillus megaterium</i>	Importância - Modelo em processos celulares, esporulação e lisogenia de bacteriófagos; antiviral; síntese de β-lactâmicos; resistência a antibióticos; transferência de DNA plasmidial; Habitat - Solo; ambientes salinos; oceano; sedimentos; arrozais; mel; peixe; alimentos; Potencial - Produção de proteínas/enzimas; biossíntese vitamina B12; antifúngico; biorremediação; resistente a metais pesados; promotora de crescimento de plantas; bioinoculante;	Giles e Reynolds 1979; Hu e Boyer, 1996; Morita et al., 1999; Vary et al., 2007; Bunk et al., 2010; Eppinger et al., 2011; Korneli et al 2013; Pal et al., 2014; Vílchez et al., 2018; Guimarães et al., 2021;
<i>Bacillus velezensis</i>	Importância - atividade antimicrobiana; produção de lantibiótico ericina; Habitat - Marinho; água salobra; esterco/fezes; solo; plantas; salinas; alimentos; Potencial - Promotora de crescimento de plantas; biocontrole; antifúngico; probiótico; biosurfactante; produção de enzimas;	Modikwe et al., 2021; Khalid et al., 2021; Li Y et al, 2020; Devi et al., 2019; Chen L et al., 2019; Cai et al., 2017; Palazzini et al., 2016; Ruiz-Garcia et al., 2005
<i>Mucilaginibacter</i> sp.	Importância - Resistente à antibiótico; Habitat - zonas úmidas ácidas; tundra antártica; ambiente aquático; solo; arrozais; estuário; solo de mina; Potencial - Produção de exopolissacarídeos (EPS); resistente à metais pesados; biorremediação; promotora de crescimento de plantas;	Pankratov et al., 2007; Madhaiyan et al., 2010; Zheng et al., 2016; Chen W et al., 2016; de Alencar et al., 2016; Fan et al., 2018; Li Y et al., 2018; Zhou et al., 2019 Vasconcelos et al., 2021;

Observa-se que o gênero *Bacillus* possui diversas aplicações por apresentar resistência a metais pesados, pesticidas e antibióticos, atuarem como promotor de crescimentos de plantas e ter ação antifúngica e viral contra patógenos de interesse na agricultura (como referenciado na tabela 4). Muitas espécie de *Bacillus*, como *B. safensis* (Ran et al., 2021), *B. alitudinis* (Shylla et al., 2021), *B. aryabhattai* (Banala et al., 2021) e *B. licheniformis* (Syed e Chinthala, 2015), isoladas de ambientes extremos, com potencial biotecnológico, podem ser empregadas na biorremediação de locais contaminados com metais pesados.

A partir do isolamento, da seleção na presença de altas concentrações de metais pesados e identificação dos isolados selecionados neste estudo, pode-se supor que o gênero *Bacillus* seja predominante entre as populações resistentes no estuário contaminado com rejeito de mineração. Os resultados encontrados aqui para a presença majoritária deste gênero é corroborado por estudos que isolaram bactérias de ambientes contaminados com metais pesados.

Zampieri et al. (2016) isolando bactérias de sedimentos marinhos poluídos com metais pesados observaram maior frequência do gênero *Bacillus* entre as bactérias isoladas das amostras. Kamala- Kannan e Lee (2008) encontraram semelhante resultados. Das amostras

sedimentos de um ecossistema de água salobra na Coreia do Sul, todas as cepas bacterianas que pertenciam ao gênero *Bacillus*, apresentaram alta tolerância a altas concentrações de Mn e resistência aos antibióticos ampicilina, tetraciclina, canamicina e estreptomicina.

Wang et al. (2020), a partir de amostras de solo contaminado com metais pesados, isolaram cepas bacterianas onde o gênero *Bacillus* era dominante, com alta resistência aos metais Cd e Pb e capacidade de fixação dos metais. Neste mesmo estudo foi observado que a abundância do gênero *Mucilaginibacter* era negativamente relacionada com a concentração de Cd. Sob altas concentrações de Cd e Pb, *Mucilaginibacter* mostrou baixa resistência, sugerida pela diminuição da abundância ou eliminação das cepas. Em contrapartida, nosso estudo mostrou que 2 dos 3 representantes do gênero *Mucilaginibacter* (S20, S21) foram resistentes ao Cd.

Estudos descrevem a resistência do gênero *Mucilaginibacter* aos metais pesados e antibióticos. São bactérias que produzem uma grande quantidade de EPS e possuem a capacidade de hidrolisar polissacarídeos, por exemplo, xilana, pectina e laminarina (Pankratov et al., 2007), o que faz desse gênero um potencial na indústria, além serem promotoras de crescimento de plantas (Madhaiyan et al., 2010), e serem resistentes a antibióticos, como demonstrado aqui e por Jiang et al. (2012) e Madhaiyan et al. (2010). Li et al. (2022) descrevem a relação da produção de EPS e metais pesados de uma cepa de *Mucilaginibacter*, indicando que a produção elevada de EPS é uma importante adaptação de *Mucilaginibacter* a ambientes poluídos por metais pesados. Trate-se de um gênero de bactéria que vem sendo descrito recentemente, porém com poucas espécies identificadas e pouco descrita na literatura acerca de suas aplicações (76 spp [www.bacterio.net/genus/mucilaginibacter]) (Parte, 2018). Já *Bacillus* S3 (identificado como *B. safensis* pelo 16S rDNA), além de apresentar alta resistência aos metais pesados testados também foi resistente a 4 antibióticos. O gênero *Bacillus* é amplamente descrito na literatura, com muitas cepas identificadas (614 spp [www.bacterio.net/genus/bacillus]) (Parte, 2018). Tanto *Mucilaginibacter* quanto *B. safensis* tem potencial de biorremediação, como descrito por alguns estudos (Fan et al 2018; Kalaimurugan et al., 2020). Assim, ambas as cepas foram selecionadas para o sequenciamento genômico a fim de se explorar os genomas de ambas, identificando possíveis genes que venham a conferir resistência a essas duas espécies e potenciais aplicações biotecnológicas.

5.4. Sequenciamento e montagem do genoma

5.4.1. *Bacillus safensis* 3A

A cepa S3 trata-se de uma espécie de bactéria gram-positiva, formadora de esporos, aeróbia e quimio-heterotrófica que pode colonizar ambientes extremos devido à sua alta tolerância a sais e metais pesados (Lateef et al., 2015). *Bacillus safensis* foi originalmente isolada de naves espaciais e superfície de instalações de montagem no laboratório de Propulsão a Jato na Califórnia. As condições precisam ser altamente oligotróficas, de baixa umidade e temperatura controlada, para que seja evitada a contaminação microbiana terrestre em explorações espaciais (Satomi et al., 2006).

A montagem no genoma de *B. safensis*, que chamamos de 3A, resultou em 2 contigs, sendo um cromossomo único de 3.721.772 pb e um plasmídeo de 1.999 pb ($N_{50} = 3.721.672$). O sequenciamento ONT exibiu 124.661.096 pb e 45.633 reads e o sequenciamento Illumina exibiu 105.113.700 pb e 350.376 reads. O genoma apresentou teor de G+C de 41.7%, e cobertura de 61x. Identificamos 3.612 sequências codificadoras de proteínas (CDS) e 81 genes de tRNAs, 24 de rRNAs e 5 ncRNAs. A análise de identidade média de nucleotídeo (ANI) no servidor JSpeciesWS mostrou a similaridade com espécies semelhantes determinando que a espécie mais próxima com 98,80% de ANI_b e 98,91% de ANI_m é *B. safensis* KCTC 12796BP, isolada de amostras de sedimentos de manguezais em Damman, Árabia Saudita (número de acesso GenBank [CP018197](#)). O genoma da cepa 3A foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso [CP067376](#).

A anotação no plasmídeo relevou conter um ARG classe A beta-lactamase de amplo espectro (ESBL) TEM-116 (*bla*TEM). O plasmídeo foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso [MW647491.1](#). Através ferramenta Blast, que calcula a porcentagem de similaridade da sequência com o banco de dados de genes de resistência do NCBI, foi possível verificar uma similaridade de 100% com o gene Tem-116 de referência (nº de acesso [AY425988.1](#)).

Estudos mostram microrganismos ambientais que carregam genes que codificam resistência a antibióticos, mesmo para aqueles ambientes que nunca estiveram sob pressão de seleção de contaminantes antrópicos (Allen et al., 2010). Bactérias multirresistentes têm sido descobertas em ambientes isolados por milhares de anos. Essas cepas bacterianas apresentam resistência a uma ampla gama de antibióticos, incluindo os β -lactâmicos, sugerindo que os genes de resistências a antibióticos (ARGs) ocorram de forma natural no microbioma ambiental (Bhullar et al., 2012; D'Costa et al., 2011). Zeil et al. (2016) descrevem a evolução

de TEM-116, sua ampla disseminação e seu estabelecimentos em múltiplos plasmídeos, indicando a provável ocorrência e evolução dessa enzima de forma natural em bactérias (Jacoby e Bush, 2016). Li, Xi e Zhang (2017) analisando a presença de MRGs e ARGs em uma coletânea de genomas bacterianos completos (solo, água e humano), revelaram que os beta-lactâmicos, macrolídeo-lincosamida-estreptogramina (MLS), bacitracina, aminoglicosídeo e tetraciclina estão em entre os cinco tipos de ARGs mais abundantes. Este ARG também foram encontrados no genoma da cepa 3A. Entre os MRGs, há uma abundância para o genes que integram sistemas que conferem resistência ao As, Zn, Cu, Ni, Mn e Hg.

No genoma de *B. safensis* 3A foram encontradas funções associadas à resistência metais pesados e antibióticos. As funções anotadas para cepa 3A foram operon de regulador efluxo de Hg (*merR*), transportador de metal divalente (*mntH*), transporte de Cd, Zn e Co (*CadA*), transporte de Co e magnésio (*CorA*), transporte Cu (*CsoR*, *copA copC*, *copD*, *copZ*, *ycnJ*), resistência e efluxo do Cu (*ricC*, *yfmO*), complexo transportador de íons bivalentes de Ni, Co e Zn (*cntA*, *cntC*, *cntD*, *cntF*), transporte de Ni ABC (*nikA*, *nikB*, *nikE*), bomba de efluxo e sistema operon de Mn (*MntR*, *MneP*, *MneS*, *mntP*, *mntA*, *mntB*, *mntC*), sistema de efluxo As (*arsB*), arsênio redutase (*spx*), bomba de efluxo óxido de ferro (II), Cd e Zn (*fieF*), transporte de óxido de ferro (II) redutase (*FhuF*, *lucA/lucC*), transporte do cromato (*chrA*) e proteína de resistência ao telúrio (*TerD*, *TerZ*, *TehB*).

Aos antibióticos, foram anotadas funções para cepa 3A que podem contribuir na resistência a múltiplas drogas/antibióticos, sendo elas, efluxo de macrolídeos (*mef* transportador MFS), resistência à bleomicina (enzima glioxalase), resistência múltiplas drogas (*ebrAB*, *yheIHL*, *bmr3*, *emrY*, *NorM*, *yokD*), resistência à espectinomicina e tetraciclina (*stp*), resistência tetraciclina classe B e C (*tetA*), resistência à bacitracina (*BacA*, *BceS*, *BceR*, *bcrC*), resistência à biclomicina (*bcr*), resistência à fosmidomicina (*fsr*), resistência à linearmicina (*lnrLM*), resistência à fosfomicina (*fosB*), resistência à lincomicina (*lmrA*), bomba de efluxo de drogas (*jefA*), efluxo de múltiplas drogas (*yfmO*), resistência a penicilina (beta-lactamase classe D de baixa atividade *YbhI*), resistência à fluoroquinona (*NorA*), resistência à cloranfenicol (CAT). Também observamos genes que conferem outras funções importantes para a sobrevivência do microrganismo em condições estressantes, como resistência à 2-metilhidroquinona e catecol (*MarR* *MhqR*), resistência à toxina ácido fusárico (*fusC*), resistência à canfora (*CrcB*, *CrcB*) resistência ao glifosato (*YhhS*), resposta ao estresse salino (*yocM*), resposta ao dano do DNA pela radiação UV (*uvsE*), múltipla resistência e regulação de pH (*MrpF* / *PhaF*), produção de sideróforos (*YfhA*, *YfiZ*, *YfiY*, *YusV*, exportador de ácido aromático (*ArAE_1*), síntese de cobalamina (*cobW*, *cobT*), resistência a ânions tóxicos (*TelA*), biossíntese de surfactina (*SrfA-A*,

SrfA-B, SrfA-C, SrfA-D), biossíntese de menaquinona (*menA*, *menC*, *menD*, *men E*, *menF*, *menH*) e ubiquinona (UbiE), biossíntese do heme (*hemB*) e siroheme (CysG), produção e transporte de bacteriocina (*skfE*, *skfA*, *skfB*, *skfC*, *skfF*, *skfG*, *skfH*).

As diversas características tornam este organismo potencialmente aplicável em uma ampla gama de aplicações biotecnológicas. Estudos têm revelado esse potencial biotecnológico de *B. safensis*. Raja e Omine (2012) isolaram cepa MS11 de *Bacillus safensis* do deserto da Mongolia que exibia alta resistência aos metais As, Cd, Cr, Cu, Ni, Zn, Pb (chumbo), alto potencial de acumular boro (B) (2,6 mg/L) e resistência ao sal cloreto de sódio (15%). Nossa cepa 3A apresenta genes que podem conferir as resistências observadas na cepa MS11, como *asrB* e *yocM*. Além disso, Máthé et al. (2012) detectaram a resistência a metais pesados e antibióticos em uma cepa isolada de áreas contaminadas com metais pesados e hidrocarboneto que apresenta capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos.

Assim como encontrado na cepa 3A, Fischer et al. (2018) detectaram genes determinantes de resistência a vários metais e metalóides. A cepa JG-B5T de *B. safensis* de uma pilha de resíduos de mineração de urânio contendo genes como *ArsB*, *CorA* responsáveis pelo efluxo As e transporte de Co e Mg (magnésio), respectivamente. De modo geral estudos tem mostrado o potencial que *B. safensis* apresenta em atividades bio-susfatorante, antimicrobiana, antitumoral (Abdelli et al., 2019), potencial biofertilizante fitoestabilizador para solos contaminados por metais pesados (Nazli et al., 2020), biodegradação de pesticidas (Ishag et al., 2016), degradação de hidrocarboneto aromático policíclico (pireno e benzo[e]pireno) (Hanano et al., 2017). A cepa KCTC 12796BR de *B. safensis*, que apresentou maior similaridade com cepa 3A, possui atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas. Assim como encontrado em nossos estudos, Qureshi et al. (2020) mostra a predominância do gênero *Bacillus* nos manguezais da Arábia Saudita e a importância desses ecossistemas para prospecção de novos compostos.

5.4.2. *Mucilaginibacter* sp. 21P

A cepa S21 trata-se de uma bactéria do gênero *Mucilaginibacter*, pertencente à família *Sphingobacteriaceae*. São caracterizadas como bactérias Gram-negativas, quimio-organotróficas e aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, não formadora de esporos, imóvel, produtora substâncias poliméricas extracelulares (EPS) podendo ser encontrada em ambientes aquáticos, ácidos e terrestres (Pankratov et al., 2007; Urai et al., 2008; Baik et al., 2010).

A montagem no genoma da cepa S21, que chamamos de 21P, resultou em 1 contigs, sendo um cromossomo único circular de 4.739.655 pb. O sequenciamento ONT apresentou 154.909.335 pb e 33.969 reads e o sequenciamento Illumina apresentou 149.159.045pb e 495.545 reads. O genoma apresentou teor de G+C de 43.2% e cobertura de 64x. Identificamos 4167 sequências codificadoras de proteínas (CDS) e 47 genes de tRNAs, 6 de rRNAs e 3 ncRNAs. A análise de identidade média de nucleotídeo (ANI) no servidor JSpeciesWS mostrou a similaridade com as espécies depositadas no GenBank, determinando que a maior similaridade foi de 96,22% de ANIb e 96,99% de ANIm com *Mucilaginibacter* sp. MJ1A (nº de acesso [GCA_007846095.1](#)) isolado do solo em Gyongnam, Coreia do Sul. A maior similaridade com a espécie de referência *Mucilaginibacter rigui* foi de 73,93% de ANIb e 83,24% de ANIm (nº de acesso [GCA_014773275.1](#)). O genoma foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank sob os número de acesso [CP063061.1](#). A similaridade com a cepa MJ1A, (>95% de acordo com Goris et al., 2007) pode representar uma forte proximidade com esta cepa, porém trata-se de uma espécie desconhecida.

No genoma de *Mucilaginibacter* sp. 21P foram encontrados genes que expressam funções de resistência aos metais pesados, antibióticos e outros compostos. Para os genes de resistência a metais pesados encontramos resistência e efluxo para Cd, Co, Zn (*CzcD*, *czcABC*), resistência ao Cd (*cusR*), transporte de Cu (*cutC*), resistência ao mercúrio (*MerC*), resistência ao arsênio (*Acr3*, *ArsR*), transporte de óxido de ferro (II) (*feoAB*), transporte ABC óxido de ferro (III) (*afuA*), transporte de Co e magnésio (*CorA*), sistema de efluxo de Mn (*MntR*, *MneP*) transportador de metal divalente (*mntH*), arseniato redutase (*arsC*), bomba de efluxo As (*arsB*), bomba de efluxo de óxido de ferro (II) (*FieF*), resistência ao telúrio (*TerD*, *TerZ*, *TehB*).

As funções que conferem resistência aos antibióticos foram transportador de resistência múltiplas drogas (*Bcr/CflA*), resistência a múltiplos antibióticos (*MarR*, *MarC*, *MexA*, *MdtA*, *MdtB*), resistência à vancomicina (*vanJ*), resistência à acriflavina (*acrA*), bomba de efluxo multidrogas (*RND*, *AcrB*, *AcrD*, *AcrF*, *AcrR* e *NorM*), resistência múltiplas drogas (*Stp*, *YheI*), resistência a tetraciclina (*tetA*, *rteC*), resistência à fluoroquinolona (*NorA*), resistência à bacitracina (*BacA*), resistência à bleomicina (*ble*), efluxo ABC de bacteriocina (*MacB*), resistência a fosfomicina (*fosB*), resistência à meticilina (*MecI*), resistência à daunorubicina e doxorubicina (*DrrA*), resistência à linearmicina (*LnrL*), resistência à biciclomicina (*bcr*), resistência à colistina (*EmrA*), resistência ao cloranfenicol (*MdtL*) e mediação de resistência e efluxo de microcina (*yojI*). Outras funções foram observadas, como resistência a radiação UV (*uvrB*), resistência a hidróperóxido orgânico

(*ohrB*, *ohrR*), biossíntese de metionina (*MetW*), resistência a ânions tóxicos (*TelA*), resistência a compostos de amônio quaternário (*SugE*), resistência (desintoxicação) da toxina fúngica ácido fusárico (*FusC*), biossíntese de cabapenam (*CarD*), transporte de sideróforo Fe^{2+} (*TonB*, *SusC*, *ExbD*), bomba de efluxo de compostos tóxicos (*bepC*, *bepE*, *bepF*, *bepG*), bomba de efluxo ácido hidroxibenzoico (*AaeA*), bomba de efluxo tolueno (*TtgA*, *TtgI*), bomba de efluxo de solventes (*SrpA*).

O gênero *Mucilaginibacter* tem sido descrito na literatura com grande potencial para diversas aplicações biotecnológicas. Por exemplo, Li et al. (2022) isolaram uma cepa de *M. rubeus* P2 de uma mina de ouro-cobre com resistência à Cu e Zn, com capacidade de bioadsorção de As, Cu e Au. O estudo ressalva a importância da superprodução de EPS desse organismo para biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados. Fan et al. (2018) descrevem capacidade de biorremediação de uma cepa com resistência a vários metais e capacidade de bioadsorção de Zn e Cd. A cepa TBZ30^T foi isolada de um arrozal contaminado com metais pesados e também apresenta potencial de aplicações biotecnológicas. Uma outra cepa YX-36 de *Mucilaginibacter*, isolada de uma horta na China apresentou resistência à ampicilina, carbenicilina, canamicina, vancomicina, gentamicina, cloromicetina e cefixima (Jing et al., 2016).

A contaminação por metais pesados, tais como Hg, Pb, Zn, Cu e Cd, estão se acumulando em concentrações críticas no ambiente, em decorrência das diversas atividades antropogênicas e dos subprodutos gerados a partir delas, como rejeito de mineração (Chen et al., 2019), despejo de esgoto (Zhao et al., 2019), resíduos industriais (Salam, 2020) e os setores da agropecuária (Cavaco et al., 2011; Berg et al., 2005) e aquicultura (Rodríguez-Blanco 2012).

Estudos sustentam a co-seleção de resistência antibióticos e metais via co-resistência (Imran et al., 2019). Genes encontrados nas cepas 3A e 21P foram descritos na literatura conferindo resistência cruzada, por exemplo Nishino et al. (2007) revelam que proteínas de efluxo de drogas AcrD e MdtABC contribuem para resistência ao Co e Zn. Perron et al. (2004) mostrou a co-regulação através da bomba de efluxo de Cd/Co/Zn e resistência aos antibióticos carbapenêmicos. Outro estudo demonstrou a resistência cruzada, onde a proteína de efluxo do tipo ABC MacAB, que confere resistência à antibióticos do tipo macrolídeo, também foi usada na extrusão de As (III) e penicilina (Shi et al., 2019). A bomba de efluxo TetA que promove a extrusão da tetraciclina também pode favorecer a resistência ao Co (Cheng et al., 1996).

A presença de bombas de efluxo, relatada como um dos principais mecanismos envolvidos na excreção de substâncias tóxicas, absorção de nutrientes e íons essenciais (famílias ATP-ABC, MFS, MATE, MDR e RND) (Fernandes, 2003; Li e Nikaido, 2004) e a presença de elementos genéticos móveis (plasmídeo, transposons e integrons) (Imran et al., 2019) desempenham um papel importante na evolução e estabelecimentos dos microrganismos (Miller, 2004). Ambos microrganismos, cepa 3A e 21P, apresentam variadas funções com grande potencial biotecnológico e de importância médica. Futuros estudos trarão novas perspectivas para aplicabilidade dos genes encontrados aqui.

Alguns resultados apresentados nesse tópico para *B. safensis* 3A e *Mucilaginibacter* sp. 21P também estão descritos nos seguintes artigos:

- Defalco T, Vasconcelos ALS, Dias ACF, Barrientos L, Bernardino ÂF, Andreote FD, Núñez-Montero K. Complete Genome Sequence of *Bacillus safensis* Strain 3A, a Heavy Metal-Resistant Bacterium Isolated from Contaminated Estuarine Sediment in Brazil. *Microbiol Resour Announc.* 2021 Apr 22;10(16):e00268-21 <https://doi.org/10.1128/mra.00268-21>
- Vasconcelos ALS, Defalco T, Dias ACF, Barrientos L, Bernardino AF, Andreote FD, Núñez-Montero K. Complete Genome Sequence of a *Mucilaginibacter* sp. Strain Isolated from Estuarine Soil Contaminated with Mine Tailings from the Samarco Disaster at Fundão Dam. *Microbiol Resour Announc.* 2021 Oct 14;10(41):e0077921. <https://doi.org/10.1128/mra.00779-21>

5.5. Curva de crescimento de *B. safensis* 3A na presença de Co, Mn e Zn

As bactérias possuem diversos mecanismos que permitem que se estabeleçam e prosperem em ambientes contaminados. Para avaliar o perfil de crescimento em meio contaminado com Zn, Co e Mn (separado e misturado) e sem contaminação (controle) foram construídas curvas de crescimento para a cepa 3A em meio LB. Para a cepa 21P a presença dos metais inibiram o crescimento em condições de meio líquido, fator que limitou a inferência de resultados para análise da curva de crescimento dessa cepa, principalmente em virtude do crescimento deste microrganismo ser mais lento.

A curva de crescimento microbiano obtida por densidade óptica (OD 600nm) para cepa 3A no meio controle mostra que o período de adaptação (fase Lag) foi menor que 4 horas. A partir deste período observou um crescimento constante (fase Log). Observa-se que a

cepa 3A, até a última coleta (72h), ainda apresenta-se em fase logarítmica. Khanna et al. (2012) relatam o crescimento de uma cepa de *Bacillus pumilus* em meio LB, espécie mais próxima de *B. safensis*, apresentando comportamento semelhante de crescimento

O crescimento de 3A variou na presença do Co. A cepa 3A apresentou crescimento na presença de 400 mg/L de Co onde a fase lag aumentou (12 h) e alterou o final da fase log para 48 h, atingindo a fase estacionária. O mesmo também foi observado na presença de 800 mg/L de Co, porém com início da fase log em 24 h (Figura 11).

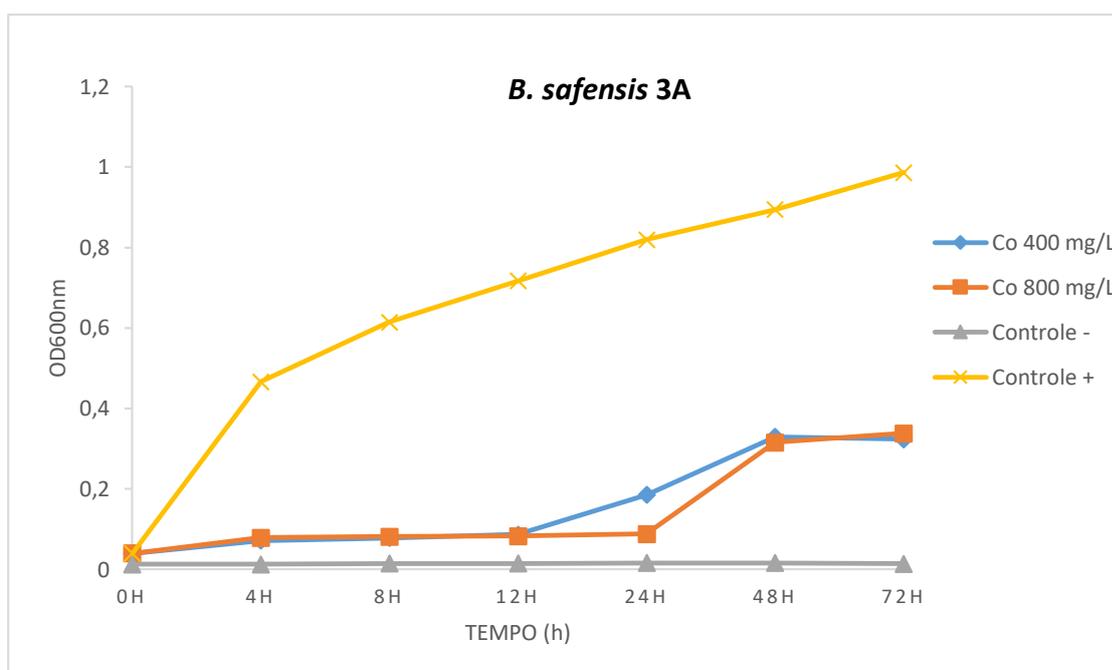


Figura 11 - Curva de Crescimento de *B. safensis* 3A em meio controle e com concentrações de Co

Embora o crescimento tenha sido reduzido frente a presença do Co, é possível observar o estabelecimento de 3A na presença deste metal em altas concentrações. Como discutido anteriormente, o Co é um elemento essencial, porém em altas concentrações se torna tóxico, inibindo o crescimento microbiano. A cepa 3A apresenta mecanismos que permitem neutralizar os efeitos tóxicos do Co, através dos sistemas de efluxo CadA (Nies, 1992) e da proteína transportadora CorA (Guskov e Eshaghi, 2012).

A curva de crescimento para 3A foi construída na presença de Mn. O tempo de adaptação de 3A em meio com Mn se mostrou ser mais rápido do que na presença do Co. Semelhante ao meio controle, 3A após 72 h se encontrava em fase logarítmica, em ambas as concentrações, variando apenas a fase lag. Em 800 mg/L a fase lag foi de 8h e em 1.600 mg/L

de Mn, a fase lag foi de 12 h, seguido para fase log. A fase log foi observada até a última coleta (72 h) (Figura 12).

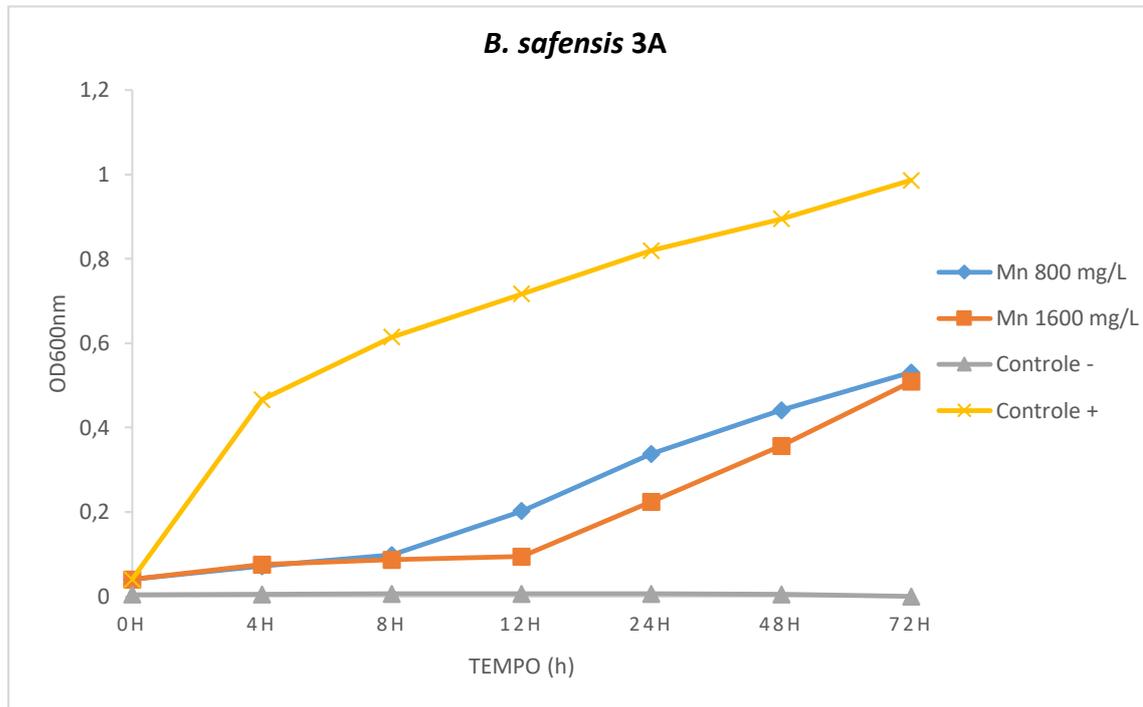


Figura 12. Curva de crescimento de *B. safensis* 3A em meio controle e com concentrações de Mn

Em estudo realizado por Nies (1999), o Mn foi o elemento que se observou ter a menor toxicidade entre os demais metais pesados analisados. Como relatado anteriormente, Queiroz et al. (2021a) revelaram que a concentração do Mn aumentou em 880% na área onde as cepas 3A e 21P foram isoladas, tornando-se um grave problema social e ambiental, devido a contaminação crônica deste metal no estuário do rio Doce. A cepa 3A apresenta genes que conferem a resistência ao Mn. Por exemplo, quando o Mn está em excesso intracelularmente, a concentração do Mn é regulada por MntR (Guedon e Helmann, 2003). MntR reprime genes importadores (*mntH* e *mntABC*) e ativa genes responsáveis pela bomba de efluxo (*mneP* e *mneS*), para que o Mn seja removido de dentro célula (Paruthiyil et al., 2020). Dessa forma, a expressão desses genes pode ser o mecanismo responsável pela resistência microbiana em altas concentrações de Mn. Ressaltamos que o rejeito tóxico que contaminou o estuário do rio Doce é rico em Fe (Queiroz et al., 2018), Guedon e Helmann (2003) revelam ainda a

capacidade de MntR em detectar e regular Fe(II) em cepa do gênero *Bacillus*, fato relevante quando se trata de ambientes contaminados com mais de um metal tóxico.

O Zn foi o metal pesado que resultou em maior interferência no desenvolvimento da cepa 3A. Contudo, 3A, apresentou fase lag de 12 horas na concentração de 250 mg/L de Zn, seguida de fase logarítmica, curva semelhante a observada na concentração mais alta do Mn. Já na concentração de 500 mg/L de Zn, o crescimento celular de 3A foi inibido, possivelmente pela toxicidade da alta concentração (Figura 13).

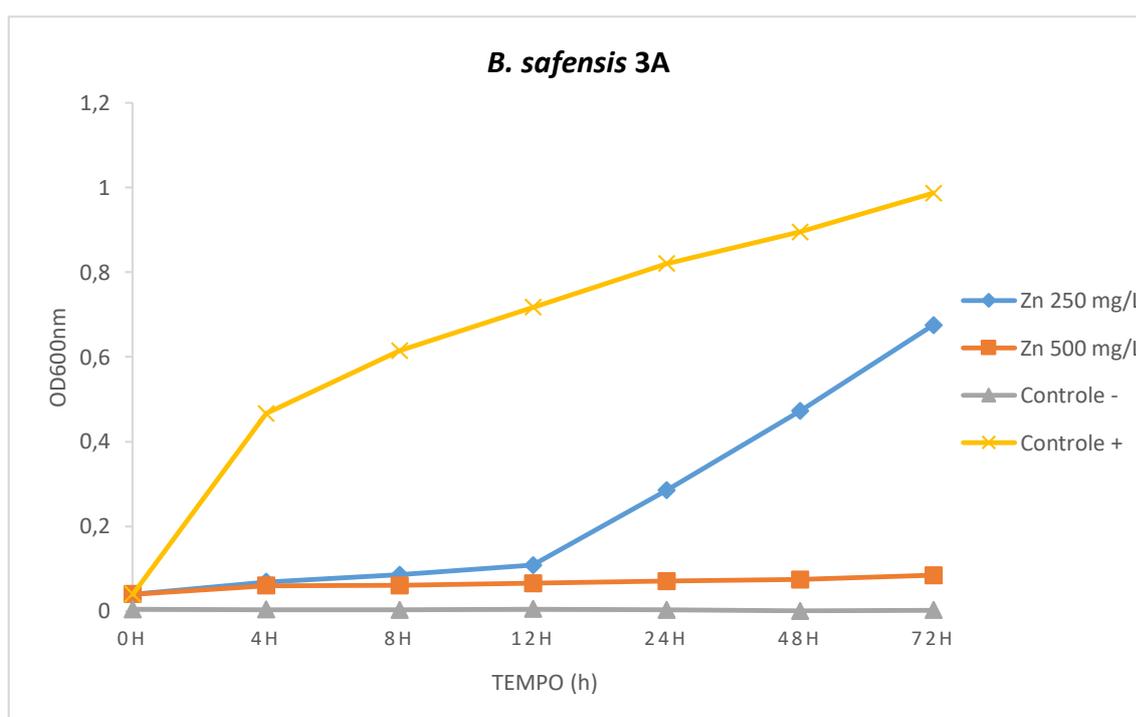


Figura 13. Curva de crescimento de *B. safensis* 3A em meio controle e com concentrações de Zn

A bomba de efluxo ATPase do tipo CPx capaz de contribuir com a resistência/tolerância ao Zn, que está presente no genoma de 3A, é o CadA (sistema de captação de íons Zn ZosA descrito em *B. subtilis*) (Gaballa et al., 2002).

A curva de crescimento foi construída para os metais em conjunto, sendo 4 tratamentos (Mix I, II, III, IV) para cepa 3A. A cepa 3A foi inoculada em meio com as seguintes concentrações: Mix I - Zn 60 mg/L, Mn 200 mg/L e Co 100 mg/L; Mix II - Zn 120 mg/L, Mn 400 mg/L e Co 200 mg/L; Mix III - Zn 250 mg/L, Mn 800 mg/L e Co 400 mg/L;

Mix IV - Zn 500 mg/L, Mn 1600 mg/L e Co 800 mg/L. O crescimento de 3A em meio contendo combinação dos metais tóxicos variou (Figura 14).

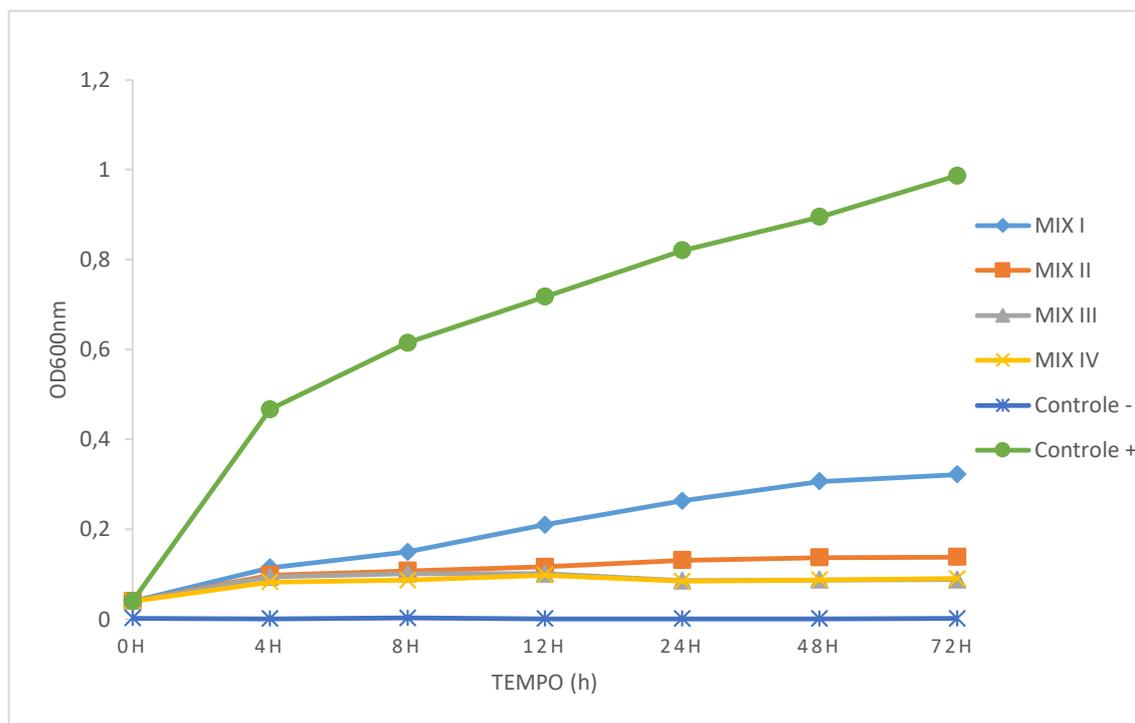


Figura 14. Curva de crescimento de *B. safensis* 3A em meio controle e com concentrações Mix dos metais Zn, Co e Mn

A presença de Zn, Mn e Co alterou o crescimento de 3A. Na presença de Zn, Mn e Co (Mix I) observamos um crescimento, onde a fase log se iniciou nas primeiras 4 h, e possível fase estacionária se iniciando as 72 h. No meio Mix II, a fase lag para *B. safensis* 3A se estendeu por 72 h. Nos demais meios Mix (III, IV) a fase lag durou 12 h seguido de uma diminuição do crescimento.

Verificamos assim, que o estabelecimento de 3A na presença dos metais pesados, separadamente ou em conjunto, é alterado, embora presente resistência e o Zn promova maiores efeitos deletérios ao crescimento na maior concentração. Ainda que 3A tenha apresentado tolerância a presença dos metais pesados, Co e o Zn tenha conferido maior inibição do crescimento na concentração mais alta, a variação do crescimento pode ser em resposta ao efeito tóxico que os metais pesados promovam, principalmente quando exposta aos metais em conjunto. Mesmo com a expressão de genes que proporcionem resistência, o tempo de adaptação parece ser estendido, bem como a fase exponencial é suprimida. Contudo,

ainda assim é possível verificar a aptidão de 3A em prosperar em meio contaminado com contaminante.

5.6. Capacidade remoção dos metais do meio de cultura

Nos ensaios realizados para avaliar o potencial de remoção foram utilizados os metais Zn, Mn e Co para os testes com cepa 3A em meio LB. Para avaliação da cepa 21P a taxa de remoção foi realizado com os metais Mn e Co em meio R2A. No total as cepas foram incubadas por 3 dias, sendo 1 coleta a cada 24 h e analisadas por ICP-OES.

5.6.1. *Bacillus safensis* 3A

A cepa 3A apresentou a maior taxa de remoção dos metais tóxicos do meio de cultura. Foram detectadas eficiência na remoção dos metais nas menores concentrações na ordem de Zn>Co>Mn. Já a remoção do metais pesados pela cepa 3A do meio de cultura nas maiores concentrações foi na ordem de Co>Mn>Zn. (Figura 15).

No meio contendo as concentrações de Co a taxa de remoção foi de 22,2% do meio com 400 mg/L e de 44,97% em meio de 800 mg/L. Essa taxa de remoção ocorreu quanto o crescimento se encontrava na fase estacionária (48 h e 72 h) (Figura 15 A). No meio contendo Mn a remoção foi de 7,12% de 800 mg/L e de 24,8% de 1.600 mg/L. A remoção foi observada na fase log. Assim, acreditamos que a porcentagem de remoção do Mn poderia ser aumentada se fosse observada até que a fase estacionária fosse alcançada, onde seria atingida a capacidade de replicação celular e possivelmente o aumento da remoção do metal (Figura 15 B). No meio contendo Zn a remoção foi de 45,98% de 250 mg/L e de 10,17% de 500 mg/L. A remoção do Zn ocorreu na fase log do crescimento celular, onde essa fase foi observada até a última coleta (72 h). Assim como ocorreu no meio com Mn, existe a possibilidade da taxa de remoção ser elevada com o prolongamento do tempo de inoculação na cepa 3A no meio com Zn. Já no meio com 500 mg/L, embora a remoção tenha sido verificada, a capacidade de remoção foi baixa em decorrência da alta concentração do metal ter inibido o crescimento celular. Acreditamos que o zinco possa ter sido biosorvido pelas células (Figura 15 C).

A inoculação de 3A em meio LB contendo os metais pesados associados (Mix) influenciou a capacidade de remoção dos metais tóxicos do meio de cultura. As melhores taxas de remoção foram observada no Mix I, onde haviam as menores concentrações dos metais e remoção foi de 11,4% de Co, 13,38% de Mn e 14,24% de Zn. A remoção ocorreu na fase log, e existe a possibilidade da taxa de remoção aumentar com o prolongamento do

tempo, assim como na avaliação da remoção de Mn e Zn. Ainda que as concentrações dos metais pesados nos meios Mix II, III e IV tenham afetado substancialmente o crescimento de 3A, foi possível observar a capacidade de remoção do meio de cultura mesmo no estágio de latência da bactéria. (Figura 16).

Remoção de metais pesados Co, Mn e Zn por *Bacillus safensis* 3A

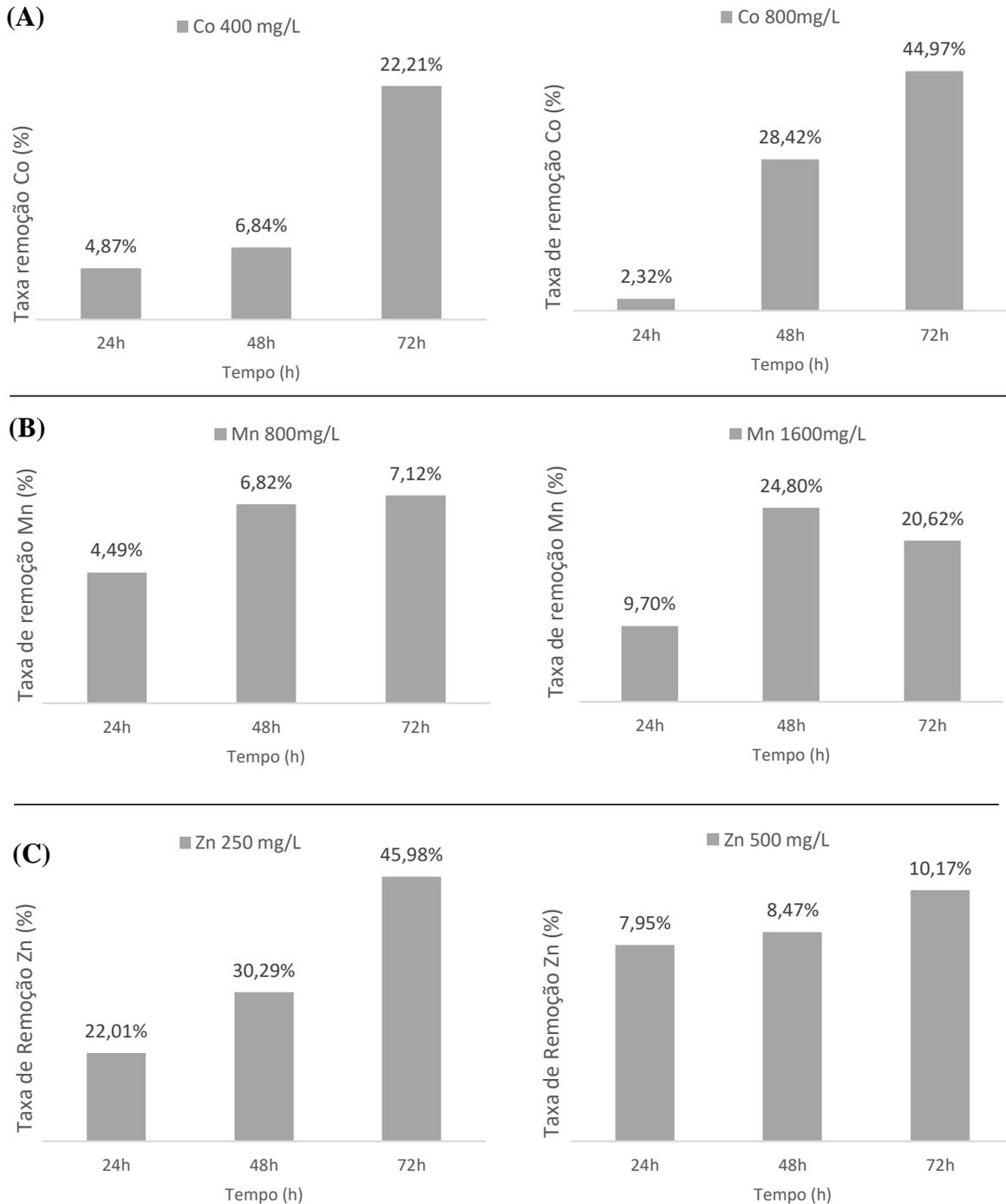


Figura 15. Taxa de remoção de Co (A), Mn (B) e Zn (C) em meio LB por *B. safensis* 3A

Remoção de metais pesados meio Mix de Co, Mn e Zn por *Bacillus safensis* 3A

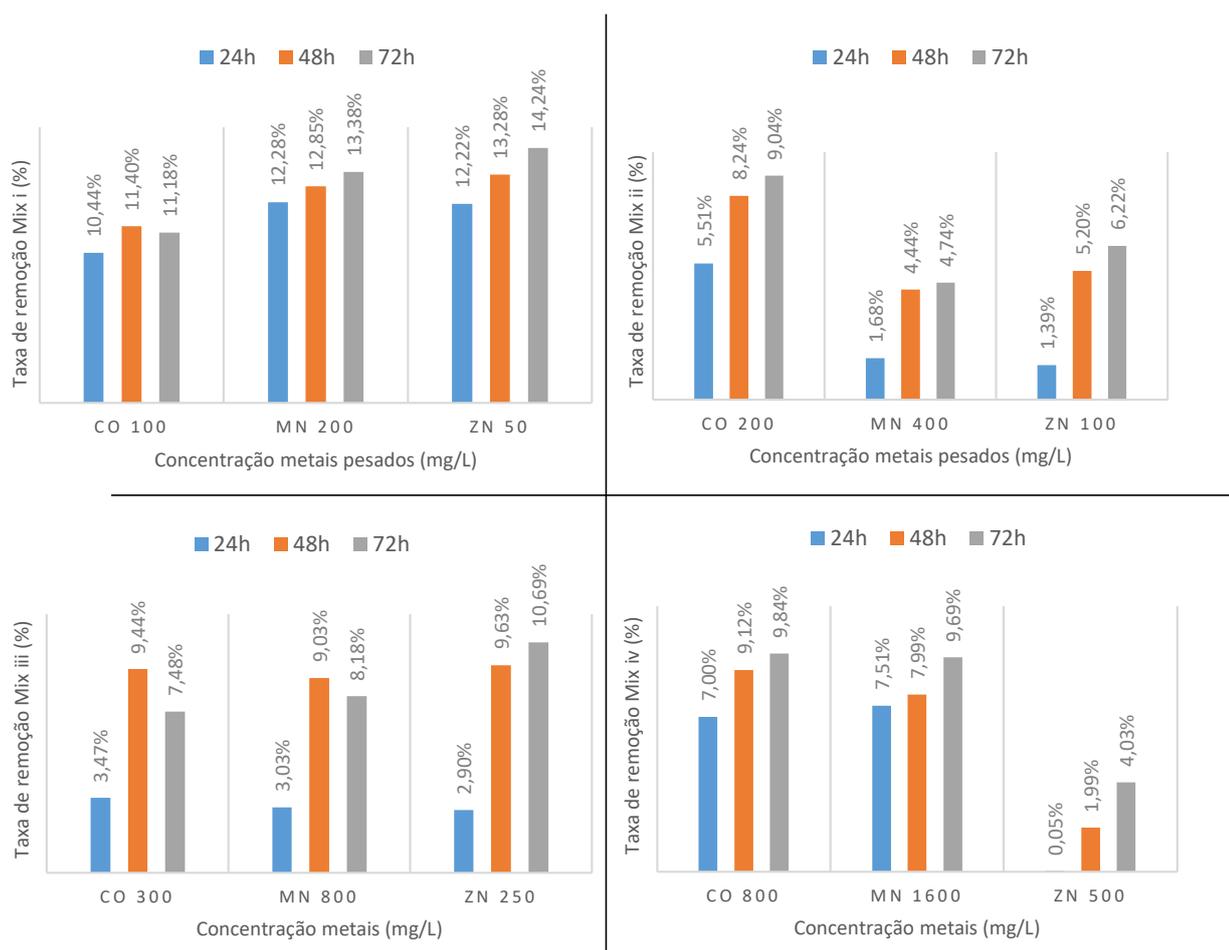


Figura 16. Remoção dos metais pesados associados em meio LB Mix (I, II, III, IV) por *B. safensis* 3A

Como relatado anteriormente, os metais pesados podem influenciar a atividade microbiana, de modo que as bactérias respondam satisfatoriamente as altas concentrações dos metais pesados expressando conjuntos específicos de genes, como visto nas concentrações mais altas de Mn e Co, onde pode ocorrer maior expressão de sítios ativos de ligação dos metais (Chandrangsu et al., 2017). A cepa 3A de *B. safensis* apresenta genes que favorecem o estabelecimento em meios contaminados. Entre os genes expressos, *CadA*, *CorA* e *MntR* são importantes para que esse organismo possa se estabelecer e sobreviver em ambientes contaminados.

Estudos tem mostrado o potencial de biorremediação de *B. safensis*. Por exemplo, Kalaimurugan et al. (2020) isolaram de solo contaminado com curtume a cepa YKS2 de *B. safensis* que apresenta capacidade de degradar cromo em 72%. Ran et al. (2021) descreveram a capacidade de *B. safensis* (ST7), isolada do solo de uma mina de Mn abandonada, em tolerar

estresse multimetálico e remover até 82% de Mn de uma concentração de 2.200 mg/L por precipitação de óxidos de Mn. O estudo revela que os mecanismos de adaptação da cepa ST7 envolve precipitação extracelular, oxidação enzimática e bombas de efluxo ativas. Ahmed et al. (2020) isolaram a cepa TEN12 de *B. safensis* de solo contaminado com efluentes da indústria de couro contendo metais pesados. A cepa TEN12 apresentou resistência a prata e biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) intracelular com efeito bactericida contra patógenos humanos e potencial de atividade contra celular de câncer hepático. Priyalaxmi et al. (2014) verificaram o potencial de biorremediação uma cepa de *B. safensis* isolada de um ecossistema de manguezal, com resistência aos metais Cd, Pb, Cu, Az e Co, capaz de remover até 92% do Cd por absorção.

Estes são alguns dos exemplos de aplicações de espécie dessa bactéria. As excelentes habilidades de adaptação as altas concentrações de metais pesados e a eficiência na remoção desses metais, conferidos neste estudo, indicam fortemente que *B. safensis* 3A pode ser usado na biorremediação de metais pesados. Sugerimos futuros estudos para exploração dos genes de resistência encontrados, bem como a avaliação da capacidade remediação de outros metais e os mecanismos utilizados por esta bactéria para biorremediar ambientes contaminados.

5.6.2. *Mucilaginibacter* sp. cepa S21

A avaliação de remoção dos contaminantes do meio R2A para *Mucilaginibacter* sp. 21P, foi para Co e Mn. A tomada de decisão pela retirada do Zn nesta etapa foi pela resposta inibitória do crescimento de 21P. A taxa de remoção das menores e maiores concentrações foi na ordem de Mn>Co (Figura 17). Diferentemente do que foi observado em meio de cultura sólido, 21P foi sensível à presença de Co, Mn e Zn nas concentrações usadas para 3A.

Embora o crescimento da S21 tenha sido prejudicado na presença dos metais devido ao crescimento tardio, ainda assim, foi possível observar remoção dos metais do caldo R2A. No meio contendo a concentrações de 200 mg/L de Co, a taxa de remoção foi de 13,82% nas primeiras 24 h, reduzindo remoção do Co a 8,6% até as 72 h. Acreditamos que, possivelmente, pode ter ocorrido a bioacumulação neste caso, onde o metal é acumulado intracelularmente e posteriormente extrusado, ressaltando assim a importância de estudos com a oxidação e redução desses metais para verificação de sua valência. No meio R2A com 400 mg/L de Co a maior taxa de remoção foi de 2,34%. Embora as concentrações tenham sido reduzidas daquelas usadas para 3A, ainda assim a cepa 21P não foi capaz de tolerar a nova concentração proposta, sendo a remoção insatisfatória. Assumimos que avaliações futuras de

biorremediação deverão ser realizados com menores concentrações de Co (Figura 16 A). No meio contendo Mn as maiores taxa de remoção foi observada nas 72 h, sendo de 15,14% de 400 mg/L e de 5,2% de 800 mg/L. Em virtude de *Mucilaginibacter* sp. 21P apresentar crescimento mais lento em comparação a cepa 3A, acreditamos que a porcentagem de remoção do Mn pode ser aumentada se o tempo de inoculação for estendido (Figura 16 B).

Remoção de metais pesados Co e Mn por *Mucilaginibacter* sp. 21P

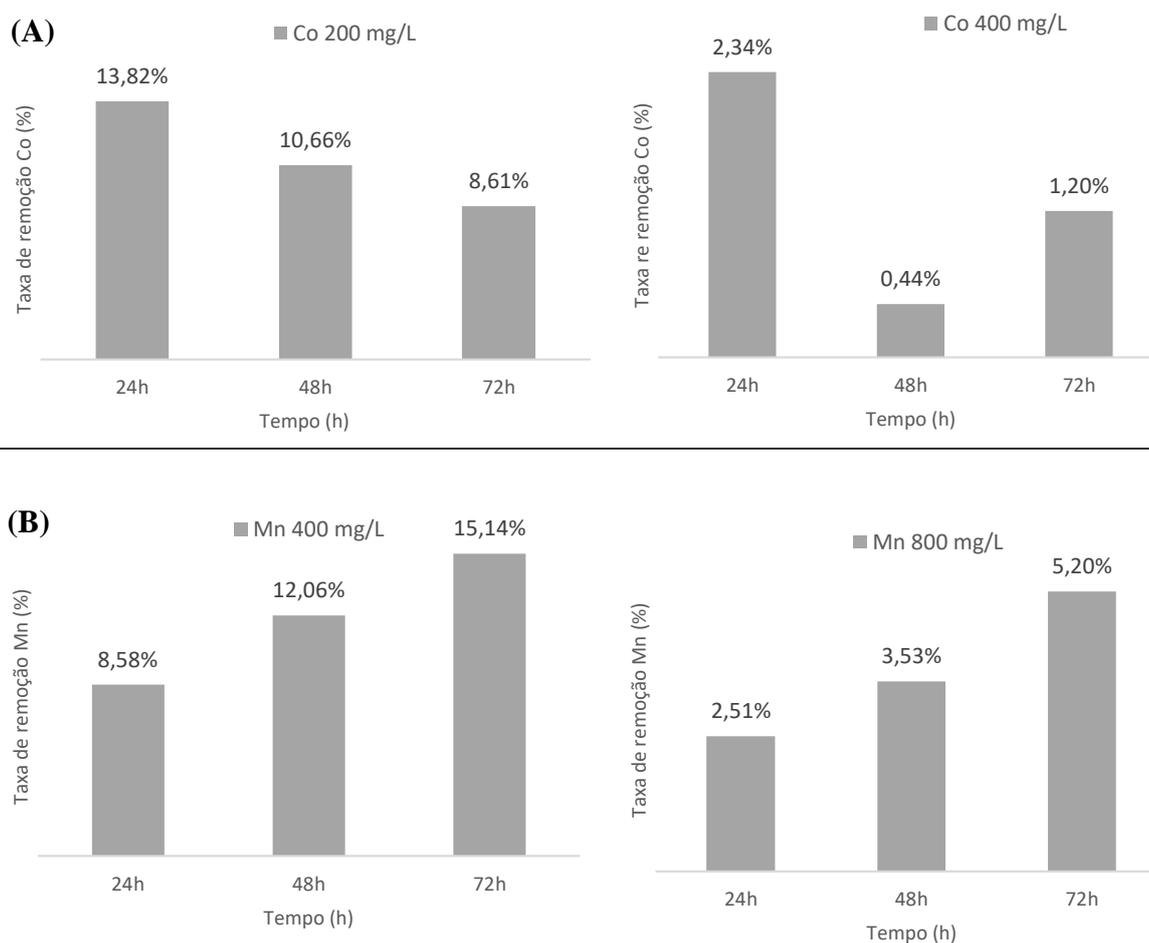


Figura 17. Taxa de remoção de Co (A) e Mn (B) no meio R2A por *Mucilaginibacter* sp. 21P

A inoculação de 21P em meio R2A contendo os metais pesados associados Co e Mn (Mix) em menores concentrações favoreceu a remoção de ambos os metais. A taxa de remoção para o Mix I, onde haviam as menores concentrações dos metais foi de 52,97% para 50 mg/L de Co e 42,46% para 200 mg/L de Mn. A taxa de remoção para Mix II foi de 20,44% para 100 mg/L de Co e 17,85% para 400 mg/L de Mn (Figura 18).

Remoção de metais pesados meio Mix de Co e Mn por *Mucilaginibacter* sp. S21

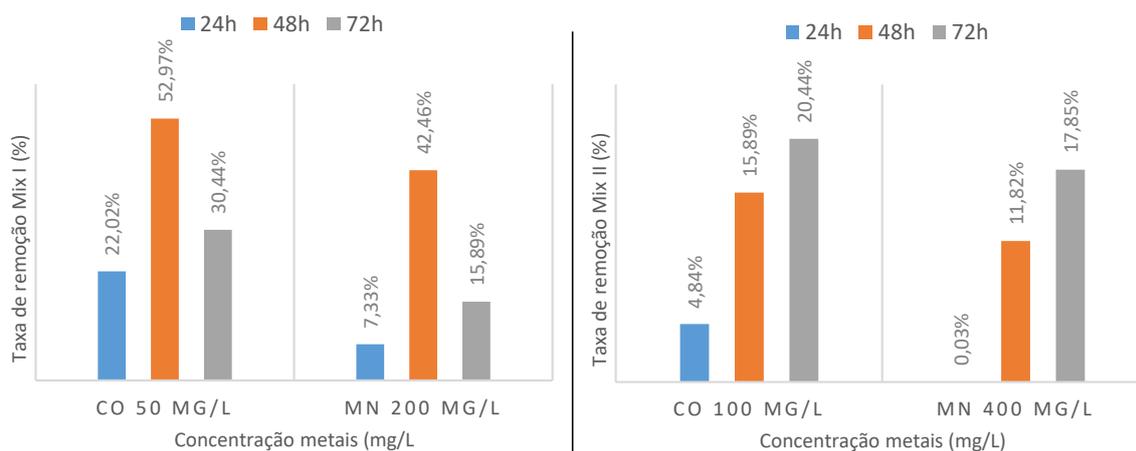


Figura 18. Remoção dos metais pesados associados em meio R2A Mix (I, II) por *Mucilaginibacter* 21P

Ainda que seja um gênero pouco descrito na literatura, estudos mostram que *Mucilaginibacter* sp. apresenta potencial de aplicação biotecnológica. Zhou et al. (2019) isolaram uma nova cepa de *Mucilaginibacter* do solo de mina de Mn, com resistência a uma ampla gama de antibióticos. Li et al. (2022) isolaram *M. rubeus* P2 de solo de mina de ouro-cobre exibindo alta resistência a metais e alta produção de EPS. O EPS apresentou alta bioadsorção de As, Cu e Au, exceto Zn. Fan et al. (2018) isolaram uma cepa TBZ30^T de *Mucilaginibacter pedocola* de arrozal contaminado, com capacidade de adsorver Zn e Cd, apresentando grande potencial de biorremediação. Além disso, Kumar et al. (2021) descrevem o potencial do EPS de uma cepa isolada de uma geleira no Himalaia, que mostrou capacidade de biosorção dos íons metálicos Cu, Fe, Mn e Zn. O estudo mostra o potencial do EPS extraído para aplicação na remoção de metais tóxicos. Demais estudos envolvendo gênero *Mucilaginibacter* se concentram na descrição metabólica e na resistência aos antibióticos. Futuros estudos serão importantes para o desenvolvimento de ferramentas que explorem o potencial genômico e biotecnológico de *Mucilaginibacter* sp. 21p.

Foram observados diversos genes de resistência a metais pesados, antibióticos, solvente, pesticida, genes envolvidos em atividade antimicrobiana e antifúngica, entre outros. A cepas possuem potencial para uso em processos de biorremediação devido a remoção dos metais no meio de cultura. Futuros estudos serão importantes para explorar outros mecanismos de resistência e de potencial biotecnológico e médico de ambas as cepas.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo visou o isolamento de bactérias do estuário do rio Doce que foi contaminado com rejeito contendo metais pesados após a barragem de rejeito de minério de ferro do Fundão se romper e despejar mais de 50 milhões de m³ de rejeito no rio Doce, atingindo o oceano Atlântico. A partir do isolamento e identificação dos isolados, avaliamos a resistência e o potencial de biorremediação de cepas resistentes a metais pesados. Os dados apresentados aqui poderão viabilizar estudos posteriores de remediação de locais contaminados com rejeito contendo metais tóxicos.

Neste estudo, foi observado um predomínio do gênero *Bacillus* nas amostras de rejeito com grande resistência ao Mn, Co, Zn e Cd e antibióticos. Foi observado e constatado também que as cepas avaliadas possuem potencial para uso em processos de biorremediação devido a resistência apresentada frente aos metais, e aos resultados de remoção dos metais pesados em altas concentração do meio caldo, corroborando os reportados na literatura disponível.

Por meio da extração do DNA e sequenciamento do gene 16S rDNA os isolados foram identificados. Através do sequenciamento genômico completo e montagem do genoma identificamos os dois isolados selecionados para os testes de biorremediação. A cepa Gram-positiva *Bacillus safensis* 3A e a cepa Gram-negativa *Mucilaginibacter* sp. 21P apresentaram alta resistência aos metais pesados e aos antibióticos. O fato dessas linhagens serem isoladas do próprio ambiente possibilita sua aplicação em processos de biorremediação *in situ*.

No Brasil, dezenas de barragens de rejeito tóxico são consideradas de alto risco para rompimento e dano socioambiental. Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de técnicas que minimizem os impactos inerentes à atividade mineral. Utilizar microrganismos adaptados às altas concentrações do contaminante, aumenta significativamente as chances de sucesso de uma remediação das áreas contaminadas.

O desastre de Mariana e Brumadinho são trágicos exemplos dos impactos que a indústria de mineração pode gerar. Futuros estudos são necessários para mitigar os efeitos de longo prazo que os contaminantes associados ao rejeito causam no ambiente. Devido ao baixo custo e os resultados satisfatórios a biorremediação pode ter uma ferramenta importante na recuperação das áreas afetadas com rejeito de mineração.

REFERÊNCIAS

- Abdelkhalik A, Al-Askar AA, Behiry SI. *Bacillus licheniformis* strain POT1 mediated polyphenol biosynthetic pathways genes activation and systemic resistance in potato plants against Alfalfa mosaic virus. **Sci Rep**. 2020 Sep 30;10(1):16120. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72676-2>
- Abdelli F, Jardak M, Elloumi J, Stien D, Cherif S, Mnif S, Aifa S. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. **Biodegradation**. 2019 Aug;30(4):287-300 <https://doi.org/10.1007/s10532-018-09865-4>
- Ahmed T, Shahid M, Noman M, Bilal Khan Niazi M, Zubair M, Almatroudi A, Khurshid M, Tariq F, Mumtaz R, Li B. Bioprospecting a native silver-resistant *Bacillus safensis* strain for green synthesis and subsequent antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles. **J Adv Res**. 2020 May 17;24:475-483. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.05.011>
- Aka RJN, Babalola OO. Identification and characterization of Cr, Cd, and Ni tolerant bacteria isolated from mine tailings. **Bioremediat. J**. 2017 21, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10889868.2017.1282933>
- Akinbowale OL, Peng H, Grant P, Barton MD. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **Int J Antimicrob Agents**. 2007 Aug;30(2):177-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>
- Albino J, Girardi G, do Nascimento KA. **Erosão e Progradação do Litoral do Espírito Santo**. In: Muehe, D. (ed.), *Erosão e progradação do litoral do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, Brasil. 2006 227-264.
- Allen DA, Austin B, Colwell RR. Antibiotic resistance patterns of metal-tolerant bacteria isolated from an estuary. **Antimicrob Agents Chemother**. 1977 12(4):545-7. <https://dx.doi.org/10.1128%2Faac.12.4.545>.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat Rev Microbiol**. 2010 Apr;8(4):251-9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Alonso A, Sánchez P, Martínez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environ Microbiol**. 2001 Jan;3(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00161.x>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**. 1990 215(3):403-10. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, de Moraes Gonçalves JL, Sparovek G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorol. Z**. 2013 22:711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- Amachawadi RG, Scott HM, Alvarado CA, Mainini TR, Vinasco J, Drouillard JS, Nagaraja TG. Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of U.S. feedlot cattle fed copper-supplemented diets. **Appl Environ Microbiol**. 2013 Jul;79(14):4369-75. <https://doi.org/10.1128/aem.00503-13>
- Ameen FA, Hamdan AM, El-Naggar MY. Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. **Sci Rep**. 2020 Jan 15;10(1):314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57210-3>.
- Anas A, Akita H, Harashima H, Itoh T, Ishikawa M, Biju V. Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS quantum dots. **J Phys Chem B**. 2008 14;112(32):10005-11. <https://doi.org/10.1021/jp8018606>
- Andreote FD, Jiménez DJ, Chaves D, Dias AC, Luvizotto DM, Dini-Andreote F, Fasanella CC, Lopez MV, Baena S, Taketani RG, de Melo IS. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**. 2012;7(6):e38600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>.
- Andrews S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> > Acesso: 16 dez 2021

- ANM – Agência Nacional de Mineração - SIGBM - Sistema de Gestão de Segurança de Barragem de Mineração. 2020. Disponível em: <<https://app.anm.gov.br/SIGBM/Publico/GerenciarPublico>> Acesso: 13 dez 2020
- Auerbach EA, Seyfried EE, McMahan KD. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. **Water Res.** 2007 Mar;41(5):1143-51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>
- Ayangbenro AS, Babalola OO. Genomic analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and its heavy metal removal from polluted soil. **Sci Rep.** 2020 Nov 12;10(1):19660. doi: 10.1038/s41598-020-75170-x
- Baik KS, Park SC, Kim EM, Lim CH, Seong CN. *Mucilaginibacter rigui* sp. nov., isolated from wetland freshwater, and emended description of the genus *Mucilaginibacter*. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2010 Jan;60(Pt 1):134-139.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiol.** 2004 Jan;134(1):307-19. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LS. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.** 2005 Jan 1;33(Database issue):D154-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gki070>
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends Microbiol.** 2006 Apr;14(4):176-82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Balakrishna Pillai A, Jaya Kumar A, Thulasi K, Kumarapillai H. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. **Braz J Microbiol.** 2017 Jul-Sep;48(3):451-460. <https://doi.org/10.1128/genomea.01072-17>
- Banala UK, Indradyumna Das NP, Toleti SR. Uranium sequestration abilities of *Bacillus bacterium* isolated from an alkaline mining region. **J Hazard Mater.** 2021 Jun 5;411:125053. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125053>
- Barcellos D, Queiroz HM, Ferreira AM, Bernardino AF, Nóbrega GN, Otero XL, Ferreira TO. Short-term Fe reduction and metal dynamics in estuarine soils impacted by Fe-rich mine tailings. **Applied Geochemistry.** 2022 136:105134, ISSN 0883-2927. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.105134>
- Beggs GA, Brennan RG, Arshad M. MarR family proteins are important regulators of clinically relevant antibiotic resistance. **Protein Sci.** 2020 Mar;29(3):647-653 <https://doi.org/10.1002/pro.3769>
- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Bürgmann H, Sørum H, Norström M, Pons MN, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S, Schwartz T, Kisand V, Baquero F, Martinez JL. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nat Rev Microbiol.** 2015 13(5):310-7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>.
- Berg J, Tom-Petersen A, Nybroe O. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. **Lett Appl Microbiol.** 2005;40(2):146-51. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01650.x>
- Bergamasco R, Fagundes-Klen MR, Nishi L. **Processos de biorremediação para tratamento de água e efluentes. Biotecnologia microbiana ambiental.** Eduem. – UEM, Maringá – PR., Brasil. 2018 331 p.
- Bernardino AF, Netto SA, Pagliosa PR, Barros F, Christofolletti RA, Rosa Filho JS, Colling A, Lana PC. Predicting ecological changes on benthic estuarine assemblages through decadal climate trends along Brazilian marine ecoregions. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 2015 166:74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.021>
- Bernardino AF, Pais FS, Oliveira LS, Gabriel FA, Ferreira TO, Queiroz HM, Mazzuco ACA. Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA. **PeerJ.** 2019 Nov 7;7:e8042 <https://dx.doi.org/10.7717/2Fpeerj.8042>.

- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**. 2012;7(4):e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Bowker L, Chambers D. The risk, public liability & economics of tailings storage facility failures. **Research Paper. Stonington, ME**. 2015 Disponível em: < <https://www.resolutionmineeis.us/documents/bowker-chambers-2015>> Acesso em 03 jan 2021.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol Environ Saf**. 2000 45(3): 198-207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>.
- Bunk B, Schulz A, Stammen S, Münch R, Warren MJ, Rohde M, Jahn D, Biedendieck R. A short story about a big magic bug. **Bioeng Bugs**. 2010 1:85–91. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.2.11101>
- Cabral L, Júnior GVL, Pereira de Sousa ST, Dias ACF, Lira Cadete L, Andreote FD, Hess M, de Oliveira VM. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. **Environ Pollut**. 2016 Sep;216:460-469 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.078>
- Cabral L, Pereira de Sousa ST, Júnior GVL, Hawley E, Andreote FD, Hess M, de Oliveira VM. Microbial functional responses to long-term anthropogenic impact in mangrove soils. **Ecotoxicol Environ Saf**. 2018 Sep 30;160:231-239. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.050>
- Cai XC, Liu CH, Wang BT, Xue YR. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. **Microbiol Res**. 2017 Mar;196:89-94. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.007>
- Cao M, Bernat BA, Wang Z, Armstrong RN, Helmann JD. FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**. 2001 Apr;183(7):2380-3. <https://doi.org/10.1128/jb.183.7.2380-2383.2001>
- Cao M, Helmann JD. Regulation of the *Bacillus subtilis* bcrC bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. **J Bacteriol**. 2002 Nov;184(22):6123-9. <https://doi.org/10.1128/jb.184.22.6123-6129.2002>
- Castro-Silva MA, Lima AOS, Gerchenski AV, Jaques DB, Rodrigues AL, Souza PL, Rörig LR. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2003 34(1), 45-47. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000500015>.
- Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM. Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. **Vet Microbiol**. 2011 Jun 2;150(3-4):344-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.014>
- Cavaco LM, Hasman H, Stegger M, Andersen PS, Skov R, Fluit AC, Ito T, Aarestrup FM. Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. **Antimicrob Agents Chemother**. 2010 Sep;54(9):3605-8. <https://doi.org/10.1128/aac.00058-10>
- Cavalini L, Jankoski P, Correa APF, Brandelli A, Motta ASD. Characterization of the antimicrobial activity produced by *Bacillus* sp. isolated from wetland sediment. **An Acad Bras Cienc**. 2021 Nov 1;93(suppl 4):e20201820. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201820>
- CBDB –Comitê Brasileiro de Barragens. **A história das barragens no Brasil, Séculos XIX, XX e XXI: cinquenta anos do Comitê Brasileiro de Barragens**. Rio de Janeiro: CBDB, 2011.
- Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiol Rev**. 2001 May;25(3):335-47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x>

- Chakraborty U, Chakraborty BN, Chakraborty AP, Dey PL. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**. 2013 May;29(5):789-803. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1234-8>
- Chandrangsu P, Rensing C, Helmann JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria. **Nat Rev Microbiol**. 2017 Jun;15(6):338-350. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>
- Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **Int. Biodeterior. Biodegradation**. 2003 51, 271–276.
- Chaudhary A, Salgaonkar BB, Braganca JM. Cadmium tolerance by haloarchaeal strains isolated from solar salterns of Goa, India. **Int J Biosci, Biochem Bioinforma**. 2014 4(1):1–6. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2014.V4.299>.
- Chen J, Li J, Zhang H, Shi W, Liu Y. Bacterial heavy-metal and antibiotic resistance genes in a copper tailing dam area in northern China. **Front Microbiol**. 2019 20;10:1916. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01916>.
- Chen L, Shi H, Heng J, Wang D, Bian K. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. **Microbiol Res**. 2019 Jan;218:41-48 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.002>
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**. 2018 34:i884–i890 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
- Chen WM, Chen YL, Sheu SY. *Mucilaginibacter roseus* sp. nov., isolated from a freshwater river. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2016 Mar;66(3):1112-1118. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000838>
- Chen Y, Jiang Y, Huang H, Mou L, Ru J, Zhao J, Xiao S. Long-term and high-concentration heavy-metal contamination strongly influences the microbiome and functional genes in Yellow River sediments. **Sci Total Environ**. 2018 1,637-638:1400-1412 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.109>.
- Cheng J, Hicks DB, Krulwich TA. The purified *Bacillus subtilis* tetracycline efflux protein TetA(L) reconstitutes both tetracycline-cobalt/H⁺ and Na⁺(K⁺)/H⁺ exchange. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996 Dec 10;93(25):14446-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14446>
- Colombo ML, Hanique S, Baurin SL, Bauvois C, De Vriendt K, Van Beeumen JJ, Frère JM, Joris B. The ybxI gene of *Bacillus subtilis* 168 encodes a class D beta-lactamase of low activity. **Antimicrob Agents Chemother**. 2004 Feb;48(2):484-90. <https://doi.org/10.1128/aac.48.2.484-490.2004>
- Costa AT. **Geoquímica das águas e dos sedimentos da bacia do Rio Gualaxo do Norte, Leste-Sudeste do quadrilátero ferrífero (MG): Estudo de uma área afetada por atividades de extração mineral**. Dissertação (Mestrado em Evolução Crustal e Recursos Naturais) - Universidade Federal de Ouro Preto. 2001 146 p. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/3242>> Acesso em 29 dez 2020
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**. 2011 Aug 31;477(7365):457-61 <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Das S, Elavarasi A, Lyla PS, Khan SA. Biosorption of Heavy Metals by Marine Bacteria: Potential Tool for Detecting Marine Pollution. **Environmental Health**. 2009 9(1/2), 38–43. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.112288952606068>
- Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2013 Jan;97(2):561–571. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0>.
- Dash HR, Das S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes **Int. Biodeterior. Biodegrad**. 2012 Nov;75:207-213 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>

- da Fonseca FS, Angolini CF, Arruda MA, Junior CA, Santos CA, Saraiva AM, Pilau E, Souza AP, Laborda PR, de Oliveira PF, de Oliveira VM, Reis FA, Marsaioli AJ. Identification of oxidoreductases from the petroleum *Bacillus safensis* strain. **Biotechnol Rep (Amst)**. 2015 Sep 5;8:152-159. doi: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.btre.2015.09.001>
- de Alencar FLS, Navoni JA, do Amaral VS. The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2017 Jul;24(20):16545-16559. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9129-8>
- de Alencar SA, Costa FS, Rodrigues GR, Barreto CC. Draft Genome Sequence of a Novel *Mucilaginibacter* Member Isolated from Brazilian Amazon Soil. **Genome Announc**. 2016 Oct 6;4(5):e01033-16 <https://doi.org/10.1128/genomeA.01033-16>
- De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. **Bioinformatics**. 2018 Aug 1;34(15):2666-2669.. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbty149>.
- Defalco T, Vasconcelos ALS, Dias ACF, Barrientos L, Bernardino ÂF, Andreote FD, Núñez-Montero K. Complete Genome Sequence of *Bacillus safensis* Strain 3A, a Heavy Metal-Resistant Bacterium Isolated from Contaminated Estuarine Sediment in Brazil. **Microbiol Resour Announc**. 2021 Apr 22;10(16):e00268-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00268-21>
- Devi S, Kiesewalter HT, Kovács R, Frisvad JC, Weber T, Larsen TO, Kovács ÁT, Ding L. Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. **Synth Syst Biotechnol**. 2019 Aug 27;4(3):142-149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Diaz-Ravina M, Baath E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. **Appl Environ Microbiol**. 1996 Aug;62(8):2970-7. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2970-2977.1996>.
- DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral. Política Nacional de Segurança das Barragens: II Encontro sobre segurança de Barragens: Região Sudeste**. 2018. Vitória-ES. Disponível em: <http://progestao.ana.gov.br/portal/progestao/destaque-superior/eventos/oficinas-de-intercambio-1/seguranca-de-barragens/encontro-seguranca-de-barragens-vitoria-junho-de-2018/apres_anm.pdf> Acesso: 20 mar 2021
- Doelman P, Haanstra L. Short-term and long-term effects of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors. **Plant Soil**. 1984 79(3):317-327.
- Doelman P, Jansen E, Michels M, Van Til M. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. **Biol. Fertil. Soil**. 1994(17):177-184. <https://doi.org/10.1007/BF00336319>.
- Domingos DF, de Faria AF, de Souza Galaverna R, Eberlin MN, Greenfield P, Zucchi TD, Melo IS, Tran-Dinh N, Midgley D, de Oliveira VM. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2015 Apr;99(7):3155-67. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6377-8>
- Koçberber N, Dönmez G. Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters. **Bioresour Technol**. 2007 Aug;98(11):2178-83 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.017>.
- Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ, Pirrone N. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. **Environ Sci Technol**. 2013 May 21;47(10):4967-83. <https://doi.org/10.1021/es305071v>
- Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2002 Jul 59(2-3):143-52. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1024-6>
- Duarte EB, Neves MA, De Oliveira FB, Martins ME, De Oliveira CHR, Burak DL, Orlando MTD, Range CVGT. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere**. 2021 262:127879. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>.

- Dunbar WS. Biotechnology and the mine of tomorrow. **Trends in Biotechnology**. 2017 Jan;35(1):79-89 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.07.004>.
- Durán AP, Rauch J, Gaston KJ. Global spatial coincidence between protected areas and metal mining activities. **Biological Conservation**. 2013 160:272-278. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.02.003>.
- Duxbury T, Bicknell B. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soil. **Soil Biol. Biochem.** 1983 15:243-250. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(83\)90066-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(83)90066-4).
- Earl AM, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiol.** 2008 Jun;16(6):269-75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Eppinger M, Bunk B, Johns MA, Edirisinghe JN, Kutumbaka KK, Koenig SS, Creasy HH, Rosovitz MJ, Riley DR, Daugherty S, Martin M, Elbourne LD, Paulsen I, Biedendieck R, Braun C, Grayburn S, Dhingra S, Lukyanchuk V, Ball B, Ul-Qamar R, Seibel J, Bremer E, Jahn D, Ravel J, Vary PS. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. **J Bacteriol.** 2011 Aug;193(16):4199-213. <https://doi.org/10.1128/jb.00449-11>
- Esakkiraj P, Usha R, Palavesam A, and Immanuel G. Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU. **Food Bioprod Process.** 2012 90:370–376. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.008>
- Falagán C, Yusta I, Sánchez-españa J, Johnson DB. Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. **Minerals Engineering**. 2017 106:79–85 <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.09.028>.
- Fan X, Tang J, Nie L, Huang J, Wang G. High-quality-draft genome sequence of the heavy metal resistant and exopolysaccharides producing bacterium *Mucilaginibacter pedocola* TBZ30^T. **Stand Genomic Sci.** 2018 Nov 28;13:34. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0337-8>
- Fashola MO, Ngole-Jeme VM, Babalola OO. Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. **Int J Environ Res Public Health**. 2016 Oct 26;13(11):1047. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
- Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JM. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. **Int J Antimicrob Agents**. 2003 Sep;22(3):211-6. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00209-7)
- Fields S. Tarnishing the earth: gold mining's dirty secret. **Environ Health Perspect**. 2001 Oct;109(10):A474-81. <https://doi.org/10.1289/ehp.109-a474>
- Fischer S, Krause T, Jordan N, Lederer F, Jain R. Draft Genome Sequence of *Bacillus safensis* Strain JG-B5T, Isolated from a Uranium Mining Waste Pile. **Microbiol Resour Announc**. 2018 Sep 13;7(10):e00961-18. <https://doi.org/10.1128/mra.00961-18>
- Fosso-Kankeu E, Mulaba-Bafubiandi AF. Implication of plants and microbial metalloproteins in the bioremediation of polluted waters: a review. **Physics and chemistry of the earth**. 2014 (67):242-252. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2013.09.018>.
- Foster TJ. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. **Microbiol Rev**. 1983 Sep;47(3):361-409. <https://doi.org/10.1128/mr.47.3.361-409.1983>
- Foster TJ. The genetics and biochemistry of mercury resistance. **Crit Rev Microbiol**. 1987;15(2):117-40. <https://doi.org/10.3109/10408418709104455>
- From C, Hormazabal V, Granum PE. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. **Int J Food Microbiol**. 2007 Apr 20;115(3):319-24 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005>
- Fujisaki S, Ohnuma S, Horiuchi T, Takahashi I, Tsukui S, Nishimura Y, Nishino T, Kitabatake M, Inokuchi H. Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. **Gene**. 1996 Oct 10;175(1-2):83-7. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00128-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00128-x)

- Gaballa A., Wang T., Ye R.W., Helmann J.D. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J. Bacteriol.* 2002;184:6508–6514. <https://dx.doi.org/10.1128%2FJJB.184.23.6508-6514.2002>
- Gabriel FA, Silva AG, Queiroz HM, Ferreira TO, Hauser-Davis RA, Bernardino AF. Ecological Risks of Metal and Metalloid Contamination in the Rio Doce Estuary. *Integr Environ Assess Manag.* 2020 Sep;16(5):655-660. <https://doi.org/10.1002/ieam.4250>.
- Gabriel FA, Ferreira AD, Queiroz HM, Vasconcelos AL, Ferreira TO, Bernardino AF. Long-term contamination of the Rio Doce estuary as a result of Brazil's largest environmental disaster. *Perspec Eco Conserv.* 2021 Out;19(4):417-428. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.09.001>
- Gadd GM, Griffiths AJ. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb Ecol.* 1977 Dec;4(4):303-17 <https://doi.org/10.1007/bf02013274>.
- Gadd GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology (Reading).* 2010 Mar;156(Pt 3):609-643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Garbisu C, Garaiurrebaso O, Epelde L, Grohmann E, Alkorta I. Plasmid-Mediated Bioaugmentation for the Bioremediation of Contaminated Soils. *Front Microbiol.* 2017 Oct 9;8:1966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01966>.
- Garousin H, Pourbabae AA, Alikhani HA, Yazdanfar N. A Combinational Strategy Mitigated Old-Aged Petroleum Contaminants: Ineffectiveness of Biostimulation as a Bioremediation Technique. *Front Microbiol.* 2021 Feb 25;12:642215. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642215>
- Gati G, Pop C, Brudaşcă F, Gurzău AE, Spînu M. The ecological risk of heavy metals in sediment from the Danube Delta. *Ecotoxicology.* 2016 May;25(4):688-96. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1627-9>.
- Gikas P. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review. *J Hazard Mater.* 2008 Nov 30;159(2-3):187-203. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.02.048>
- Giles AF, Reynolds RE. *Bacillus megaterium* resistance to cloxacillin accompanied by a compensatory change in penicillin binding proteins. *Nature.* 1979 Jul 12;280(5718):167-8. <https://doi.org/10.1038/280167a0>
- Ginn T, Sengor SS, Barua S, Moberly J, Peyton B. **Metal toxicity effects on microbial growth and degradation, in: Slovenia and U.S.** Workshop on Environmental Science and Engineering, Ljubljana, Slovenia, 2006 pp. 39–40.
- Gomes LC, Chippari-Gomes AR, Miranda TO, Pereira TM, Merçon J, Davel VC, Barbosa BV, Pereira ACH, Frossard A, Ramos JPL. Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. *Braz J Biol.* 2019 Oct-Dec;79(4):659-664. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188086>
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Jan;57(Pt 1):81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Goswami M, Deka S. Isolation of a novel rhizobacteria having multiple plant growth promoting traits and antifungal activity against certain phytopathogens. *Microbiol Res.* 2020 Nov;240:126516. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126516>
- Grass G, Otto M, Fricke B, Haney CJ, Rensing C, Nies DH, Munkelt D. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol.* 2005 Jan;183(1):9-18. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0739-4>
- Guedon E, Helmann JD. Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators. *Mol Microbiol.* 2003 Apr;48(2):495-506. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03445.x>
- Guedon E, Moore CM, Que Q, Wang T, Ye RW, Helmann JD. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and sigmaB regulons. *Mol Microbiol.* 2003 Sep;49(6):1477-91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03648.x>

- Guha C, Mookerjee A. RNA synthesis and degradation during preferential inhibition of protein synthesis by cobalt chloride in *Escherichia coli* K-12. **Mol Biol Rep.** 1981 Aug 14;7(4):217-20. <https://doi.org/10.1007/bf00805755>
- Guimarães VF, Klein J, Silva ASL, Klein DK. Inoculant efficiency containing *Bacillus megaterium* (B119) and *Bacillus subtilis* (B2084) for maize culture, associated with phosphate fertilization. **Research, Society and Development.** 2021 10(12):e431101220920. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20920>
- Guo W, Chen Z, Cui P, Chen X. Draft genome of *Bacillus* sp. A053 isolated from the Arctic seawater with antimicrobial activity. **Mar Genomics.** 2015 Aug;22:19-21. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.03.008>
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics.** 2013 Apr 15;29(8):1072-5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- Guskov A, Eshaghi S. The mechanisms of Mg²⁺ and Co²⁺ transport by the CorA family of divalent cation transporters. **Curr Top Membr.** 2012;69:393-414. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394390-3.00014-8>
- Guzzo A, DuBow MS. Identification and characterization of genetically programmed responses to toxic metal exposure in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Rev.** 1994 Aug;14(4):369-74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00110.x>.
- Haavik HI. On the role of bacitracin peptides in trace metal transport by *Bacillus licheniformis*. **J Gen Microbiol.** 1976 Oct;96(2):393-9. doi: 10.1099/00221287-96-2-393
- Hadjiliadis N. **Cytotoxic, mutagenic and carcinogenic potential of heavy metals related to human environment.** Springer Science and Business Media, NATO ASI Series book series. 1997 (ASEN2, vol 26).
- Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D, Rahman M, Zafar Y, Malik KA. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. **Agron. Sustain. Dev.** 2006 26:143–150. <https://doi.org/10.1051/agro:2006007>
- Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment. **J Basic Microbiol.** 2007 Dec;47(6):453-67. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700275>
- Halder U, Banerjee A, Chaudhry V, Varshney RK, Mantri S, Bandopadhyay R. Draft genome report of *Bacillus altitudinis* SORB11, isolated from the Indian Sector of the Southern Ocean. **Genome Announc.** 2017 Jun 8;5(23):e00339-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00339-17>
- Hanano A, Shaban M, Almously I. Biochemical, Molecular, and Transcriptional Highlights of the Biosynthesis of an Effective Biosurfactant Produced by *Bacillus safensis* PHA3, a Petroleum-Dwelling Bacteria. **Front Microbiol.** 2017 Jan 25;8:77 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00077>
- Hansda A, Kumar V, Anshumali. A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. **World J Microbiol Biotechnol.** 2016 Oct;32(10):170. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2117-1>.
- Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. Resistance of environmental bacterial to heavy metals. **Bioresour. Technol.** 1998 64:7-15. [https://doi.org/10.1016/S09608524\(97\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S09608524(97)00161-2)
- Hatje V, Pedreira RMA, de Rezende CE, Schettini CAF, de Souza GC, Marin DC, Hackspacher PC. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Sci Rep.** 2017 Sep 6;7(1):10706. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>.
- Hill JE, Baiano JC, Barnes AC. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. **J Fish Dis.** 2009 Dec;32(12):1007-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01084.x>
- Hiroki M. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. **Soil Sci. Plant Nutr.** 1992 38(1):141-7 <https://doi.org/10.1080/00380768.1992.10416961>.
- Hu X, Boyer GL. Siderophore-Mediated Aluminum Uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. **Appl Environ Microbiol.** 1996 Nov;62(11):4044-8. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4044-4048.1996>

- Huang H, Zhao Y, Xu Z, Ding Y, Zhou X, Dong M. A high Mn(II)-tolerance strain, *Bacillus thuringiensis* HM7, isolated from manganese ore and its biosorption characteristics. **PeerJ**. 2020 Feb 19;8:e8589. <https://doi.org/10.7717/peerj.8589>
- Huang HM, Zhao YL, Xu ZG, Ding Y, Zhang W, Wu L. Biosorption characteristics of a highly Mn(II)-resistant *Ralstonia pickettii* strain isolates from Mn ore. **Plos One**. 2018 31;13(8):e0203285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203285>
- Huang Z, Tang Y, Zhang K, Chen Y, Wang Y, Kong L, You T, Gu Z. Environmental risk assessment of manganese and its associated heavy metals in a stream impacted by manganese mining in South China. **Hum Ecol Risk Assess. An Int. J.** 2016 22:1341-1358. <https://doi.org/10.1080/10807039.2016.1169915>
- Hussain QA. Bacteria: the natural indicator of environmental pollution. In Freshwater Microbiology. **Academic Press**. 2019 393–420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00010-4>
- Hynninen A, Touzé T, Pitkänen L, Mengin-Lecreulx D, Virta M. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. **Mol Microbiol**. 2009 Oct;74(2):384-94 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x>
- IBAMA, 2015a. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente. Diretoria de Proteção Ambiental e DIPRO e Coordenação Geral de Emergências Ambientais e CGEMA. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, Novembro de 2015, p. 38. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_Ibama.pdf. Acesso: 03 jan 2021.
- IBAMA, 2015b. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente. **Onda de rejeitos da Samarco atingiu 663 km de rios e devastou 1.469 hectares de terras**. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/noticias/66-2015/205-onda-de-rejeitos-da-samarco-atingiu-663-km-de-rios-e-devastou-1-469-hectares-de-terras>> Acesso: 03 jan 2021.
- Imchen M, Vennapu RK, Ghosh P, Kumavath R. Insights into Antagonistic Interactions of Multidrug Resistant Bacteria in Mangrove Sediments from the South Indian State of Kerala. **Microorganisms**. 2019 Dec 11;7(12):678. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120678>
- Ishag AE, Abdelbagi AO, Hammad AM, Elsheikh EA, Elsaid OE, Hur JH, Laing MD. Biodegradation of Chlorpyrifos, Malathion, and Dimethoate by three strains of bacteria isolated from pesticide-polluted soils in Sudan. **J Agric Food Chem**. 2016 Nov 16;64(45):8491-8498. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03334>
- Jacoby GA, Bush K. The Curious Case of TEM-116. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016 Oct 21;60(11):7000 <https://doi.org/10.1128/aac.01777-16>
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. **Environ Microbiol**. 2003 Aug;5(8):631-40. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x.
- Ji G, Silver S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **J Ind Microbiol**. 1995 Feb;14(2):61-75. <https://doi.org/10.1007/bf01569887>.
- Jiang F, Dai J, Wang Y, Xue X, Xu M, Guo Y, Li W, Fang C, Peng F. *Mucilaginibacter soli* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2012 Jul;62(Pt 7):1630-1635. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033902-0>
- Jing YT, Wang P, Zhang H, Dong WL, Jing YJ, Xiao YL, Cao H. *Mucilaginibacter yixingensis* sp. nov., isolated from vegetable soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2016 Abr;66(4):1779-1784. <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.000941>
- Jonas RB. Acute copper and cupric ion toxicity in an estuarine microbial community. **Appl Environ Microbiol**. 1989 Jan;55(1):43-9. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.43-49.1989>.

- Kalaimurugan D, Balamuralikrishnan B, Durairaj K, Vasudheva P, Shivakumar MS, Kaul T, Chang SW, Ravindran B, Venkatesan S. Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation. **Int. J. Environ. Sci. Technol.** 2020 17:1455–1462. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02563-5>
- Kamala-Kannan S, Lee KJ. Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Suncheon Bay, South Korea. **Biotechnology**. 2008 7(1):149-152. <https://dx.doi.org/10.3923/biotech.2008.149.152>
- Karpov DS, Domashin AI, Kotlov MI, Osipova PG, Kiseleva SV, Seregina TA, Goncharenko AV, Mironov AS, Karpov VL, Poddubko SV. [Biotechnological Potential of the *Bacillus subtilis* 20 Strain]. **Mol Biol (Mosk)**. 2020 Jan-Feb;54(1):137-145. <https://doi.org/10.1134/S0026893320010082>
- Kavamura VN, Esposito E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. **Biotechnol Adv**. 2010 28(1):61-9. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.09.002>.
- Kempf MJ, Chen F, Kern R, Venkateswaran K. Recurrent isolation of hydrogen peroxide-resistant spores of *Bacillus pumilus* from a spacecraft assembly facility. **Astrobiology**. 2005 Jun;5(3):391-405. <https://doi.org/10.1089/ast.2005.5.391>
- Khalid A, Ye M, Wei C, Dai B, Yang R, Huang S, Wang Z. Production of β -glucanase and protease from *Bacillus velezensis* strain isolated from the manure of piglets. **Prep Biochem Biotechnol**. 2021;51(5):497-510. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1833344>
- Khanna GP, Goyal D, Khanna S. Pyrene biodegradation by *Bacillus* spp isolated from coal tar-contaminated soil. **Bioremediat J**. 2012;15(1):12–25. <https://doi.org/10.1080/10889868.2010.547998>
- Kimouli M, Vrioni G, Papadopoulou M, Koumaki V, Petropoulou D, Gounaris A, Friedrich AW, Tsakris A. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. **J Med Microbiol**. 2012 Apr;61(Pt 4):596-599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033175-0>
- Kikukawa T, Nara T, Araiso T, Miyauchi S, Kamo N. Two-component bacterial multidrug transporter, EbrAB: Mutations making each component solely functional. **Biochim Biophys Acta**. 2006 May;1758(5):673-9 <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.004>
- Korneli C, David F, Biedendieck R, Jahn D, Wittmann C. Getting the big beast to work--systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. **J Biotechnol**. 2013 Jan 20;163(2):87-96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.018>
- Kovács ÁT. *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiol**. 2019 Aug;27(8):724-725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kumar A, Bisht BS, Joshi VD, Dhewa T. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. **Int J Env Sci**. 2011 1(6):1079-1093. <https://goo.gl/P6Xe9c>
- Kumar A, Mukhia, S, Kumar R. Production, characterisation, and application of exopolysaccharide extracted from a glacier bacterium *Mucilaginibacter* sp. ERMR7:07. **Process Biochemistry**. 2021 113:27-36. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.018>
- Kumar SN, Nambisan B, Sundaresan A, Mohandas C, Anto RJ. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. **Ann. Microbiol**. 2014 64:209-218. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0653-6>
- Lancellotti DA, Stotz WB. Effects of shoreline discharge of iron mine tailings on a marine soft-bottom community in northern Chile. **Mar Pollut Bull**. 2004 Feb;48(3-4):303-12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.08.005>.
- Li LG, Xia Y, Zhang T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. **ISME J**. 2017 Mar;11(3):651–662. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.155>
- Li Y, Li X, Jia D, Liu J, Wang J, Liu A, Liu Z, Guan G, Liu G, Luo J, Yin H. Complete genome sequence and antimicrobial activity of *Bacillus velezensis* JT3-1, a microbial germicide isolated from yak feces. **3 Biotech**. 2020 May;10(5):231 <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02235-z>

Li YP, Carraro N, Yang N, Liu B, Xia X, Feng R, Saquib Q, Al-Wathnani HA, van der Meer JR, Rensing C. Genomic Islands Confer Heavy Metal Resistance in *Mucilaginibacter kameinonensis* and *Mucilaginibacter rubeus* Isolated from a Gold/Copper Mine. **Genes (Basel)**. 2018 Nov 23;9(12):573.

<https://doi.org/10.3390/genes9120573>

Li YP, You LX, Yang XJ, Yu YS, Zhang HT, Yang B, Chorover J, Feng RW, Rensing C. Extrapolymeric substances (EPS) in *Mucilaginibacter rubeus* P2 displayed efficient metal(loid) bio-adsorption and production was induced by copper and zinc. **Chemosphere**. 2022 Mar;291(Pt 1):132712.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132712>

Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**. 2004;64(2):159-204

<https://doi.org/10.2165/00003495-200464020-00004>

Lide DR. **CRC Handbook of Chemistry and Physics 86th Edition** 2005–2006. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL 2005 3–480. <https://doi.org/10.1021/ja059868l>

Lima AT, Bastos FA, Teubner FJ, Neto RN, Cooper A, Barroso GF. Strengths and Weaknesses of a Hybrid Post-disaster Management Approach: the Doce River (Brazil) Mine-Tailing Dam Burst. **Environmental Management**. 2020 65:711–724. <https://doi.org/10.1007/s00267-020-01279-4>

Lin MF, Lin YY, Lan CY. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Microbiol**. 2017 Feb;55(2):130-136 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6408-5>

Lobova TI, Yemelyanova E, Andreeva IS, Puchkova LI, Repin VY. Antimicrobial Resistance and Plasmid Profile of Bacterial Strains Isolated from the Urbanized Eltsovka-1 River (Russia). **Microb Drug Resist**. 2015 Aug;21(4):477-9 <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0203>

Logan NA, Vos PD. *Bacillus*. In **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust; 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>

Lu XM, Lu PZ. Seasonal variations in antibiotic resistance genes in estuarine sediments and the driving mechanisms. **J Hazard Mater**. 2020 Feb 5;383:121164. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121164>.

Lu XM, Liu XP. Distribution of Metal Resistance Genes in Estuarine Sediments and Associated Key Impact Factors. **Microb Ecol**. 2021 Oct;82(3):581-590. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01699-7>

Machado AAS, Spencer K, Kloas W, Toffolon M, Zarfl C. Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. **Sci Total Environ**. 2016 Jan 15;541:268-281.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.045>.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee JS, Senthilkumar M, Lee KC, Sundaram S. *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2010 Oct;60(Pt 10):2451-2457

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.018713-0>

Mahiques MM, Hanebuth TJJ, Martins CC, Montoya-Montes I, Alcántara-Carrio J, Figueira RCL, Bicego MC. Mud depocentres on the continental shelf: a neglected sink for anthropogenic contaminants from the coastal zone. **Environmental Earth Sciences**. 2014 75:44–55. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4782-z>

Mani D, Kumar C. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: An overview with special reference to phytoremediation. **Int. J. Environ. Sci. Technol**. 2014 11:843–872.

<https://doi.org/10.1007/s13762-013-0299-8>.

Mao S, Lu Z, Zhang C, Lu F, Bie X. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1,3–1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9. **Appl Biochem Biotechnol**. 2013 Feb;169:960–75. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0064-3>

Marta-Almeida M, Mendes R, Amorim FN, Cirano M, Dias JM. Fundão Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. **Mar Pollut Bull**. 2016 Nov 15;112(1-2):359-364. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.039>.

- Martinez JL, Sánchez MB, Martínez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiol Rev.** 2009 Mar;33(2):430-49. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x>
- Martins VV, Zanetti MO, Pitondo-Silva A, Stehling EG. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. **Environ Sci Pollut Res Int.** 2014 May;21(9):5873-8. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2509-4>
- Masaoka Y, Ueno Y, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. A two-component multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 2000 Apr;182(8):2307-10. <https://doi.org/10.1128/jb.182.8.2307-2310.2000>
- Mason RP. **Trace metals in aquatic systems.** John Wiley and Sons. 2013 May;370-421. <https://doi.org/10.1002/9781118274576.ch8>
- Máthé I, Benedek T, Tancsics A, Palatinszky M, Lanyi S, Marialigeti K. Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). **Int. Biodeter. Biodegr.** 2012 73:41–49 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.018>
- Matyar F. Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. **Bull Environ Contam Toxicol.** 2012 Sep;89(3):551-6. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0726-4>
- Matyar F, Kaya A, Dinçer S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. **Sci Total Environ.** 2008 Dec 15;407(1):279-85 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.014>
- McArthur JV, Tuckfield RC. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. **Appl Environ Microbiol.** 2000 Sep;66(9):3722–6. <https://dx.doi.org/10.1128%2Faem.66.9.3722-3726.2000>.
- McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, Zalinger ZB, Gilg IC, Danner GR, Johnson KA, Beattie M, Ritchie R. 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. **J Antimicrob Chemother.** 2008 Jun;61(6):1221-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn123>
- Mechi A, Sanches DL. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados.** 2010 24(68), 209-220. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000100016>.
- Melo IS, Azevedo JL. **Microbiologia ambiental.** 2. Ed: Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 2008 647 p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/15285>> Acesso em 9 jan 2021.
- Mergeay M. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. **Trends Biotechnol.** 1991 Jan;9(1):17-24. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(91\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(91)90007-5).
- Meyers PR, Rawlings DE, Woods DR, Lindsey GG. Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. **J Bacteriol.** 1993 Oct;175(19):6105-12. <https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6105-6112.1993>
- Miller LG, Warner KL, Baesman SM, Oremland RS, McDonald IE, Radajewski S, Murrell JC. Degradation of methyl bromide and methyl chloride in soil microcosms: Use of stable C isotope fractionation and stable isotope probing to identify reactions and the responsible microorganisms. **Geochi Cosmoch Acta.** 2004 Aug 1;68(15):3271-83. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2003.11.028>
- Mindlin S, Kholodii G, Gorlenko Z, Minakhina S, Minakhin L, Kalyaeva E, Kopteva A, Petrova M, Yurieva O, Nikiforov V. Mercury resistance transposons of gram-negative environmental bacteria and their classification. **Res Microbiol.** 2001 Nov;152(9):811-22. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01265-7](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01265-7).
- Misra TK. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. **Plasmid.** 1992 Jan;27(1):4-16 [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(92\)90002-r](https://doi.org/10.1016/0147-619x(92)90002-r).

- Modikwe G, Manoharan L, Mabutho G, Lebani K, Lebogang L, Zhou N. Complete Genome Sequence of an Antimicrobial-Producing *Bacillus velezensis* Sam8H1 Isolate from the Makgadikgadi Saltpans of Botswana. **Microbiol Resour Announc**. 2021 Apr 29;10(17):e00175-21 <https://doi.org/10.1128/mra.00175-21>
- Møller, TSB, Overgaard, M., Nielsen, SS, Bortolaia V, Sommer MOA, Guardabassi L, Olsen J. Relation between *tetR* and *tetA* expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. **BMC Microbiol**. 2016 Mar 12;16:39. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0649-z>
- Moore CM, Gaballa A, Hui M, Ye RW, Helmann JD. Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. **Mol Microbiol**. 2005 Jul;57(1):27-40 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04642.x>
- Moore JW, Ramamoorthy S. **Impact of Heavy Metals in Natural Waters**. In: Heavy Metals in Natural Waters. Springer Series on Environmental Management. Springer, New York, NY. 1984. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5210-8_10
- Morais PV, Branco R, Francisco R. Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. **Biometals**. 2011 Jun;24(3):401-10. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-011-9446-1>
- Mori T, Mizuta S, Suenaga H, Miyazaki K. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. **Appl Environ Microbiol**. 2008 Nov;74(21):6803-5. <https://doi.org/10.1128/aem.00873-08>
- Morita M, Tomita K, Ishizawa M, Takagi K, Kawamura F, Takahashi H, Morino T. Cloning of oxetanocin A biosynthetic and resistance genes that reside on a plasmid of *Bacillus megaterium* strain NK84-0128. **Biosci Biotechnol Biochem**. 1999 Mar;63(3):563-6. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.563>
- Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**. 1998 Jul;42(7):1778-82. <https://doi.org/10.1128/aac.42.7.1778>
- Muñoz AJ, Ruiz E, Abriouel H, Gálvez A, Ezzouhri L, Lairini K, Espínola F. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: identification and evaluation of its potential for biosorption. **Chem. Eng. J**. 2012 210:325–332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.007>.
- Muras A, Romero M, Mayer C, Otero A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Crit Rev Biotechnol**. 2021 Jun;41(4):609-627 <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239>
- Musingarimi W, Tuffin M, Cowan D. Characterisation of the arsenic resistance genes in *Bacillus* sp. UWC isolated from maturing fly ash acid mine drainage Neutralised soils. **S. Afr. J. Sci**. 2010;106:59–63. <http://dx.doi.org/10.4102/sajs.v106i1/2.17>
- Naidoo Y, Valverde A, Cason ED, Pierneef RE, Cowan DA. A clinically important, plasmid-borne antibiotic resistance gene (β -lactamase TEM-116) present in desert soils. **Sci Total Environ**. 2020 Jun 1;719:137497. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137497>
- Nazli F, Jamil M, Hussain A, Hussain T. Exopolysaccharides and indole-3-acetic acid producing *Bacillus safensis* strain FN13 potential candidate for phytostabilization of heavy metals. **Environ Monit Assess**. 2020 Oct 30;192(11):738. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08715-2>
- Newcombe DA, Schuerger AC, Benardini JN, Dickinson D, Tanner R, Venkateswaran K. Survival of spacecraft-associated microorganisms under simulated martian UV irradiation. **Appl Environ Microbiol**. 2005 Dec;71(12):8147-56. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8147-8156.2005>
- Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 1999 Jun;51(6):730–50. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>.
- Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev**. 2003 Jun;27(2-3):313-39. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00048-2)
- Nies DH. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. **Plasmid**. 1992 Jan;27(1):17-28. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(92\)90003-s](https://doi.org/10.1016/0147-619x(92)90003-s)

- Nies DH, Silver S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **J. Ind. Microbiol.** 1995 Feb;14(2):186–99. <https://doi.org/10.1007/bf01569902>.
- Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Bacteriol.** 2007 Dec;189(24):9066-75. <https://doi.org/10.1128/jb.01045-07>
- Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** 2001 Oct;183(20):5803-12. <https://doi.org/10.1128/jb.183.20.5803-5812.2001>
- OHair JA, Li H, Thapa S, Scholz M, Zhou S. Draft Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* YNP4-TSU, Isolated from Yellowstone National Park. **Genome Announc.** 2017 Jul 13;5(28):e00631-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00631-17>
- Ohki R, Murata M. bmr3, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 1997 Feb;179(4):1423-7. <https://doi.org/10.1128/jb.179.4.1423-1427.1997>
- Ouoba LI, Diawara B, Jespersen L, Jakobsen M. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. **J Appl Microbiol.** 2007 Apr;102(4):963-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03156.x>
- Owen JR, Kemp D, Lèbre É, Svobodova K, Pérez Murillo G. Catastrophic tailings dam failures and disaster risk disclosure. **Int J Disast Risk Reduc.** 2020 42:101361. <https://doi.org/10.1016/j.ijdrr.2019.101361>.
- Pal C, Asiani K, Arya S, Rensing C, Stekel DJ, Larsson DGJ, Hobman JL. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. **Adv Microb Physiol.** 2017;70:261-313 <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>
- Pal KK, Dey R, Sherathia D, Vanpariya S, Patel I, Dalsania T, Savsani K, Sukhadiya B, Mandaliya M, Thomas M, Ghorai S, Rupapara R, Rawal P, Shah A, Bhayani S. Draft Genome Sequence of a Moderately Halophilic *Bacillus megaterium* Strain, MSP20.1, Isolated from a Saltern of the Little Rann of Kutch, India. **Genome Announc.** 2014 Jan 9;2(1):e01134-13. <https://doi.org/10.1128/genomea.01134-13>
- Palanques A, Puig P, Guillén J, Querol X, Alastuey A. Zinc contamination in the bottom and suspended sediments of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar spill south-western Spain. Control of hydrodynamic processes. **Sci. Total Environ.** 1999 242:211-220. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00391-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00391-5).
- Palazzini JM, Dunlap CA, Bowman MJ, Chulze SN. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiol Res.** 2016 Nov;192:30-36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>
- Pankratov TA, Tindall BJ, Liesack W, Dedysh SN. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan- and laminarin-degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic Sphagnum peat bog. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2007 Oct;57(Pt 10):2349-2354. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65100-0>
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Res.** 2015 25:1043–55. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Paruthiyil S, Pinochet-Barros A, Huang X, Helmann JD. *Bacillus subtilis* TerC Family Proteins Help Prevent Manganese Intoxication. **J Bacteriol.** 2020 Jan 2;202(2):e00624-19 <https://doi.org/10.1128/jb.00624-19>
- Parte AC. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2018 Jun;68(6):1825–1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
- Pawaskar GM, Raval K, Rohit P, Shenoy RP, Raval R. Cloning, expression, purification and characterization of chitin deacetylase extremozyme from halophilic *Bacillus aryabhatai* B8W22. **3 Biotech.** 2021 Dec;11(12):515. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03073-3>

- Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annu Rev Biochem.** 2015;84:577-601. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrol. Earth Syst. Sci Discuss.** 2007 4:439–473. <https://doi.org/10.5194/hessd-4-439-2007>.
- Pérez OC. 2006. **Atenuación natural de suelos contaminados con residuos tóxicos de origen minero. Aislamiento y caracterización microbiana.** Relatório interno de atividades da Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Habana, Cuba. 35 p. Disponível em: http://webs.ucm.es/info/biohidro/Coto_Orquidea.pdf > Acesso em 7 jan 2021.
- Perreten V, Schwarz FV, Teuber M, Levy SB. Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001 Apr;45(4):1109-14. <https://doi.org/10.1128/aac.45.4.1109-1114.2001>
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Köhler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Biol Chem.** 2004 Mar 5;279(10):8761-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.m312080200>
- Pimentel BE, Moreno-Sánchez R, Cervantes C. Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. **FEMS Microbiol Lett.** 2002 Jul 2;212(2):249–54. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1574-6968.2002.tb11274.x>
- Pinto AB, Pagnocca FC, Pinheiro MA, Fontes RF, Oliveira AJ. Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the Southern-central coast of São Paulo State, Brazil. **Mar Pollut Bull.** 2015 Jul 15;96(1-2):410–417. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.014>.
- Poole RK, Gadd GM. **Metals, Microbe Interactions.** IRL Press, Oxford. 1989 1–37p.
- Pranaw K, Pidlisnyuk V, Trögl J, Malinská H. Bioprospecting of a Novel Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus Alitudinis* KP-14 for Enhancing Miscanthus × giganteus Growth in Metals Contaminated Soil. **Biology (Basel).** 2020 Sep 22;9(9):305. <https://doi.org/10.3390/biology9090305>
- Priyalaxmi R, Murugan A, Raja P, Raj KD. Bioremediation of cadmium by *Bacillus safensis* (JX126862), a marine bacterium isolated from mangrove sediments. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.** 2014 3(12):326–335
- Quadra GR, Roland F, Barros N, Malm O, Lino AS, Azevedo GM, Thomaz JR, Andrade-Vieira LF, Praça-Fontes MM, Almeida RM, Mendonça RF, Cardoso SJ, Guida YS, Campos JMS. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere.** 2019 Jan;215:753-757. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.104>.
- Queiroz HM, Nóbrega GN, Ferreira TO, Almeida LS, Romero TB, Santaella ST, Bernardino AF, Otero XL. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? **Sci Total Environ.** 2018 Oct 1;637–638:498–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>.
- Queiroz HM, Ying SC, Abernathy M, Barcellos D, Gabriel FA, Otero XL, Nóbrega GN, Bernardino AF, Ferreira TO. Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. **Environ Int.** 2021a Jan;146:106284. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106284>
- Queiroz HM, Ying SC, Bernardino AF, Barcellos D, Nóbrega GN, Otero XL, Ferreira TO. Role of Fe dynamic in release of metals at Rio Doce estuary: Unfolding of a mining disaster. **Mar Pollut Bull.** 2021b May;166:112267. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112267>
- Qureshi KA, Seroor M, Al-Masabi A, Saykhan MA, Mutari YA, Elhassan GO, Khan RA. Bio-characterizations of some marine bacterial strains isolated from mangrove sediment samples of four major cities of Saudi Arabia. **J. Environ. Biol.** 2020 Sep;41(5):1003–1012. <https://doi.org/10.22438/jeb/41/5/mrn-1317>
- Ramón-García S, Martín C, De Rossi E, Aínsa JA. Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis* BCG. **J Antimicrob Chemother.** 2007 Mar;59(3):544-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl510>

- Ramos-Silva P, Brito PH, Serrano M, Henriques AO, Pereira-Leal JB. Rethinking the Niche of Upper-Atmosphere Bacteria: Draft Genome Sequences of *Bacillus aryabhatai* C765 and *Bacillus aerophilus* C772, Isolated from Rice Fields. **Genome Announc.** 2015 Apr 9;3(2):e00094-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00094-15>
- Ran X, Zhu Z, Long H, Tian Q, You L, Wu X, Liu Q, Huang S, Li S, Niu X, Wang J. Manganese Stress Adaptation Mechanisms of *Bacillus safensis* Strain ST7 From Mine Soil. **Front Microbiol.** 2021 Nov 25;12:758889. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758889>
- Rasmussen LD, Sørensen SJ. The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. **Curr Microbiol.** 1998 May;36(5):291-7. <https://doi.org/10.1007/s002849900312>
- Ray PD, Yosim A, Fry RC. Incorporating epigenetic data into the risk assessment process for the toxic metals arsenic, cadmium, chromium, lead, and mercury: strategies and challenges. **Front Genet.** 2014 Jul 16;5:201. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00201>.
- Rehman A, Anjum MS. Multiple metal tolerance and biosorption of cadmium by *Candida tropicalis* isolated from industrial effluents: glutathione as detoxifying agent. **Environ Monit Assess.** 2011 Mar;174(1-4):585-95. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1480-x>.
- Rehman M, Liu L, Wang Q, Saleem MH, Bashir S, Ullah S, Peng D. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. **Environ Sci Pollut Res Int.** 2019 Jun;26(18):18003-18016. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05073-6>
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics.** 2016 Mar 15;32(6):929-31. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>.
- Romero-Severson J, Moran TE, Shrader DG, Fields FR, Pandey-Joshi S, Thomas CL, Palmer EC, Shrout JD, Pfrender ME, Lee SW. A Seed-Endophytic *Bacillus safensis* Strain With Antimicrobial Activity Has Genes for Novel Bacteriocin-Like Antimicrobial Peptides. **Front Microbiol.** 2021 Sep 27;12:734216. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.734216>
- Raja CE, Omine K. Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. **Afr. J. Biotechnol.** 2012 11(9):2267–2275 <https://doi.org/10.5897/AJB11.3131>
- Rong S, Xu H, Li L, Chen R, Gao X, Xu Z. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. **Pestic Biochem Physiol.** 2020 Jan;162:69-77. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.003>
- Rouch DA, Lee BT, Morby AP. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. **J Ind Microbiol.** 1995 Feb;14(2):132-41. <https://doi.org/10.1007/bf01569895>.
- Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, Llamas I, Quesada E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2005 Jan;55(Pt 1):191-195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- Sá F, Longhini CM, Costa ES, da Silva CA, Cagnin RC, Gomes LEO, Lima AT, Bernardino AF, Neto RR. Time-sequence development of metal(loid)s following the 2015 dam failure in the Doce river estuary, Brazil. **Sci Total Environ.** 2021 May 15;769:144532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144532>.
- Salam LB. Unravelling the antibiotic and heavy metal resistome of a chronically polluted soil. **3 Biotech.** 2020 Jun;10(6):238. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02219-z>
- Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kämpfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T, Scoging AC. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. **Appl Environ Microbiol.** 1999 Oct;65(10):4637-45. <https://doi.org/10.1128/aem.65.10.4637-4645.1999>
- Santolin CV, Ciminelli V, Nascentes CC, Windmöller CC. Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. **Environ Earth Sci.** 2015 74:1235-1248. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4115-2>.

- Saranya P, Sukanya Kumari H, Prasad Rao B, Sekaran G. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. **Environ Sci Pollut Res Int.** 2014 Mar;21(5):3907-19. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2354-x>
- Satomi M, La Duc MT, Venkateswaran K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2006 Aug;56(Pt 8):1735-1740. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64189-0>
- Sawut R, Kasim N, Maihemuti B, Hu L, Abliz A, Abdujappar A, Kurban M. Pollution characteristics and health risk assessment of heavy metals in the vegetable bases of northwest China. **Sci Total Environ.** 2018 Nov 15;642:864-878. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.034>.
- Schulte M, Mattay D, Kriegel S, Hellwig P, Friedrich T. Inhibition of *Escherichia coli* respiratory complex I by Zn(2+). **Biochemistry.** 2014 Oct 14;53(40):6332-9. <https://doi.org/10.1021/bi5009276>
- Segura FR, Nunes EA, Paniz FP, Paulelli ACC, Rodrigues GB, Braga GÚL, Dos Reis Pedreira Filho W, Barbosa F Jr, Cerchiaro G, Silva FF, Batista BL. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environ Pollut.** 2016 Nov;218:813-825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>.
- Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Front Microbiol.** 2012 Dec 14;3:399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>.
- Seuylemezian A, Cooper K, Schubert W, Vaishampayan P. Draft Genome Sequences of 12 Dry-Heat-Resistant *Bacillus* Strains Isolated from the Cleanrooms Where the Viking Spacecraft Were Assembled. **Genome Announc.** 2018 Mar 22;6(12):e00094-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00094-18>
- Shi K, Cao M, Li C, Huang J, Zheng S, Wang G. Efflux proteins MacAB confer resistance to arsenite and penicillin/macrolide-type antibiotics in *Agrobacterium tumefaciens* 5A. **World J Microbiol Biotechnol.** 2019 Jul 22;35(8):115. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2689-7>
- Shivaji S, Chaturvedi P, Suresh K, Reddy GSN, Dutt CBS, Wainwright M, Narlikar JV, Bhargava PM. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2006 Jul;56(Pt 7):1465-1473. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0>
- Shivaji S, Chaturvedi P, Begum Z, Pindi PK, Manorama R, Padmanaban DA, Shouche YS, Pawar S, Vaishampayan P, Dutt CB, Datta GN, Manchanda RK, Rao UR, Bhargava PM, Narlikar JV. *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2009 Dec;59(Pt 12):2977-86. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002527-0>
- Shuaib M, Azam N, Bahadur S, Romman M, Yu Q, Xuexiu C. Variation and succession of microbial communities under the conditions of persistent heavy metal and their survival mechanism. **Microb Pathog.** 2021 Jan;150:104713. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104713>.
- Shylla L, Barik SK, Joshi SR. Characterization and bioremediation potential of native heavy-metal tolerant bacteria isolated from rat-hole coal mine environment. **Arch Microbiol.** 2021 Jul;203(5):2379-2392 <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02218-5>
- Silver S, Misra TK. Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. **Basic Life Sci.** 1984;28:23-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4715-6_3
- Silver S, Misra TK. Plasmid-mediated heavy metal resistances. **Annual Review of Microbiology.** 1988;42:717-743 <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.003441>.
- Silver S, Ji G. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. **Environ Health Perspect.** 1994 Sep;102 Suppl 3(Suppl 3):107-13. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s3107>.
- Silver S, Phung LT. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annu Rev Microbiol.** 1996 50:753-89. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.753>

- Silver S, Phung le T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 2005 Dec;32(11-12):587-605. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0019-6>
- Simón M, Martín F, Ortiz I, García I, Fernández J, Fernández E, Dorransoro C, Aguilar J. Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of a pyrite mine. **Sci Total Environ**. 2001 Nov 12;279(1-3):63-74. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00726-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00726-4)
- Sinegani SAA, Younessi N. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. **J Glob Abntimicrob Resist**. 2017 Sep;10:247-255. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.012>
- Smaldone GT, Helmann JD. CsoR regulates the copper efflux operon copZA in *Bacillus subtilis*. **Microbiology (Reading)**. 2007 Dec;153(Pt 12):4123-4128. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011742-0>
- Solovieva IM, Entian KD. Investigation of the yvgW *Bacillus subtilis* chromosomal gene involved in Cd(2+) ion resistance. **FEMS Microbiol Lett**. 2002 Feb 19;208(1):105-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11068.x>
- Starzecka A, Bednarz T. Comparison of development and metabolic activity of algae and bacteria in soil under the influence of short-and long-term contamination with metallurgic industrial dusts. **Archiv Hydrobiol Suppl**. 1993 98 Suppl 71-88 <https://doi.org/10.1128/MRA.01150-19>
- Staub JM, Brand L, Tran M, Kong Y, Rogers SG. Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 2012 Apr;39(4):641-7. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1057-x>
- Steffen W, Persson Å, Deutsch L, Zalasiewicz J, Williams M, Richardson K, Crumley C, Crutzen P, Folke C, Gordon L, Molina M, Ramanathan V, Rockström J, Scheffer M, Schellnhuber HJ, Svedin U. The Anthropocene: from global change to planetary stewardship. **Ambio**. 2011 40(7):739-761. <http://dx.doi.org/10.1007/s13280-011-0185-x>.
- Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Mol Microbiol**. 2005 May;56(4):845-57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiol Rev**. 2008 Jul;32(4):579-606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Strahsburger E, Zapata F, Pedroso I, Fuentes D, Tapia P, Ponce R, McClelland M, Valdes J. Draft Genome Sequence of *Bacillus safensis* RP10, Isolated from Soil in the Atacama Desert, Chile. **Microbiol Resour Announc**. 2019 Oct 31;8(44):e01150-19. <https://doi.org/10.1128/mra.01150-19>
- Stubbendieck RM, Straight PD. Linear mycins Activate a Two-Component Signaling System Involved in Bacterial Competition and Biofilm Morphology. **J Bacteriol**. 2017 Aug 22;199(18):e00186-17. <https://doi.org/10.1128/jb.00186-17>
- Summers AO. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. **Clin Infect Dis**. 2002 Jun 1;34 Suppl 3:S85-92. <https://doi.org/10.1086/340245>
- Sun Z, Xie X, Wang P, Hu Y, Cheng H. Heavy metal pollution caused by small-scale metal ore mining activities: A case study from a polymetallic mine in South China. **Sci Total Environ**. 2018 Oct 15;639:217-227. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.176>.
- Sunar K, Dey P, Chakraborty U, Chakraborty B. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. **J Basic Microbiol**. 2015 Jan;55(1):91-104. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300227>
- Syed S, Chinthala P. Heavy Metal Detoxification by Different *Bacillus* Species Isolated from Solar Salterns. **Scientifica (Cairo)**. 2015;2015:319760. <https://doi.org/10.1155/2015/319760>
- Tam NK, Uyen NQ, Hong HA, Duc le H, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **J Bacteriol**. 2006 Apr;188(7):2692-700. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2692-2700.2006>

- Tanabe H, Yamasak K, Furue M, Yamamoto K, Katoh A, Yamamoto M, Yoshioka S, Tagami H, Aiba HA, Utsumi R. Growth phase-dependent transcription of *emrKY*, a homolog of multidrug efflux *emrAB* genes of *Escherichia coli*, is induced by tetracycline. **J Gen Appl Microbiol**. 1997 Oct;43(5):257-263
<https://doi.org/10.2323/jgam.43.257>
- Tang W, Shan B, Zhang H, Zhang W, Zhao Y, Ding Y, Rong N, Zhu X. Heavy metal contamination in the surface sediments of representative limnetic ecosystems in eastern China. **Sci Rep**. 2014 Nov 21;4:7152. .
<https://doi.org/10.1038/srep07152>.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Res**. 2016 Aug 19;44(14):6614-24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. **Exp Suppl**. 2012;101:133-64. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- Thomas L, Ushasree MV, Pandey A. An alkali-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* functionally expressed in *Kluyveromyces lactis* and evaluation of its deinking efficiency. **Bioresour Technol**. 2014 Aug;165:309-13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.037>
- Thite VS, Nerurkar AS, Baxi NN. Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through Response Surface Methodology. **Sci Rep**. 2020 Mar 2;10(1):3824. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60760-6>
- Timoney JF, Port J, Giles J, Spanier J. Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. **Appl Environ Microbiol**. 1978 Sep;36(3):465-72. <https://doi.org/10.1128/aem.36.3.465-472.1978>.
- Tjahjono A, Wahyuni O, Purwantini S. The assessment of biological and pollution index of estuaries around Port of Tanjung Emas Semarang. **Environ Earth Sci**. 2018 Feb;116(1):12-87. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012087>
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- Trevors JT, Oddie KM, Belliveau BH. Metal resistance in bacteria. **Fems Microbiology Letters**. 1985 Abr;32(1)39-54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01181.x>.
- Urai M, Aizawa T, Nakagawa Y, Nakajima M, Sunairi M. *Mucilaginibacter kameinonensis* sp., nov., isolated from garden soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2008 Sep;58(Pt 9):2046-50. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65777-0>
- Valls M, de Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiol Rev**. 2002 Nov;26(4):327-38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00618.x>.
- Varejão EV, Bellato CR, Fontes MP. Mercury fractionation in stream sediments from the Quadrilátero Ferrífero gold mining region, Minas Gerais State, Brazil. **Environ Monit Assess**. 2009 Oct;157(1-4):125-35.
<https://doi.org/10.1007%2Fs10661-008-0522-0>
- Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D. *Bacillus megaterium*--from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2007 Oct;76(5):957-67.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1089-3>
- Vasconcelos ALS, Andreote FD, Defalco T, Delbaje E, Barrientos L, Dias ACF, Gabriel FA, Bernardino AF, Núñez-Montero K. *Mucilaginibacter* sp. Strain Metal(loid) and Antibiotic Resistance Isolated from Estuarine Soil Contaminated Mine Tailing from the Fundão Dam. **Genes**. 2022; 13(2):174.
<https://doi.org/10.3390/genes13020174>
- Vasconcelos ALS, Defalco T, Dias ACF, Barrientos L, Bernardino AF, Andreote FD, Núñez-Montero K. Complete Genome Sequence of a *Mucilaginibacter* sp. Strain Isolated from Estuarine Soil Contaminated with Mine Tailings from the Samarco Disaster at Fundão Dam. **Microbiol Resour Announc**. 2021 Oct 14;10(41):e0077921 <https://doi.org/10.1128/mra.00779-21>

Vial DS. **Principais Depósitos Minerais do Brasil, Metais Básicos Não Ferrosos, Ouro e Alumínio.**

Schobbenhaus C. Coelho CES (eds), DNPM/CVRD, 1988 3:413-419 p.

Vijay Kumar E, Srijana M, Kiran Kumar K, Hari Krishna N, Reddy G. A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. **Bioprocess Biosyst Eng.** 2011 May;34(4):403-9. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0483-x>

Vílchez JI, Tang Q, Kaushal R, Wang W, Lv S, He D, Chu Z, Zhang H, Liu R, Zhang H. Genome Sequence of *Bacillus megaterium* Strain YC4-R4, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Isolated from a High-Salinity Environment. **Genome Announc.** 2018 Jun 21;6(25):e00527-18. <https://doi.org/10.1128/genomea.00527-18>

Voica DM, Bartha L, Banciu HL, Oren A. Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. **FEMS Microbiol Lett.** 2016 Jul;363(14):fnw146. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw146>.

Xu ZG, Ding Y, Huang HM, Wu L, Zhao YL, Yang GY. Biosorption characteristics of Mn (II) by *Bacillus cereus* strain HM-5 isolated from soil contaminated by manganese ore. **Pol. J. Environ. Stud.** 2019;28(1):463-472. <https://doi.org/10.15244/pjoes/84838>

Wiedenbeck J, Cohan FM. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Sep;35(5):957-76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x>.

Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Comput Biol.** 2017a Jun 8;13(6):e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595.2>

Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. **Microb Genom.** 2017b Sep 14;3(10):e000132. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000132>.

Wireman J, Liebert CA, Smith T, Summers AO. Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. **Appl Environ Microbiol.** 1997 Nov;63(11):4494-503. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4494-4503.1997>.

Wang P, Sun Z, Hu Y, Cheng H. Leaching of heavy metals from abandoned mine tailings brought by precipitation and the associated environmental impact. **Sci Total Environ.** 2019 Dec 10;695:133893. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133893>.

Wang T, Wang X, Tian W, Yao L, Li Y, Chen Z, Han H. Screening of Heavy Metal-Immobilizing Bacteria and Its Effect on Reducing Cd²⁺ and Pb²⁺ Concentrations in Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.). **Int J Environ Res Public Health.** 2020 Apr 30;17(9):3122. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093122>

Wood JM, Wang HK. Microbial resistance to heavy metals. **Environ Sci Technol.** 1983 Dec 1;17(12):582A-90A. <https://doi.org/10.1021/es00118a717>.

Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nat Rev Microbiol.** 2007 Mar;5(3):175-86. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1614>

Wright MS, Loeffler Peltier G, Stepanauskas R, McArthur JV. 2006. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. **FEMS Microbiol Ecol.** 2006 Nov;58(2):293-302. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00154.x>.

Wu PS, Liu CH, Hu SY. Probiotic *Bacillus safensis* NPUST1 Administration Improves Growth Performance, Gut Microbiota, and Innate Immunity against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Microorganisms.** 2021 Dec 1;9(12):2494. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122494>

Yaish MW. Draft Genome Sequence of the Endophytic *Bacillus aryabhattai* Strain SQU-R12, Identified from Phoenix dactylifera L. Roots. **Genome Announc.** 2017 Aug 10;5(32):e00718-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00718-17>

- Yan P, Jiang LY, Chen JM, He ZM, Xiao SD, Jiang YF. [Isolation and identification of Mn oxidizing bacterium *Aminobacter* sp. H1 and its oxidation mechanism]. **Huan Jing Ke Xue**. 2014 Apr;35(4):1428-36. Chinese. <http://dx.doi.org/10.13227/j.hjkk.2014.04.032>
- Yan Y, Zhang L, Yu M, Wang J, Tang H, Yang Z, Wan P. The genome of *Bacillus aryabhatai* T61 reveals its adaptation to Tibetan Plateau environment. **Genes Genom**. 2016 38:293–301. <https://doi.org/10.1007/s13258-015-0366-2>
- Yang H, Rose NL. Distribution of mercury in six lake sediment cores across the UK. **Sci Total Environ**. 2003 Mar 20;304(1-3):391-404. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(02\)00584-3](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(02)00584-3).
- Yang HC, Fu HL, Lin YF, Rosen BP. Pathways of arsenic uptake and efflux. **Curr Top Membr**. 2012;69:325-58. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394390-3.00012-4>
- Young G, Chen Y, Yang M. Concentrations, distribution, and risk assessment of heavy metals in the iron tailings of Yeshan National Mine Park in Nanjing, China. **Chemosphere**. 2021 May;271:129546. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129546>.
- Yurieva O, Kholodii G, Minakhin L, Gorlenko Z, Kalyaeva E, Mindlin S, Nikiforov V. Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. **Mol Microbiol**. 1997 Apr;24(2):321-9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3261688.x>.
- Zafar S, Aqil F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresour Technol**. 2007 Sep;98(13):2557-61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.051>
- Zampieri BB, Pinto AB, Schultz L, de Oliveira MA, de Oliveira AJ. Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. **Microb Ecol**. 2016 Oct;72(3):582-94. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0821-x>.
- Zeil C, Widmann M, Fademrecht S, Vogel C, Pleiss J. Network Analysis of Sequence-Function Relationships and Exploration of Sequence Space of TEM β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016 Apr 22;60(5):2709-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02930-15>
- Zhang L, Wu GL, Wang Y, Dai J, Fang CX. *Bacillus deserti* sp. nov., a novel bacterium isolated from the desert of Xinjiang, China. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 2011 Feb;99(2):221-9. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9479-4>
- Zhao Y, Cocerva T, Cox S, Tardif S, Su JQ, Zhu YG, Brandt KK. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. **Sci Total Environ**. 2019 Mar 15;656:512-520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.372>
- Zheng R, Zhao Y, Wang L, Chang X, Zhang Y, Da X, Peng F. *Mucilaginibacter antarcticus* sp. nov., isolated from tundra soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2016 Dec;66(12):5140-5144 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001486>
- Zhou L, Xu P, Gong J, Huang S, Chen W, Fu B, Zhao Z, Huang X. Metagenomic profiles of the resistome in subtropical estuaries: Co-occurrence patterns, indicative genes, and driving factors. **Sci Total Environ**. 2022 Mar 1;810:152263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152263>
- Zhou Z, Dong Y, Xia X, Wu S, Huang Y, Liao S, Wang G. *Mucilaginibacter terrenus* sp. nov., isolated from manganese mine soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2019 Oct;69(10):3074-3079 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003592>
- Zhu YG, Zhao Y, Li B, Huang CL, Zhang SY, Yu S, Chen YS, Zhang T, Gillings MR, Su JQ. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. **Nat Microbiol**. 2017 Jan 30;2:16270. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.270>
- Ziganshina EE, Mohammed WS, Shagimardanova EI, Shigapova LH, Ziganshin AM. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain EZ-C07 isolated from digested agricultural wastes. **BMC Res Notes**. 2018 Aug 22;11(1):606. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3710-1>