



# ANAIS do 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia

Brasília-DF, 20-23 de Abril de 2022



O artigo a seguir é parte integrando dos Anais do 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia (CBE) disponível gratuitamente em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br).

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

LIMA, B. A.; ROSSET, J.; PINTO, F. G. S.; SCHERER, R. S.; BITENCOURT, J. A.. Avaliação da tolerância a metais em microrganismos isolados de solo de caverna ferrífera no Pará. In: MOMOLI, R. S.; STUMP, C. F.; VIEIRA, J. D. G.; ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 36, 2022. Brasília. *Anais...* Campinas: SBE, 2022. p.001-009. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais36cbe/36cbe\\_001-009.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais36cbe/36cbe_001-009.pdf)>. Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia.  
Consulte outras obras disponíveis em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br)

## AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAIS EM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SOLO DE CAVERNA FERRÍFERA NO PARÁ ASSESSMENT OF THE TOLERANCE TO METALS OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM IRON CAVE SOIL IN PARÁ

**Brenda Almeida LIMA (1); Jéssica ROSSET (2); Fabiana Gisele da Silva PINTO (1);  
Rafael dos Santos SCHERER (3); José Augusto Pires BITENCOURT (4)**

(1) Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI); Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária 1619, Bairro Universitário, CEP: 85819-110, Cascavel, Paraná.

(2) Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI); Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária 1619, Bairro Universitário, CEP: 85819-110, Cascavel, Paraná.

(3) Grupo Espeleológico de Marabá (GEM), Fl 30 Qd 01 Lt especial, Bairro Nova Marabá, CEP: 68500-000, Marabá, Pará.

(4) Instituto Tecnológico Vale (ITV). Rua Boa Ventura 955, Bairro Nazaré, Belém, Pará.

**Contatos:** [brenda.almeidalima@outlook.com](mailto:brenda.almeidalima@outlook.com); [jeeh\\_rosset@hotmail.com](mailto:jeeh_rosset@hotmail.com); [fabiana.pinto@unioeste.br](mailto:fabiana.pinto@unioeste.br); [schererrafael@gmail.com](mailto:schererrafael@gmail.com); [jose.augusto.bitencourt@itv.org](mailto:jose.augusto.bitencourt@itv.org).

### Resumo

Comunidades microbianas se adaptam especificamente às condições de baixo teor de nutrientes e alto teor de ferro em cavernas ferríferas, além disso, exploram diferentes vias metabólicas, incluindo a capacidade de biomineralização e intemperismo das rochas para sobreviver no ecossistema cavernícola. Alguns metais são essenciais para o metabolismo microbiano, tais como o cobre (Cu) e ferro (Fe). Esses metais, no entanto, quando em níveis elevados, podem se tornar tóxicos. Outros metais, como o chumbo (Pb) que não essenciais, são tóxicos mesmo em níveis de traço. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir ou recuperar a contaminação ambiental por metais tóxicos, como por exemplo a biorremediação microbiana. O objetivo desse estudo foi isolar, identificar e caracterizar bactérias tolerantes aos metais Fe, Cu e Pb presentes em amostras solo da caverna GEM- 1467. Foram obtidos 15 isolados bacterianos de acordo com suas características microscópicas e tintoriais, e foram submetidos ao método de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de Fe, Cu e Pb. De acordo com os resultados, observou-se a tolerância das bactérias isoladas a altas concentrações dos metais, sugerindo seu uso como ferramenta biotecnológica para a remediação de áreas contaminadas.

**Palavras Chave:** Cave GEM-1467; Solo; Microrganismos; Tolerância; Metais.

### Abstract

*Microbial communities specifically adapt to low-nutrient, high-iron conditions in iron caves, and they also exploit different metabolic pathways, including the ability of rocks to biomineralize and weathering to survive in the cave ecosystem. Some metals are essential for microbial metabolism, such as copper (Cu) and iron (Fe). These metals, however, when in high levels, can become toxic. Other metals such as lead (Pb) that are non-essential are toxic even at trace levels. New technologies have been developed with the aim of reducing or recovering environmental contamination by toxic metals, such as microbial bioremediation. The objective of this study was to isolate, identify and characterize bacteria tolerant to the metals Fe, Cu and Pb present in soil samples from the GEM-1467 cave. Fifteen bacterial isolates were obtained according to their microscopic and dyeing characteristics and were subjected to the microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of Fe, Cu and Pb. According to the results, the tolerance of isolated bacteria to high concentrations of metals was observed, suggesting its use as a biotechnological tool for the remediation of contaminated areas.*

**Keywords:** Cave GEM-1467; Soil; Microorganism; Tolerance; Metals.

## 1. INTRODUÇÃO

As cavernas são ecossistemas considerados oligotróficos, apresentando características específicas que determinam a microbiota local (GHOSH; KUISIENE; CHEEPHAM, 2017), sendo as comunidades microbianas as menos exploradas (BARTON; JURADO, 2007). Vários microrganismos já foram isolados de diferentes cavernas em todo o mundo, principalmente bactérias (Gram positivas e Gram negativas) (GULECAL-PEKTAS, 2016; YASIR, 2018), e fungos (BELYAGOUBI et al., 2018). Esses microrganismos podem apresentar diversas funções metabólicas (ZADA et al., 2021), como produção de antimicrobianos (RANGSEEKAEW; PATHOM-AREE, 2019), enzimas hidrolíticas (HAMED; KAFSHNOUCHI; RANJBARAN, 2019) e mecanismo de resistência à metais (PAWLOWSKI et al., 2018), sendo assim fontes promissoras para abordagens de isolamento e triagem em biotecnologia microbiana (HAMED; KAFSHNOUCHI; RANJBARAN, 2019).

O ambiente cavernícola abriga uma grande variedade de microrganismos que utilizam minerais que figuram de forma proeminente na formação de depósitos minerais secundários e microestruturas mineralizadas incomuns reconhecidas como bioassinaturas (RIQUELME et al., 2015). A redução microbiana de Fe (III) contribui para a formação potencial de cavernas em Formação Ferrífera Bandada (FFB), minério de ferro e canga (PARKER et al., 2018), evidenciando assim que as comunidades microbianas se adaptam especificamente as condições de baixo teor de nutrientes (MA et al., 2021) e de alto teor de ferro.

Em vista disso, os microrganismos cavernícolas exploram diferentes vias metabólicas, incluindo a capacidade de biomineralização e intemperismo das rochas, para sobreviver no ecossistema cavernícola (SANCHEZ-MORAL et al., 2012). Além disso, estimulam a competição entre as linhagens microbianas e fazem com que estes desenvolvam estratégias de sobrevivência, adaptando-se à presença de substâncias tóxicas, como os metais, alterando a sensibilidade dos componentes celulares essenciais e proporcionando um grau de proteção natural (BRUINS, et al., 2000).

Alguns metais são essenciais para o metabolismo microbiano, como o cobre (Cu) e ferro (Fe), mas em níveis elevados podem se tornar tóxicos. Diferentemente o chumbo (Pb), que não é essencial, mas tóxico mesmo em níveis de traço (BRAVO et al., 2018), sendo que sua presença em altas concentrações no meio ambiente, não apenas desencadeia pro-

cessos de co-seleção, mas também aumenta o nível de tolerância aos antibióticos, devido à co-regulação de genes de resistência (NATH et al., 2019).

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir ou recuperar a contaminação ambiental por metais tóxicos, como por exemplo, a biorremediação microbiana. Este processo inclui a degradação do poluente por reações bioquímicas (HALTTUNEN, et al., 2006), alterando o estado de oxidação do metal e permitindo a sua desintoxicação. Provavelmente, o metal ainda pode permanecer no local, independente das reações que ocorram, já que as bactérias possuem capacidade para concentrar ou remover metais, seja em forma de precipitados ou de substâncias voláteis, transformando os elementos químicos em compostos menos tóxicos e mais facilmente disponíveis (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Já nas leveduras, têm-se a inibição da atividade metabólica (VAN DER HEGGEN et al. 2010), impedindo a assimilação do íon amônio e inibindo a síntese proteica (CHEN; WANG, 2007).

O conhecimento acerca desses microrganismos e sobre seus mecanismos de resistência, despertam grande interesse na comunidade científica, devido à possibilidade de seu uso na descontaminação por resíduos orgânicos e inorgânicos, presentes no meio ambiente. Para esse fim, são utilizadas metodologias que buscam o isolamento e seleção dessas bactérias, a fim de descobrir novas espécies que possam apresentar potencial biotecnológico para biorremediação de ambientes contaminados. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos tolerantes aos metais Fe, Cu e Pb de solo de caverna ferrífera no Pará para possível utilização desses microrganismos na descontaminação ambiental.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Coleta das amostras

O local de estudo é uma caverna na Serra da Bocaina, localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no município de Canaã dos Carajás, Pará. Com base em dados secundários do Relatório de Diagnóstico e Análise de Relevância de 235 cavernas da Serra da Bocaina, Canaã dos Carajás (PA) (Pilé et al., 2014), selecionou-se a caverna GEM-1467 (SB-0051) considerando as características de relevância, litologia, morfologia, hidrologia, presença ou ausência de matéria orgânica e presença de solo, informações estas indicadas no mapa topográfico, ficha geo e bioespeleologia.

A coleta ocorreu sob a licença do Sistema de

Autorização e Informação em Biodiversidade (SIS-BIO) nº 79255-1. As amostras foram coletadas na estação seca, na camada superficial da caverna, nos primeiros 10 cm. A caverna foi classificada em zonas, de acordo com Trajano e Bichuette (2006), coletando-se de 100 a 500 g de solo de três pontos em cada zona, ou seja, na zona afótica (ausência de luz), na disfótica (penumbra) e na entrada, totalizando 9 pontos de amostragem. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (ziplock), com o auxílio da pá de jardinagem estéril, sendo limpa a cada coleta com álcool 70%, identificadas com o nome/número da caverna, número da amostra, data da coleta e nome do coletor responsável, e armazenadas em caixa térmica a 4°C para posterior análise.

## 2.2. Isolamento e Preservação de Microrganismos

No laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), as amostras de solo foram peneiradas, homogeneizadas e retiradas subamostras (10 g) e enriquecidas em frascos de vidro contendo 90 mL de meio salino mineral (MSM), com 0,81g de NaCl em 90 mL de água destilada. As amostras foram incubadas em agitador orbital (150 rpm) a 28°C, por 24 horas. Após esse período, foi realizada diluições seriadas, sendo retiradas alíquotas de 100 µL das diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-3</sup> e semeadas na superfície do meio Luria Bertani (LB), com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C no período de 24 a 72 horas. As linhagens microbianas isoladas foram conservadas em meio Ágar Estoque e a -80 °C.

## 2.3. Caracterização das Linhagens Microbianas

As linhagens microbianas foram caracterizadas fenotipicamente, baseadas em suas características morfológicas e tintoriais, usando o método de Gram.

## 2.4. Ensaio de tolerância a metais por Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de tolerância aos metais pesados foi realizado a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM foi realizada em placa de 96 poços para cultivo de células de acordo com Wiegand et al. (2008) com modificações. Os isolados foram inoculados em 90 µL de caldo Triptona de Soja (TSB), e posteriormente aplicado 100 µL da solução mãe contendo 2.000 mg/L dos seguintes sais metálicos: nitrato de ferro [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], nitrato de cobre [Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] e nitrato de chumbo [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], usando a técnica de diluição seriada, nas concentrações de 7,8 a 1000 mg/L. O inóculo de 10 µL da suspensão

bacteriana foi aplicado em cada poço, ajustado a partir da escala 0,5 de Mc Farland. O controle negativo foi realizado somente com TSB, TSB e solução de metal e apenas solução de metal. Para o controle positivo foi utilizado TSB e suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi aplicado nos poços 10 µL da solução reveladora incolor de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e incubado na estufa por mais 2 horas. A leitura do teste de CIM foi realizada através da mudança de coloração da solução reveladora, considerando o resultado positivo a presença de coloração rosa ou avermelhada e negativo a ausência de coloração (MOHR et al., 2017).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Isolamento e caracterização das linhagens microbianas

Foram isoladas 15 linhagens microbianas, sendo 11 bactérias e 4 leveduras. Das 11 linhagens bacterianas, 9 apresentaram a forma de bacilo e 2 de cocos, sendo 7 linhagens Gram-Positivas, 4 Gram-negativas. (Tabela 1). A zona de entrada apresentou o maior número de linhagens isoladas (6), seguida da zona de penumbra (5) e zona afótica (4). As leveduras que foram isoladas encontravam-se somente na zona de penumbra e afótica.

### 3.2. Avaliação de Tolerância a Metais

Todas as 15 linhagens isoladas demonstraram capacidades de crescimento e tolerância em diferentes concentrações de metais. O cobre (Cu) foi tóxico para GSF302 e GSA201 a 31,25 ppm, resultando na inibição dessas linhagens, mas para as outras 13 linhagens a CIM variou de 62,5 a 250 ppm (Tabela 2).

A tolerância máxima observada foi a chumbo (Pb) por GSF101, GSF202, GSF301, GSP101, GSA101 e GSA201, nas concentrações de 500 e 1000 ppm, destacando-se a maior resistência nos isolados da zona de penumbra.

Nas concentrações mais baixas para cada metal, todos os isolados foram resistentes o que sinaliza que os microrganismos cavernícolas crescem em concentrações superiores aos valores máximos de referência estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 430/2011.

Ressalta-se que os isolados não apresentaram CIM para o Fe, demonstrando assim, que foram tolerantes as concentrações superiores a 2000 ppm de Fe.

**Tabela 1:** Caracterização morfológica tintorial e fenotípica de 15 isolados de solo da caverna GEM-1467.

Isolados	Forma	Coloração de GRAM
GSF101	Bacilo	Positivo
GSF102	Bacilo	Positivo
GSF201	Bacilo	Negativo
GSF202	Bacilo	Positivo
GSF301	Bacilo	Positivo
GSF302	Bacilo	Positivo
GSP101	Bacilo	Positivo
GSP102	Leveduriforme	--
GSP201	Leveduriforme	--
GSP301	Cocos	Negativo
GSP302	Cocos	Negativo
GSA101	Bacilo	Positivo
GSA201	Bacilo	Negativo
GSA301	Leveduriforme	--
GSA302	Leveduriforme	--

**Tabela 2:** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos metais chumbo (Pb), cobre (Cu) e ferro (Fe) dos isolados de solo da caverna GEM-1467.

Isolados	Metais (ppm)		
	Pb	Cu	Fe
GSF101	1000	62,5	--
GSF102	--	125	--
GSF201	--	250	--
GSF202	1000	125	--
GSF301	500	62,5	--
GSF302	--	31,25	--
GSP101	1000	62,5	--
GSP102	--	250	--
GSP201	--	250	--
GSP301	--	125	--
GSP302	--	125	--
GSA101	1000	125	--
GSA201	1000	31,25	--
GSA301	--	250	--
GSA302	--	250	--

--: não determinada a CIM >2000 ppm

#### 4. DISCUSSÃO

O ensaio de tolerância a metais demonstrou que todas as 15 linhagens microbianas isoladas não apresentaram CIM para o nitrato de Fe, e este é um metal de origem natural, que se apresenta como material de processos geológicos ou afloramentos rochosos. A composição e concentração desse metal está relacionada a litologia (SOUZA et al., 2018) em FFB da caverna analisada.

As Bactérias Redutoras de Nitrato (BRN), são microrganismos anaeróbios facultativos (GARBOSSA, 2003), sendo assim a atividade das BRN é estimulada pela presença do nitrato, pois o metabolis-

mo é energeticamente mais favorável do que a redução do sulfato (MAXWELL et al., 2003).

Segundo Piló e Auler (2011), foram identificados, nas cavernas S11D-83 e N4WS-67 da Floresta Nacional de Carajás, espeleotemas de óxidos-hidróxidos, fosfatos e sulfatos de Al e/ou Fe, podendo assim inferir que a presença de elevadas concentrações desses metais, estimula o crescimento desses microrganismos e que podem competir mais intensamente por fonte de carbono e nutrientes. As BRN são capazes de oxidar sulfetos, resultando na remoção destes já formados do ambiente e, inibir o crescimento das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) (SOUSA;

CAMMAROTA; SÉRVULO, 2010). Cabe destacar a existência de espécies de BRS capazes de utilizar o nitrato como receptor final de elétrons, tendo como consequência a não formação do sulfeto biogênico (BODTKER et al., 2009).

O nitrato é a forma mais completamente oxidada de nitrogênio, é formado durante os estágios finais de decomposição biológica (GARBOSSA, 2003), porém em concentrações tóxicas deste metal, podem afetar diversas atividades microbianas, tais como: produtividade primária, metanogênese, fixação de nitrogênio, respiração, motilidade, ciclagem biogeoquímica de carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos, além da decomposição da matéria orgânica e síntese enzimática (GADD, 2009). A tolerância ao Fe pelos isolados pode ter se dado também, pelo processo de captação dos metais por bioacumulação e biossorção (MUSTAPHA; HALIMOON, 2015). Esses microrganismos de cavernas ferríferas utilizam minerais como ferro e manganês (DAVIS et al., 2020), demonstrando potencial de quimioautotrofia microbiana. Além disso a produção de nitrato e, portanto, potencialmente de ácido nítrico, por microrganismos oxidantes de amônia, pode contribuir para a oxidação do ferro exacerbando a corrosão e alterar a dinâmica do pH em áreas cobertas por incrustações microbianas (RANALLI et al. 2009; ZANARDINI et al., 2019).

Os metais podem exercer um importante efeito como agentes seletivos para bactérias exógenas e genes de resistência a antibióticos (HU et al., 2016; DICKINSON et al., 2019). Neste sentido, o Cu é um agente muito conhecido e utilizado para prevenir o crescimento microbiano (GRASS et al., 2011; VINCENT et al., 2016). A inibição pelo Cu foi observada em todos os isolados microbianos variando nas diferentes concentrações (Tabela 2). Essa resistência pode resultar de modificações nas estruturas celulares bacterianas, que apresentam adaptações em altas concentrações de metais pesados (GHANI et al., 2012). As cepas bacterianas resistentes a metais pesados podem compartilhar adaptações em comum com bactérias resistentes a antimicrobianos (IANEVA, 2009),

A resistência bacteriana à metais tóxicos e a antimicrobianos apresentam indícios de coevolução, e desenvolveram vários mecanismos de resistência e desintoxicação além disso, a capacidade de tolerar metais tóxicos é principalmente mediada por plasmídeo (PAL et al., 2017). A toxicidade à metais pesados no solo depende da localização geográfica, diversidade bacteriana e concentração de metais (RAJEEV et al., 2021). O presente estudo demonstra que os isola-

dos submetidos nas concentrações pré-determinadas de Fe, Cu e Pb, podem suportar altos níveis desses metais, quando comparado com Resolução CONAMA nº 430/2011, em que os valores máximos permitidos para o Fe é 15,0 mg/L, Cu 1,0 mg/L e de Pb 0,5 mg/L (BRASIL, 2011).

Os sedimentos de cavidades subterrâneas ferríferas são depósitos ricos em metais e oferecem oportunidades para isolar novos microrganismos resistentes a metais pesados ou descobrir novas rotas metabólicas para ciclagem de metais pesados (XU et al., 2013). No nosso estudo, 13 isolados não apresentaram CIM ao Pb, e microrganismos podem estar usando do mecanismo metabólico de produção de lipopeptídios com propriedades biossurfactantes e antimicrobianas (ROCCO, 2020). As leveduras mais comumente, toleram metais pesados, as quais se adaptam e crescem em altas concentrações de metais (IRAM et al., 2013), sendo que as linhagens GSP102, GSP201, GSA301 e GSA302 foram resistentes a todas as concentrações de Pb e Fe, e apresentaram a mesma tolerância ao Cu em 250 ppm (Tabela 2). Estudos demonstram que linhagens fúngicas podem ser tolerantes a metais como Cu e Pb, sendo bastante utilizados na remoção e tratamento de águas residuais e de solos contaminados com metais pesados (PARAMESWARI; LAKSHMANAN; THILAGAVATHI, 2010).

Considerando os mecanismos de interação das bactérias e leveduras com íons metálicos e sua capacidade de resistência e tolerância aos metais, esses microrganismos podem ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes impactados por metais pesados (IRAM; NASIR, 2012). Os processos microbianos de biotransformação e bioacumulação são os que estão envolvidos na remediação de metais pesados, sendo que a bioacumulação representa o cenário mais estratégico para investimento em tecnologia de biorremediação microbiana, visto seu potencial para ser implementado em programas/ações de recuperação de áreas impactadas por metais pesados (SANTOS et al., 2018).

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que as linhagens microbianas isoladas de solo da caverna GEM-1467 apresentaram tolerância ao Fe, e isso se explica pela presença desse metal na litologia da caverna estudada. Quanto ao Cu, as linhagens apresentaram diferentes graus de tolerância entre 31,25 a 250 ppm, diferentemente do Pb, em que 6 isolados apresentaram CIM de 500 e 100 ppm. Cabe salientar que nos-

solos isolados apresentaram tolerância às concentrações elevadas de Fe, Cu e Pb, acima dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira.

Deste modo, os isolados da caverna GEM-1467 são potenciais para a aplicabilidade biotecnológica em biorremediação, devido a capacidade de sobrevivência em altas concentrações dos metais analisados, proporcionando assim alternativas de es-

tudos posteriores com os isolados cavernícolas ferríferos para o tratamento e recuperação de áreas contaminadas por metais.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Capes pela bolsa concedida, e a Secretaria Regional de Governo do Sul e Sudeste do Pará pelo apoio no trabalho de campo.

## REFERÊNCIAS

- BARTON, Hazel A.; JURADO, Valme. **What's up down there? Microbial diversity in caves.** 2007.
- BELYAGOUBI, Larbi et al. Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. **International Journal of Speleology**, v. 47, n. 2, p. 8, 2018.
- BØDTKER, Gunhild et al. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 439-450, 2009.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho CONAMA.
- BRAVO, Gabriela Batista Gomes. **Resistência aos metais cobre, chumbo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas em ambiente aquático.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.
- BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.
- CHEN, Can; WANG, Jianlong. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 683-687, 2007.
- DAVIS, Madison C. et al. Surface runoff alters cave microbial community structure and function. **Plos One**, v. 15, n. 5, p. e0232742, 2020.
- DICKINSON, Andrew William et al. Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. **Environment International**, v. 132, p. 105117, 2019.
- GADD, Geoffrey Michael. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2009.
- GARBOSSA, Luis Hamilton Pospissil. **Desenvolvimento e avaliação de sistema de leito fixo- reator misto radial seguido de reator anóxico horizontal para a remoção de matéria orgânica e de nitrogênio de esgoto sanitário.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil)- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- GHANI, Abdul et al. Heavy metals and nutritional composition of some selected herbal plants of Soon Valley, Khushab, Punjab, Pakistan. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p. 14064-14068, 2012.
- GHOSH, Soumya; KUISIENE, Nomeda; CHEEPHTAM, Naowarat. The cave microbiome as a source for drug discovery: reality or pipe dream?. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 18-34, 2017.

- GRASS, Gregor; RENSING, Christopher; SOLIOZ, Marc. Metallic copper as an antimicrobial surface. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1541-1547, 2011.
- GULECAL-PEKTAS, Yasemin. Bacterial diversity and composition in Oylat Cave (Turkey) with combined Sanger/pyrosequencing approach. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 9, 2016.
- HALTTUNEN, T.; SALMINEN, S.; TAHVONEN, R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 30-35, 2007.
- HAMEDI, Javad; KAFSHNOUCHI, Maghsoud; RANJBARAN, Mohsen. A study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1587-1595, 2019.
- HU, Hang-Wei et al. Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 3896-3909, 2016.
- IANEVA, O. D. Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. **Mikrobiolohichniy Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)**, v. 71, n. 6, p. 54-65, 2009.
- IRAM, Shazia et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungal strains isolated from soil irrigated with industrial wastewater. **Biologija**, v. 58, n. 3, 2012.
- IRAM, Shazia et al. Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 22, n. 3, 2013.
- MA, Liyuan et al. Microbial Interactions Drive Distinct Taxonomic and Potential Metabolic Responses to Habitats in Karst Cave Ecosystem. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e01152-21, 2021.
- MAXWELL, S. et al., The Simulation of nitrate-reducing bacteria (NRB) in oil field systems to the control sulphate-reducing bacteria (SRB), microbiologically influenced corrosion (MIC) and reservoir souring. An introduction review. **Energy Institute**, LONDON, 2003.
- MOHR, Laura Cassol et al. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de ZnO E TiO<sub>2</sub> frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. 2017.
- MUSTAPHA, Mohammed Umar; HALIMOON, Normala. Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 33-37, 2015.
- NATH, Soumitra et al. Isolation and identification of metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria from soil samples of Cachar district of Assam, India. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 7, p. 1-9, 2019.
- PAL, Chandan et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance. **Advances in Microbial Physiology**, v. 70, p. 261-313, 2017.
- PARAMESWARI, E. et al. Biosorption and metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from metal polluted ecosystem. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 664-671, 2010.
- PARKER, Ceth W. et al. Fe (III) reducing microorganisms from iron ore caves demonstrate fermentative Fe (III) reduction and promote cave formation. **Geomicrobiology Journal**, v. 35, n. 4, p. 311-322, 2018.
- PAWLOWSKI, Jan et al. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarco-

- ding in biological assessment of aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 637, p. 1295-1310, 2018.
- PILÓ, L. B. et al. **Diagnóstico e análise de relevância das cavernas da Serra da Bocaina**. Belo Horizonte: Carste Consultores Associados, 2014. 179 p.
- PILÓ, L. B.; AULER, A. S. **Mineralogia de Espeleotemas em rochas ferríferas da Região de Carajás, Pará**. Instituto do Carste. Belo Horizonte. 60 p. (Inédito). 2011.
- RAJEEV, Meora et al. Exploring the impacts of heavy metals on spatial variations of sediment-associated bacterial communities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111808, 2021.
- RANALLI, Giancarlo; ZANARDINI, Elisabetta; SORLINI, Claudia. Biodeterioration—including cultural heritage. **Encyclopedia of Microbiology**. Schaechter M. (ed). Oxford, UK: Elsevier, pp. 191–205. 2009.
- RANGSEEKAEW, Pharada; PATHOM-AREE, Wasu. Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 387, 2019.
- RIQUELME, Cristina et al. Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1342, 2015.
- ROCCO, Débora Hidalgo Espinetti. **Análise da bioacumulação de chumbo, cobre e cádmio em meio aquoso utilizando Bacillus subtilis**. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Sorocaba. Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais. Sorocaba, 2020.
- SANCHEZ-MORAL, Sergio et al. The role of microorganisms in the formation of calcitic moonmilk deposits and speleothems in Altamira Cave. **Geomorphology**, v. 139, p. 285-292, 2012.
- SANTOS, Sidnei Cerqueira et al. Mapeamento Tecnológico de Processos Microbianos Aplicados na Biorremediação de Metais Pesados. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, ed. 8, 2018.
- SINGH, Pooja; CAMEOTRA, Swaranjit Singh. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 2, p. 291-297, 2004.
- SOUSA, Kally Alves de; CAMMAROTA, Magali Christe; SÉRVULO, Eliana Flávia Camporese. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Química Nova**, v. 33, p. 273-278, 2010.
- SOUZA, Ana Kely Rufino et al. Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadores. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 3, p. 95-106, 2018.
- TRAJANO Eleonora, **Biologia subterrânea: introdução** / Eleonora Trajano, Mana Elina Bichuette. - São Paulo; Redespeleo, 2006.
- VAN DER HEGGEN, Maarten et al. Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1355-1361, 2010.
- VINCENT, Marin; HARTEMANN, Philippe; ENGELS-DEUTSCH, Marc. Antimicrobial applications of copper. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 585-591, 2016.
- WIEGAND, Irith; HILPERT, Kai; HANCOCK, Robert EW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p.

163-175, 2008.

XU, Lin et al. *Halomonas zincidurans* sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt\_11, p. 4230-4236, 2013.

YASIR, Muhammad. Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 248-257, 2018.

ZADA, Sahib et al. Cave Microbes as a Potential Source of Drugs Development in the Modern Era. **Microbial Ecology**, p. 1-12, 2021.

ZANARDINI, Elisabetta et al. Nutrient cycling potential within microbial communities on culturally important stoneworks. **Environmental Microbiology Reports**, v. 11, n. 2, p. 147-154, 2019.