



LETÍCIA BIANCA PEREIRA

AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA À DRENAGEM DE MINA

Campinas, 2014





# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA BIANCA PEREIRA

## “AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA À DRENAGEM DE MINA”

Este exemplar corresponde à  
redação final da  
DISSERTAÇÃO defendida  
pela candidata

**LETÍCIA BIANCA  
PEREIRA**

e aprovada pela Comissão  
Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para obtenção do  
Título de Mestra em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Genética de  
Microorganismos.

Orientadora: Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni  
Coorientador: Dr. Renato Vicentini Dos Santos

CAMPINAS,  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P414a Pereira, Letícia Bianca, 1989-  
Avaliação da comunidade bacteriana associada à drenagem de mina / Letícia Bianca Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.  
Coorientador: Renato Vicentini dos Santos.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. 16S rRNA. 2. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 3. Bactérias. 4. Diversidade. 5. Cobre. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Vicentini, Renato. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of bacterial community associated with mine drainage

**Palavras-chave em inglês:**

16S rRNA

High-throughput nucleotide sequencing

Bacteria

Diversity

Copper

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Mestra em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Laura Maria Mariscal Ottoboni [Orientador]

Valéria Maia Merzel

Fábio Lúcio Caldas Ferraz

**Data de defesa:** 20-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

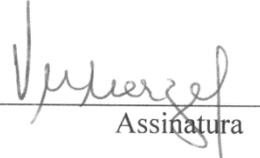
Campinas, 20 de fevereiro de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (orientadora)

  
Assinatura

Dra. Valéria Maia Merzel

  
Assinatura

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

  
Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dra. Salete Aparecida Gaziola

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## RESUMO

A mineração é um importante setor econômico brasileiro que envolve grande concentração de capital e está em constante crescimento. A drenagem de mina é a principal perturbação ambiental causada pelas diferentes etapas de mineração e compromete a qualidade do solo, da água superficial e subterrânea e, conseqüentemente, toda a biodiversidade. A drenagem consiste em uma solução percolante rica em metais pesados, ferro e enxofre. Apesar de suas características extremas, a drenagem de mina fornece um ambiente favorável para o crescimento de diversos micro-organismos os quais podem ser usados em tecnologias como a biorremediação, a biolixiviação e outras aplicações. Neste trabalho, foi realizado o pirosequenciamento do gene rRNA 16S de seis amostras de solo em um canal de drenagem neutra de mina e seis amostras de solo ao lado do canal para avaliar diferenças na composição, estrutura e diversidade das comunidades bacterianas desses ambientes na mina de cobre do Sossego, Brasil. Os parâmetros químicos, as análises de similaridade ANOSIM, escalonamento multidimensional não métrico (MDS) e a comparação entre os índices de diversidade revelaram uma diferença entre as amostras de solo e drenagem em termos de composição e estrutura da comunidade, mas não em riqueza de espécies. Análises estatísticas mostraram que o filo *Deinococcus/Thermus*, especialmente o gênero *Meiothermus*, foi em grande parte responsável pelas diferenças entre as comunidades, e foi positivamente associado com a presença de cobre e outros metais pesados nas amostras ambientais. Outros parâmetros importantes que influenciaram a diversidade e composição bacteriana foram os elementos potássio, sódio, níquel e zinco, bem como o pH. Análises estatísticas e da microbiota núcleo da comunidade bacteriana da drenagem revelaram que a comunidade variou ao longo do canal de escoamento em estrutura e diversidade de espécies. A comunidade da drenagem apresentou uma OTU (Unidade Taxonômica Operacional) generalista, identificada como *Meiothermus* e nenhuma OTU especialista foi encontrada. A microbiota da drenagem é basicamente formada por bactérias heterotróficas, com gupos resistentes a metais e à sal e com potencial

para a degradação de diversos compostos xenobióticos, além de apresentar grupos bacterianos ainda pouco caracterizados. A comunidade bacteriana do solo, assim como a comunidade da drenagem, também variou ao longo do canal. Foram encontradas duas OTUs generalistas e duas OTUs especialistas. A microbiota do solo é basicamente formada por bactérias heterotróficas, com alguns grupos resistentes a metais. No entanto, grande parte da microbiota núcleo desse ambiente permanece pouco caracterizada. Os resultados obtidos contribuem para a compreensão da diversidade bacteriana em solos impactados por drenagem neutra de mina, e demonstram que os metais pesados têm um papel importante na formação da comunidade microbiana nesse tipo de ambiente.

## ABSTRACT

Mining is an important and constantly growing Brazilian economic sector that involves large investments. Mine drainage is an important environmental disturbance caused by the different steps of the mining and compromises the quality of soil, surface water, and underground water bodies, hence affecting the biodiversity. Mine drainage consists in a percolating solution that is rich in heavy metals, iron and sulfur. Despite the extreme characteristics, the mine drainage provides a favorable environment for many microorganisms that can be used in bioremediation, bioleaching and others applications. In this work, a pyrosequencing approach of the 16S rRNA gene, of six soil samples from a neutral drainage channel and six soil samples next to the channel, was used to evaluate differences in composition, structure, and diversity of bacterial communities at the Sossego's copper mine in Brazil. The chemical parameters, the analyses of similarity ANOSIM, non-metric multidimensional scaling and the comparison of the diversity indices revealed differences between the drainage and the soil samples in composition and structure of the microbial community, but not in their species richness. The statistical analysis showed that the phylum *Deinococcus/Thermus*, especially the *Meiothermus* genus, was in large part responsible for the differences observed between the communities, and was positively associated with the presence of copper and other heavy metals in the environmental samples. Other important parameters that influenced the bacterial diversity and composition were the elements potassium, sodium, nickel and zinc, as well as the pH. Statistical analysis of the Shannon index and the analysis of the core microbiota of the drainage's bacterial community revealed that it changed along the flow channel in structure and diversity. The community of the drainage presented one generalist OTU (Operational Taxonomic Unit), identified as *Meiothermus* and no specialist OTU was founded. The microbiota of the drainage was basically formed by heterotrophic bacteria, with groups resistant to metals and salt and with the potential for degradation of a large number of xenobiotic compounds. Bacterial groups poorly characterized were also identified. Analyses of the soil samples revealed a heterogeneous bacterial community. Two generalist OTUs and two

specialist OTUs were found. The soil microbiota was basically formed by heterotrophic bacteria, with some groups resistant to metals, however, much of the core microbiota of that environment remains poorly characterized. These findings contribute to the understanding of bacterial diversity in soils impacted by neutral mine drainage, and demonstrate that heavy metals play an important role in shaping the microbial community in mine environments.

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO

Mineração: aspectos gerais .....	1
Drenagem de mina .....	2
Diversidade bacteriana em drenagem neutra de mina .....	5
Influência dos fatores ambientais nas comunidades microbianas .....	7

<b>OBJETIVOS</b> .....	9
------------------------	---

### MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras .....	10
Análises químicas .....	13
Isolamento do DNA, construção da biblioteca de rDNA 16S e pirosequenciamento .....	13
Processamento das sequências e análises estatísticas .....	14

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química das amostras .....	18
Composição taxonômica .....	21
Análise da diversidade.....	24
Influência dos parâmetros químicos na composição e diversidade microbiana .....	31
A comunidade da drenagem .....	38
A comunidade do solo .....	47

<b>CONCLUSÕES</b> .....	53
-------------------------	----

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
---	----



## **Dedicatória**

“Tudo é do Pai, toda honra, toda glória,  
é Dele a vitória, alcançada em minha vida”

Frederico Cruz



## AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida e da ciência. E por estar sempre comigo.

Aos meus pais, Tânia e Milton, pelo amor incondicional e por fazer de mim o que sou hoje.

Ao Paulo, pelo amor, carinho e pelo apoio em toda a minha caminhada.

A toda a minha família pela torcida sempre presente.

À minha orientadora, Laura Ottoboni, por me acolher e acreditar em mim. Pela oportunidade oferecida e pela contribuição à minha formação profissional.

Ao meu co-orientador, Renato Vicentini, pelo auxílio e paciência. Agradeço a contribuição ao meu trabalho.

A todos os meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular Ambiental: Camila, Daniel, Rafaella, Thiago e Viviane. Pelos bons momentos que passamos juntos, pela experiência compartilhada. Sem vocês meus dias não seriam os mesmos.

Aos membros da minha pré-banca, Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos e Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini pela contribuição na minha dissertação.

Os membros da banca examinadora Dra. Valéria Maia de Oliveira e Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz pela importante contribuição na minha dissertação.

Ao CBMEG e a Pós-graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo apoio institucional e a seus funcionários.

Ao CNPq e à Vale pelo apoio financeiro ao projeto.

À FAPESP (FAPESP 2012/05429-2) pelo financiamento da minha bolsa.

À VALE e aos seus funcionários, André Martinez e Francinaldo Sindeaux pela coleta e fornecimento das amostras ambientais.

Às minhas companheiras de apartamento, Aline e Tatiane, pela companhia e amizade.

Aos amigos que eu fiz nesses anos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

## INTRODUÇÃO

### **Mineração: aspectos gerais**

A mineração consiste na retirada das camadas profundas do solo, de minérios valiosos, como metais e pedras raras; minérios de interesse industrial, como ferro, carvão e urânio ou minérios de interesse agrícola como calcário e potássio. A extração pode ser feita em lavras a céu aberto ou subterrâneas, dependendo do tipo e disposição do material que será extraído (Jain & Karera, 2009; Silvas, 2010). Os processos de mineração atuais envolvem etapas de prospecção, estudo da área de interesse e análise do lucro potencial com sua exploração. Em seguida ocorre a extração do material desejado e, finalmente, a recuperação do local para outros usos quando a mina é encerrada. Assim, fica claro que a mineração é uma atividade que envolve muito planejamento e investimento (Jain & Karera, 2009).

A atividade mineradora é a base de diversas cadeias produtivas e tem papel fundamental no equilíbrio das contas externas nacionais. Assim sendo, é um importante setor econômico brasileiro. Em uma década - 2000 a 2009 - a produção de minério de ferro, por exemplo, cresceu mais de 50% (MME, 2010).

Segundo o Ministério de Minas e Energia (2013), no ano de 2012, a mineração contribuiu com 17,5 bilhões de dólares para o PIB (Produto Interno Bruto) nacional e correspondeu a 14,1% das exportações brasileiras e a perspectiva é continuar expandindo. Para o Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM, 2011), com o crescimento das economias emergentes e a crescente urbanização mundial, a produção mineral brasileira continuará crescendo, nos próximos anos, entre 10% e 15% ao ano.

A mineração de cobre é particularmente importante devido à grande demanda por esse metal. Segundo o *International Copper Study Group* (2013), a demanda mundial do cobre mais que triplicou nos últimos 50 anos, graças à expansão industrial, e a previsão é continuar crescendo. Entre janeiro e março de 2013, a produção de concentrado de cobre na mina de Sossego, no Pará, por

exemplo, chegou a 27,7 mil toneladas, o melhor resultado desde 2009 (IBRAM, 2013).

São significativas e variadas também as perturbações ambientais causadas pela extração de minérios. Entre essas perturbações podemos citar a erosão e contaminação do solo, a poluição de águas superficiais e subterrâneas e a consequente perda de biodiversidade dessas áreas (Jain & Karera, 2009).

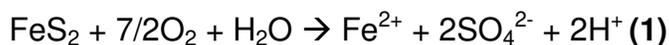
Um dos problemas ambientais mais graves associados à atividade mineradora é a oxidação natural (química e biológica) de minerais sulfetados que são expostos à água, oxigênio e a micro-organismos. Essa oxidação é responsável pela geração de uma solução aquosa denominada drenagem de mina, que é capaz de comprometer a qualidade dos recursos naturais (Banks *et al.*, 1997; Jain & Karera, 2009; Pancholi *et al.*, 2009).

### **Drenagem de mina**

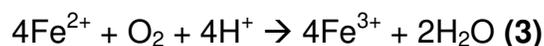
Durante as etapas de mineração, grande quantidade de solo e rocha é retirada para adquirir o material de interesse. Esses rejeitos, ricos em minerais sulfetados, são oxidados, liberando a drenagem de mina para o ambiente. A drenagem de mina pode ser ácida ou neutra/alcalina, dependendo de uma complexa interação de processos hidrológicos, químicos e biológicos. Além disso, drenagens de mina são ricas em metais pesados e enxofre (que estavam presentes nos minerais oxidados), mas pobres em nutrientes. Como resultado, a drenagem de mina é um poluente multifatorial (considerando aspectos como acidez ou alcalinidade, salinização, toxicidade por metais e processos de sedimentação) sendo que, a importância de cada fator depende das características do ambiente afetado (Gray, 1997; Jain & Karera, 2009; Pancholi *et al.*, 2009).

Quando a drenagem apresenta um pH menor que três, ela é chamada de drenagem ácida de mina (DAM). Segundo Kontopoulos (1998) e Mohapatra *et al.* (2011) o processo de formação da DAM ocorre da seguinte forma:

O oxigênio presente na atmosfera (equação 1) ou o íon férrico (equação 2) juntamente com a água atuam como agentes oxidantes, e são os responsáveis pelas reações iniciais da DAM.



Essas reações são seguidas pela oxidação do íon ferroso para o íon férrico (equação 3), e a consequente precipitação do hidróxido de ferro (equação 4).



A oxidação feita pelo oxigênio em pH baixo é muito lenta e limita a formação da DAM. No entanto, organismos procariotos que oxidam ferro e enxofre podem catalisar a oxidação desses íons e, portanto, acelerar a taxa de dissolução dos minerais (Baker & Banfield, 2003).

A oxidação dos minerais sulfetados pelas bactérias é mediado pelo íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Esse íon oxida os minerais quimicamente e é transformado na sua forma reduzida, o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). O íon ferroso, então, é utilizado como substrato pelas bactérias oxidantes de ferro, as quais re-oxidam o íon novamente, e o ciclo recomeça. A oxidação bacteriana pode ocorrer com ou sem contato. A oxidação sem contato é basicamente exercida por bactérias planctônicas e com os íons em solução. Na oxidação com contato, as bactérias se ligam a superfície dos minerais e os processos eletroquímicos ocorrem na interface entre a célula bacteriana e a superfície do mineral sulfetado, preenchida com substâncias poliméricas extracelulares (Vera *et al.*, 2013).

Devido às condições extremas de pH, a comunidade microbiana desse tipo de drenagem tem sido extensivamente estudada, pois a acidez aumenta significativamente a mobilidade e a disponibilidade dos metais, interferindo diretamente na microbiota presente do ambiente afetado (Lottermoser, 2010).

Avaliações de composição e diversidade já foram feitas nas comunidades microbianas em drenagem ácida de mina (Bruneel *et al.*, 2006; Kuang *et al.*, 2012), sedimentos fluviais contaminadas com DAM (Sánchez-Andrea *et al.*, 2011), ambientes de mina subterrâneos (Johnson, 2011) e sedimentos de DAM (Bruneel *et al.*, 2006).

Em muitos casos, devido à capacidade de neutralização dos resíduos minerais, ou intervenção humana com o espalhamento de calcário para precipitar os metais, a drenagem pode apresentar valores maiores de pH (4,5 a 8,5), e é denominada, então, de drenagem neutra de mina (DNM). Nesse caso, componentes como o cálcio e o magnésio oriundos de carbonatos neutralizam a acidez e mantêm o pH próximo a neutro (equação 5).



Os metais se comportam de maneiras diferentes na água das DNM naturais e naquelas neutralizadas quimicamente. Enquanto que, no processo de neutralização química, a maioria dos metais é removida da drenagem, as drenagens de mina neutra/alcalinas naturais são conhecidas por conter concentrações elevadas de metais e metalóides, os quais podem permanecer solúveis em pH neutro/alcalino dependendo das condições redox do ambiente. Dessa forma esse tipo de drenagem pode causar problemas ambientais graves em áreas de mineração (Banks *et al.*, 1997; Lindsay *et al.*, 2009, Lottermoser, 2010). Em ambientes de solo, no entanto, pouco se sabe sobre o comportamento dos metais presentes na DNM e o seu efeito na microbiota local.

Estudos anteriores têm relatado que a DNM contém uma grande diversidade bacteriana, enquanto que na DAM, essa diversidade é tipicamente baixa. Usando abordagens de metagenômica e metaproteômica, Halter *et al.* (2011) encontraram uma grande variedade de bactérias em sedimentos levemente alcalinos em uma mina francesa, incluindo organismos oxidantes de ferro e heterotróficos. Reis *et al.* (2013) encontraram altos índices de diversidade em amostras de sedimento neutro de rio contaminado com metais pesados liberados

de uma mina de arsênio brasileira. Embora apresente uma grande biodiversidade, a DNM ainda é um ambiente pouco explorado e pouco se conhece a respeito da estrutura e diversidade da comunidade bacteriana de locais contaminados com esse tipo de drenagem.

### **Diversidade bacteriana em drenagem neutra de mina**

Em drenagens neutras é comum a presença de altas concentrações de cálcio, magnésio e sódio, além de metais. Por esse motivo, a drenagem neutra pode apresentar um impacto negativo sobre o ambiente em que se encontra (Rose & Cravotta, 1998; Lottermoser, 2010). Embora a drenagem neutra de mina seja preocupante quando presente em ambientes naturais, o estudo dos organismos ali presentes pode proporcionar diversas aplicações industriais de interesse. Muitos trabalhos, por exemplo, vem utilizando bactérias isoladas de ambientes de mina para biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados (Ma *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade e potencial metabólico da comunidade microbiana associada à drenagem de mina. Além disso, a resolução e o número de filotipos encontrados dependem das técnicas utilizadas e do tipo de amostra estudados.

Nos rejeitos minerais alcalinos, por exemplo, Piotrowska-Seget *et al.* (2005) isolaram a bactéria *Variovorax paradoxus* ( $\beta$  – *Proteobacteria*) em pilha de rejeito estéril de uma mina de prata, na Polônia. Por outro lado, no trabalho de Zhang *et al.* (2007) foram estudadas as comunidades bacterianas de uma pilha de minério de chumbo e zinco abandonada à cerca de 100 anos. Devido ao longo período de exposição à superfície, essa pilha foi colonizada por diversas gramíneas e arbustos. Foram estudadas as bactérias de três profundidades diferentes na pilha (10, 100 e 200 cm). Os resultados mostraram que *Acidobacteria* foi o filo mais abundante em todas as profundidades, mostrando uma grande diversidade filogenética e a capacidade de adaptação desse grupo de bactérias. *Gammaproteobacteria* foi dominante na superfície (10 cm), enquanto que, *Deltaproteobacteria* foi dominante nas camadas mais profundas da pilha e está, provavelmente, relacionado à redução de metais desse ambiente.

Em ambientes de drenagem neutra de mina também é possível encontrar biofilmes bacterianos. Ferris *et al.* (1989) avaliaram a composição bacteriana em biofilmes presentes em um lago contaminado por drenagem de mina, no Canadá, utilizando microscopia eletrônica. Na região do lago com pH neutro, o biofilme era composto basicamente por *Cyanobacteria* e algumas bactérias Gram-negativas. Labrenz & Banfield (2004), por sua vez, avaliaram a diversidade microbiana de biofilmes em águas neutras no interior de túneis abandonados de uma mina de chumbo nos EUA. Essa mina foi completamente inundada, formando um ambiente anaeróbico. O sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S revelou que o biofilme era definido pela interação de bactérias redutoras de sulfato Gram-negativas da família *Desulfobacteriaceae* com bactérias fermentativas e oxidantes de enxofre (presentes devido à pequenas áreas aeróbias no biofilme).

Outros trabalhos vêm estudando a comunidade microbiana em diferentes ambientes contaminados por drenagem de mina. Piotrowska-Seget *et al.* (2005) isolaram bactérias tolerantes a metais pesados em solos neutros/alcalinos contaminados por rejeitos de uma mina de prata. Foram encontradas nesses locais bactérias tolerantes a cádmio, zinco e prata. As principais bactérias encontradas foram, na sua maioria, Gram-negativas e identificadas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Variovorax*, *Methylobacterium* e *Flavobacterium*. Entre as Gram-positivas foram encontradas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e outras bactérias do filo *Firmicutes*.

Reis *et al.* (2013) por sua vez, estudaram sedimentos fluviais neutros localizados no Quadrilátero Ferrífero da Bacia do Rio das Velhas, Minas Gerais, Brasil, e que estavam contaminados com arsênio e outros metais devido à atividade mineradora dessa região. Foram sequenciados fragmentos do gene ribossomal rRNA 16S e foram encontradas sequências afiliadas com *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes* e muitos outros grupos bacterianos. Nota-se, portanto, que as comunidades bacterianas presentes em ambientes neutros e com altas concentrações de metais são

bastante diversas e sua composição varia de acordo com o local estudado e o tipo de contaminação existente.

Em ambientes de mineração, as drenagens de mina são geralmente armazenadas em lagos, onde é possível avaliar a comunidade microbiana na solução aquosa e nos sedimentos encontrados na parte inferior dos lagos. Majzlan *et al.* (2011) avaliaram a microbiologia associada à drenagem neutra de rejeitos ricos em arsênio na mina abandonada Pezinok, Eslováquia. Neste trabalho, foram coletadas amostras da solução aquosa da drenagem e do sedimento oriundos de furos de prospecção localizados na mina. A acidez gerada pela drenagem foi neutralizada pela presença de carbonatos como calcita e dolomina. Foram realizadas análises de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do rDNA 16S para avaliar a diversidade microbiana do resíduo e observou-se uma grande proporção de fragmentos relacionados a bactérias heterotróficas, principalmente dos gêneros *Sphingomonas*, *Caulobacter* e *Janthinobacterium*. Também foram encontradas sequências afiliadas a bactérias redutoras de ferro (*Geobacter* e *Rhodoferrax*) e enxofre (*Sulfuricurvum*, *Alkalilimnicola*, *Acidithiobacillus* e *Ectothiorhodospiraceae*). A presença do gênero *Acidithiobacillus* é particularmente interessante uma vez que este grupo é comumente acidófilo e presente em drenagens ácidas, mas foi capaz de adaptar às condições neutras. Nota-se, portanto, que a comunidade bacteriana associada à drenagem neutra de mina é bastante variada e se difere de acordo com o local estudado.

A investigação das comunidades bacterianas em drenagem neutra de mina pode, ainda, revelar espécies ainda não descritas, as quais podem fornecer um *pool* de genes e proteínas com diferentes aplicações industriais. No trabalho de Majzlan *et al.* (2011), por exemplo, 23% do total de sequências de rDNA 16S analisadas não foram atribuídas à nenhuma bactéria conhecida. Além disso, a diversidade metabólica da comunidade microbiana presente em drenagem neutra de mina torna esse ambiente ideal para estudos de genomas, ecologia, evolução, mecanismos de tolerância e de interação entre bactérias e fatores ambientais (Baker & Banfield, 2003; Lauber *et al.*, 2009; Deneff *et al.*, 2010).

## **Influência dos fatores ambientais nas comunidades microbianas**

A diversidade e a composição da comunidade microbiana variam consideravelmente no meio ambiente devido às alterações dos fatores bióticos e abióticos. Muitos fatores ambientais vêm sendo apontados como importantes moduladores dessas comunidades como, por exemplo, a estação do ano (Streten-Joyce *et al.*, 2013), o pH (Kock & Schippers, 2008), a matéria orgânica (Bouskill *et al.*, 2010) e também a interação destes e outros fatores.

Ge *et al.* (2008) avaliaram pela técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) 212 amostras de solo na China para verificar a influência de eventos passados (localização e perfil do solo) e contemporâneos (aplicação de fertilizantes) na comunidade bacteriana. Os resultados mostraram que os eventos passados poderiam ser o fator responsável pela variação da diversidade bacteriana em uma escala espacial regional (cerca de 1000 km), ao passo que alguns dos eventos contemporâneos causaram variação nos micro-organismos em uma escala espacial local.

Lauber *et al.* (2009), por sua vez, avaliaram, por sequenciamento em larga escala do gene de rRNA 16S, a comunidade bacteriana de 88 solos coletados no continente americano. Nesse trabalho, o pH foi o fator que melhor explicou a diferença na diversidade entre os locais de coleta, influenciando principalmente os filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*. No entanto, muitas outras variações nos filos bacterianos desses solos, cujo pH não representava uma forte influência, não puderam ser explicadas.

A interação entre a comunidade bacteriana e os metais pesados presentes em solo ainda é pouco estudado. Guo *et al.* (2009) mostraram que solos contaminados com metais pesados em minas abandonadas na Austrália não tiveram qualquer impacto na diversidade bacteriana. Marcin *et al.* (2013), ao contrário, reportaram que um alto conteúdo de metais pesados em solo de floresta tiveram influência negativa na atividade e na diversidade bacteriana. Iglesia *et al.* (2006) estudaram a comunidade microbiana de solos contaminados e reflorestados em uma mina de cobre, no Chile. Os resultados mostraram que, nas

amostras de solo dessa mina, o cobre foi o fator que mais afetou a estrutura da comunidade bacteriana, juntamente com o pH e o conteúdo de matéria orgânica.

Nas drenagens ácidas presentes em três minas de carvão chinesas estudadas por Xie *et al.* (2011), as características físico-químicas que mais afetaram a estrutura e a atividade da comunidade microbiana foram os gradientes de enxofre, magnésio e boro, os metais pesados cobre e níquel, além de fósforo. Como as condições de cada mina variam de acordo com o clima, tipo de solo e composição mineralógica dos rejeitos, a comunidade bacteriana foi fortemente afetada pelos fatores ambientais locais, enquanto que a distância geográfica entre as amostras apresentaram pouca influência.

Kock & Schippers (2008) encontraram diferenças significativas entre as comunidades de diferentes minas sujeitas a geomorfologias e climas distintos. Nas três minas avaliadas, localizadas na Suécia, Botswana e Alemanha, parâmetros como temperatura, pH, difusão de oxigênio e mineralogia determinaram a composição da comunidade microbiana. Apesar dos gêneros típicos desses ambientes, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, e *Sulfobacillus*, serem detectados nos três locais, a distribuição das espécies e a diversidade foram distintas.

Nota-se, portanto que os padrões da distribuição das bactérias no solo são variáveis e depende do número de fatores analisados (pH, salinidade, metais e outros), o grau de resolução filogenética analisada e a escala espacial estudada (Noguez *et al.*, 2005; Lauber *et al.*, 2009).

O advento das novas tecnologias de sequenciamento em larga escala oferecem oportunidades de caracterizar essas comunidades bacterianas com grande profundidade e em um grande número de amostras. Assim, será possível entender os padrões de distribuição das bactérias nos ambientes e como estas interagem com os fatores abióticos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

O objetivo do presente trabalho é avaliar a comunidade bacteriana em solo impactado por drenagem neutra de mina e como os parâmetros químicos do solo influenciam essa comunidade em termos de composição, estrutura e diversidade de espécies.

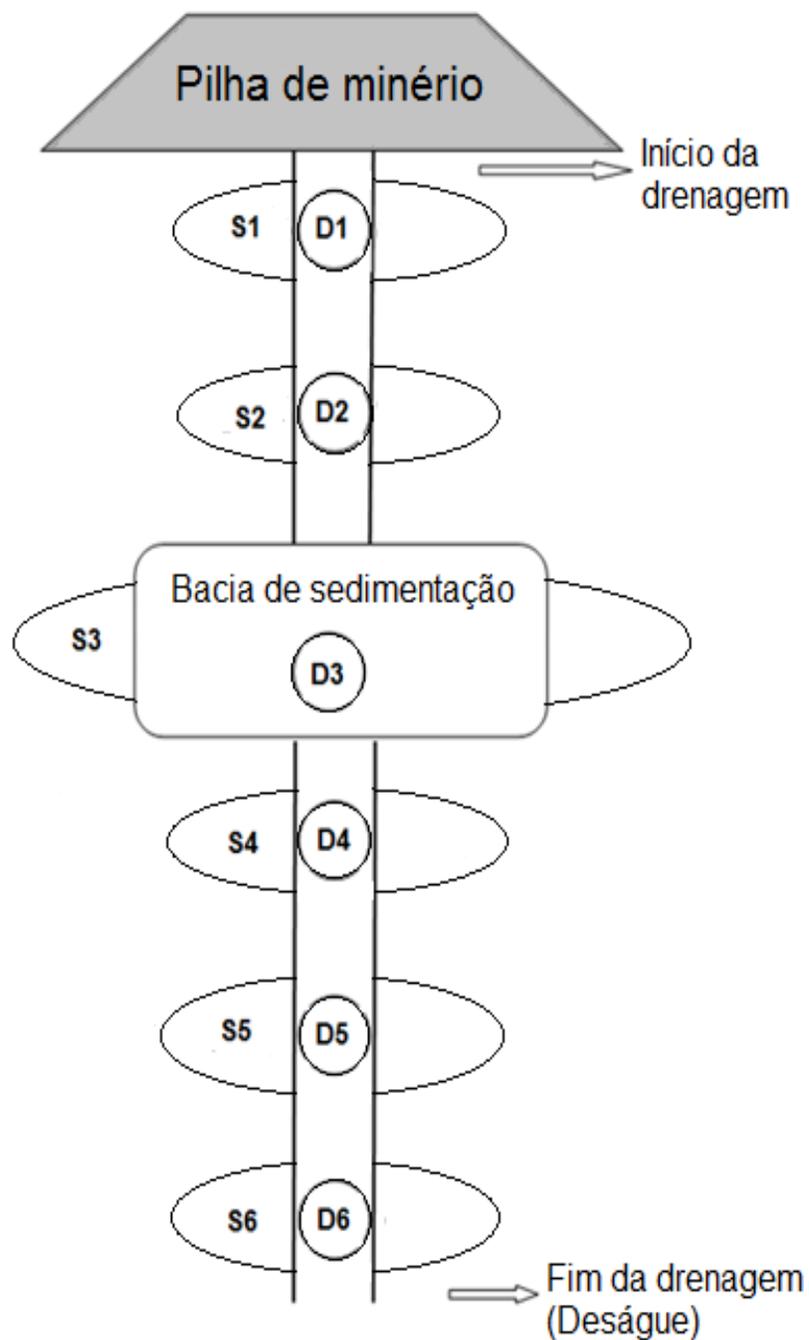
### **Objetivos específicos**

- Comparar as comunidades bacterianas de drenagem e solo em termos de composição, estrutura e diversidade de espécies;
  
- Avaliar a influência dos parâmetros químicos na composição e na diversidade de espécie das comunidades bacterianas das amostras de drenagem e solo;
  
- Caracterizar a microbiota da drenagem e solo quanto à sua estrutura, distribuição das OTUs no ambiente e microbiota núcleo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas na mina do Sossego, no município de Canaã dos Carajás, Pará. A mina foi descoberta em 1997 e, desde então, é operada pela companhia Vale para a extração, principalmente, de minério de cobre. Nessa mina, a drenagem escoar de forma contínua ao longo de um canal no solo, partindo da base de uma pilha de minérios até uma bacia de sedimentação de metais. Em seguida, segue pelo canal até o ponto de deságue em um canal de armazenamento. Ao longo de todo o canal, a drenagem é tratada com calcário para aumentar o pH do solo e precipitar os metais pesados. Seis amostras de drenagem (D1-6) foram coletadas assepticamente a partir da camada superior do solo (0-10 cm). Seis amostras de solo não contaminadas com drenagem de mina (S1-6) também foram coletadas (0-10 cm), ao redor de cada amostra de drenagem. As figuras 1 e 2 (a-f) mostram o esquema da coleta e as fotos dos pontos de amostragem, respectivamente. As amostras foram estocadas a -20°C.



**Figura 1.** Esquema de amostragem de solos contaminados e não contaminados com drenagem na Mina do Sossego, PA. D1-6: Amostras de drenagem de mina coletadas ao longo do canal. S1-6: amostras de solo do entorno do canal, não contaminadas com drenagem de mina.



**Figura 2.** Fotos dos pontos de coleta da Mina do Sossego, PA. a) Saída da drenagem da pilha de minério (amostras D1 e S1); b) Canal de escoamento da drenagem (amostras D2 e S2); c) Bacia de sedimentação (amostras D3 e S3); d) Canal de escoamento da drenagem (amostras D4 e S4); e) Canal de escoamento da drenagem (amostras D5 e S5); f) Ponto de deságue (amostras D6 e S6). Fotos fornecidas pela Companhia Vale.

## **Análises químicas**

Os parâmetros químicos cádmio (Cd), cálcio (Ca), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), enxofre (S), ferro (Fe), fósforo (P), magnésio (Mg), manganês (Mn), níquel (Ni), potássio (K), sódio (Na) e zinco (Zn) foram determinados para cada usando a técnica analítica EPA SW-846, método 3051A (EPA, 1986). O conteúdo de matéria orgânica (MO) e o pH (solo/água = 1:2,5, m/v) foram determinados como descritos por Camargo *et al.* (2009). Todas as análises foram feitas em duplicata.

## **Isolamento do DNA, construção da biblioteca de rDNA 16S e pirosequenciamento**

Antes do isolamento do DNA, os metais pesados foram removidos a partir das amostras ambientais utilizando o método de Sanchez-Andrea *et al.* (2011), com modificações. Para isso, as amostras (0,5 g) foram suspensas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) (136,9 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), agitadas e centrifugadas a 12.000 rpm em uma microcentrífuga durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram suspensas em 1 mL de EDTA 0,5 M, pH 8 e incubou-se a 4°C durante 2 h. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi descartado. A lavagem com EDTA foi repetida até que os metais fossem completamente removidos. A amostra foi então lavada com PBS, e o DNA foi isolado a partir de uma alíquota de 0,25 g de solo usando o *Power Soil® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc.)* segundo as especificações do fabricante.

A amplificação da região V3-V4 do gene rRNA 16S foi realizada utilizando os *primers* 338F e 806R (Huse *et al.*, 2008; Masoud *et al.*, 2011). As reações de amplificação (volume final de 25 µL) foram compostas de 3-10 ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer*, 0,5 U de *AccuPrime® Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen) e *Reaction Mix AccuPrime Pfx® 1X* (Invitrogen).

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 1 min, 20 ciclos a 94°C durante 15 s, 52°C durante 30 s,

72°C durante 30 s, e uma extensão final a 72°C durante 2 min. Após a primeira amplificação, mais cinco ciclos foram realizados, com um volume final de 50 µL e usando as mesmas condições de amplificação, para adicionar os *barcodes* específicos para cada amostra e os adaptadores Lib-A e Lib-B. A tabela 1 mostra os *primers* utilizados na segunda amplificação.

A purificação dos produtos de amplificação foi realizada utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose. Uma mistura equimolar das 12 amostras foi feita para obter 2.400 ng de produto de PCR com uma concentração de 16,48 ng/µL. Os *amplicons* foram sequenciados na plataforma 454 GS Júnior (Roche Company, Branford, CT, EUA) pela Helixxa.

### **Processamento das sequências e análises estatísticas**

Para a análise da qualidade das sequências e o agrupamento dessas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) (97% ou mais de similaridade) foi utilizado o pacote QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). As sequências com qualidade  $\geq 25$  e tamanho entre 400 e 468 pb (pares de base) foram utilizadas nas análises posteriores. Não foram admitidos *mismatches* nem bases ambíguas na sequência dos *primers*. As sequências quimeras foram identificadas e removidas utilizando o algoritmo *ChimeraSlayer* no pacote QIIME. A classificação taxonômica das OTUs foi realizada no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) com um *threshold* de 80%. O teste *t* de Student foi empregado para comparar as amostras de drenagem e solo em relação aos parâmetros químicos usando o programa Statistica v.10 (StatSoft Inc., 2003).

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados na segunda amplificação. A sequência em negrito corresponde aos adaptadores, TCAG (sequencia para verificar a qualidade das bases) e a sequência em vermelho corresponde aos *barcodes*, seguida do *primer* 338F.

Amostra	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')
D1	338F_454-A1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>ACGAGT</b> <b>GCGT</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
D2	338F_454-A2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>ACGCTCGACA</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
D3	338F_454-A3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>AGACGCACTC</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
D4	338F_454-A4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>AGCACTGTAG</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
D5	338F_454-A5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>ATCAGACACG</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
D6	338F_454-A6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>ATATCGCGAG</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
S1	338F_454-A7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>CGTGTCTCTA</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
S2	338F_454-A8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>CTCGCGTGTCT</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
S3	338F_454-A9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>TAGTATCAGC</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
S4	338F_454-A10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>TCTCTATGCG</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
S5	338F_454-A11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>TGATACGTCT</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
S6	338F_454-A12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>TACTGAGCTA</b> ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Todas	806R_LibL-B	CCTATCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCGGACTACNNGGGTATCTAAT

A análise de similaridade (ANOSIM) foi usada para testar a significância das diferenças observadas entre as amostras de drenagem e solo, baseada na distância de Bray-Curtis, considerando a composição das OTUs em cada amostra. O teste *t* de Student (com 95% de intervalo de confiança) foi utilizado para determinar se os índices de diversidade Simpson, Shannon e Berger-Parker foram estatisticamente diferentes em termos de riqueza e dominância de espécies entre as amostras de drenagem e solo. Análises de escalonamento multidimensional não métrico (n-MDS) foram realizadas usando a matriz de distância Bray-Curtis para plotar a distância entre as amostras, considerando a distribuição das OTUs e os parâmetros químicos. A análise de SIMPER (*Similarity Percentage*) foi usada para identificar os taxa que foram os principais responsáveis pela diferença observada entre as amostras de solo e drenagem. Todas as análises foram feitas com os dados normalizados pelo número total de sequências de cada amostra, usando o programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

As sequências foram submetidas à plataforma automática MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008) e uma tabela de classificação baseada no banco de dados RDP (80% de identidade, 50 qbp de comprimento mínimo de alinhamento e *e-value* máximo de  $10^{-5}$ ) foi gerada e utilizada no programa STAMP (Parks & Beiko, 2010). Esse programa foi utilizado para comparar a proporção das sequências afiliadas a um determinado grupo taxonômico entre as amostras de drenagem e solo baseado no teste *t* de Student com 95% de intervalo de confiança.

As análises de árvore de regressão multivariada (MRT - *Multivariate Regression Tree*), *Aggregated boosted tree* (ABT) e correlação de Spearman foram feitas para correlacionar os parâmetros químicos e os dados biológicos. MRT (De'ath, 2002) foi usado para explorar a relação dos parâmetros químicos com a abundância relativa dos filos dominantes e os índices de diversidades normalizados. Essa análise foi feita usando o pacote *mvpart* no ambiente estatístico R, com os parâmetros padrões. ABT (De'ath, 2007) foi realizado (com 5000 árvores, validação cruzada *10-fold* e interação de três vias) para avaliar a importância relativa dos parâmetros químicos para a abundância relativa dos filos dominantes, usando o pacote *gbmplus* no programa R. A correlação não

paramétrica de Spearman foi utilizada para testar a significância ( $p < 0,5$ ) da relação entre os parâmetros químicos e a abundância dos filos dominantes, usando o programa Statistica v.10.

As OTUs generalistas de drenagem e solo foram definidas como aquelas OTUs presentes em todas as amostras e que registraram as maiores abundâncias médias ( $\geq 100$  na escala logarítmica) no ambiente estudado. As OTUs especialistas de drenagem e solo foram definidas como aquelas OTUs presentes em uma ou duas amostras e que registraram as maiores abundâncias médias ( $\geq 100$  na escala logarítmica) no ambiente estudado. A microbiota núcleo de drenagem e solo foi definida como o conjunto de OTUs presentes em todas as amostras do ambiente estudado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização química das amostras

Um total de 16 parâmetros químicos foi determinado para cada amostra. O pH das amostras de solo variou de 4,86 a 8,66 e os da drenagem de 6,08 a 8,05, o que caracteriza essa drenagem como neutra. Isso se deve à adição de calcário ao longo do canal de drenagem na mina do Sossego, o que também aumentou o pH dos solos ao redor da drenagem. A caracterização química completa das amostras é mostrada na tabela 2.

A distribuição dos parâmetros químicos em drenagem neutra de mina varia de acordo com a composição mineralógica da pilha de rejeitos oxidada. Dessa forma, é possível encontrar drenagens de mina com diferentes composições. Heikkinen *et al.* (2009), por exemplo, avaliaram a composição química de drenagem neutra na mina Hitura, Finlândia, onde é extraído minério de níquel e cobre. Nesse trabalho, os teores de metais como níquel (0,2 a 14,3 mg/L), cobre (0,003 a 0,02 mg/L), cádmio (0,037 a 0,042 mg/L) e ferro (16,7 a 42 mg/L), foram menores quando comparados aos teores encontrados no solo (da drenagem e do entorno) na mina do Sossego (tabela 2). O tipo de amostra estudada também pode ser determinante para a acumulação de metais. Em amostras de solo, os metais podem ser adsorvidos pelas partículas de matéria orgânica, enquanto que, em soluções aquosas (como foi estudado na mina Hitura) os metais podem precipitar, deixando a água e acumulando na forma de sedimentos.

Os teores de cálcio também foram maiores na mina brasileira devido ao tratamento com calcário, enquanto que, na mina estudada por Heikkinen, o cálcio foi exclusivamente oriundo da pilha de rejeitos (203 a 445 mg/L).

**Tabela 2.** Parâmetros químicos das amostras de drenagem e solo. As concentrações estão expressas em mg/Kg. O conteúdo de matéria orgânica está expresso em g/dm<sup>3</sup>.

<b>Amostra</b>	<b>Cd</b>	<b>Ca</b>	<b>Pb</b>	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>S</b>	<b>Fe</b>	<b>P</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>K</b>	<b>Na</b>	<b>Zn</b>	<b>pH</b>	<b>MO</b>
<b>D1</b>	0,8	15000	5,3	27334	33,2	3000	40906	2000	14700	298	135	18,6	2,8	64,2	7,79	21
<b>D2</b>	0,4	20300	3,2	45713	9,1	1600	7825	1900	6800	473	147	2,3	1	20,3	7,81	21
<b>D3</b>	0,7	5700	5	38777	30,3	134000	33820	58500	10700	206	112	13,2	2,8	37,8	6,08	39
<b>D4</b>	0,5	191000	3,2	63672	11,1	5200	9834	3600	4000	515	127	1,6	1	20,9	7,62	25
<b>D5</b>	0,5	8100	4,5	10234	29,1	2300	30632	1500	8500	279	123	18,6	2,3	30,6	8,05	13
<b>D6</b>	0,7	1500	10,9	2888	23,7	250	42604	220	950	178	29,5	1,6	1	13,2	7,62	16
<b>S1</b>	0,4	1200	3	3209	15,7	280	9508	440	3300	104	57,2	94	70,5	12,2	4,86	6
<b>S2</b>	0,7	7900	13,2	22056	43,7	171000	31834	1000	1300	1178	97,5	166	85	16,3	6,24	30
<b>S3</b>	0,3	131000	2,9	2120	29,7	580	15997	610	14300	291	45,9	355	131	7,9	8,66	13
<b>S4</b>	0,5	6100	9,3	600	27,1	430	30904	290	1300	690	37,7	229	82,6	14,7	6,62	53
<b>S5</b>	0,4	10500	1,7	2729	23,2	490	14937	530	6100	157	97,9	538	181	15,9	8,78	11
<b>S6</b>	0,5	15100	5	7009	19,3	410	26995	360	3000	259	53,5	229	64	12,3	8,33	21

Na mina do Sossego, diferenças significativas entre as amostras de drenagem e solo foram observadas para cobre, níquel, potássio, sódio e zinco (tabela 3). A concentração de metais pesados foi maior nas amostras de drenagem, enquanto que sódio e potássio foram maiores nas amostras de solo.

**Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros químicos das amostras de drenagem e solo e valores p derivados do teste *t* de Student. A concentração dos metais está expressa em mg/Kg. O conteúdo de matéria orgânica está expresso em g/dm<sup>3</sup>.

	<b>Drenagem</b>	<b>Solo</b>	<b>Valor p</b>
	<b>Valores médios</b>	<b>Valores médios</b>	
<b>Cádmio</b>	0,60	0,47	0,15
<b>Cálcio</b>	40266,67	28633,33	0,76
<b>Chumbo</b>	5,35	5,85	0,82
<b>Cobre</b>	31436,33	6287,17	0,03*
<b>Cromo</b>	22,75	26,45	0,54
<b>Enxofre</b>	24391,67	28865,00	0,90
<b>Ferro</b>	27603,50	21695,83	0,43
<b>Fósforo</b>	11286,67	538,33	0,28
<b>Magnésio</b>	7608,33	4883,33	0,36
<b>Manganês</b>	324,83	446,50	0,51
<b>Níquel</b>	112,25	64,95	0,04*
<b>Potássio</b>	9,32	268,50	0,002**
<b>Sódio</b>	1,82	102,35	0,00**
<b>Zinco</b>	31,17	13,22	0,04*
<b>pH</b>	7,50	7,25	0,73
<b>MO</b>	22,50	22,33	0,98

\* Significância estatística a 5%

\*\* Significância estatística a 1%

O maior conteúdo de metais nas amostras de drenagem era esperado uma vez que eles faziam parte da composição dos minerais no depósito de minério da mina do Sossego e, depois da oxidação, tornaram-se solúveis e escoaram ao longo do canal da drenagem. Em contraste, as amostras de solo continham maiores teores de sódio e potássio. Esses componentes químicos podem ter tido um papel importante na formação da comunidade bacteriana nesse ambiente. No entanto, é importante mencionar que tanto as amostras de drenagem quanto as de solo, apresentaram altas concentrações de metais pesados, ferro e enxofre, além de cálcio e magnésio. O cálcio é derivado do calcário que é rotineiramente empregado para aumentar o pH da drenagem. Portanto, ambos os ambientes, drenagem e solo, apresentaram condições extremas.

### **Composição taxonômica**

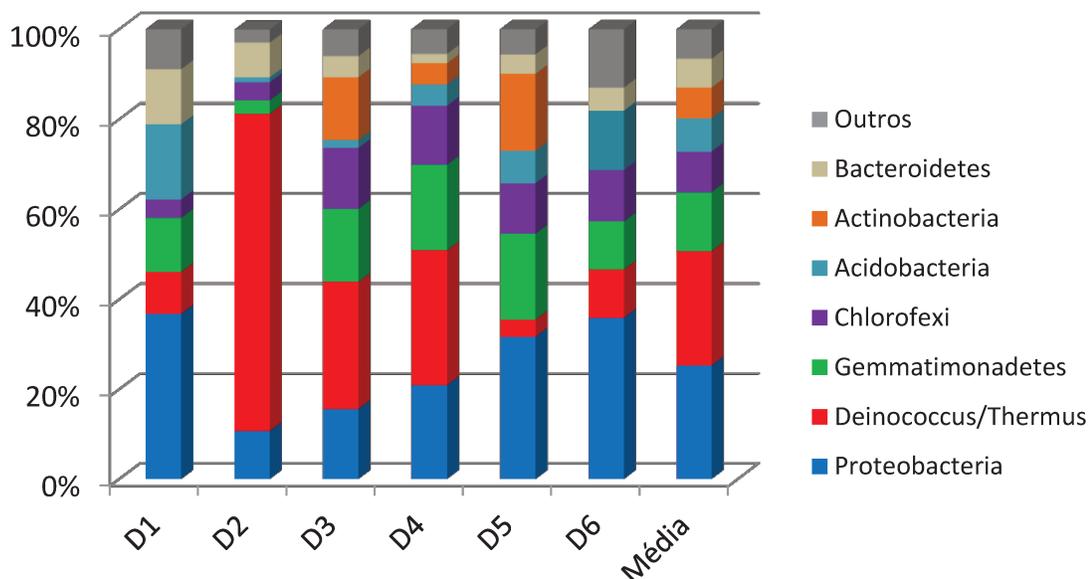
O pirosequenciamento resultou em 102.655 sequências de qualidade das 12 amostras ambientais analisadas. O número de sequências por amostra variou de 3.248 a 21.198 ( $8.554,58 \pm 5.390,96$ ). Um total de 5.901 OTUs foi encontrado e aproximadamente 45% eram sequências únicas; ou seja, aparecia uma única vez em todo o pirosequenciamento. Dessas OTUs, 5.636 (95,5%) puderam ser atribuídas a, pelo menos, um filo particular e 24 OTUs foram identificadas como *Archaea*. A cobertura de Good das amostras variou entre 83,8 a 99% ( $93,22 \pm 4,67\%$ ). A tabela 4 mostra as características gerais de cada amostra.

As amostras de drenagem apresentaram um total de 3.023 OTUs, enquanto que as amostras de solo apresentaram 4.031 OTUs. Apenas 1.153 OTUs (19,5%) foram compartilhadas entre os dois ambientes, sendo que a maioria das OTUs foi encontrada exclusivamente em um dos ambientes analisados.

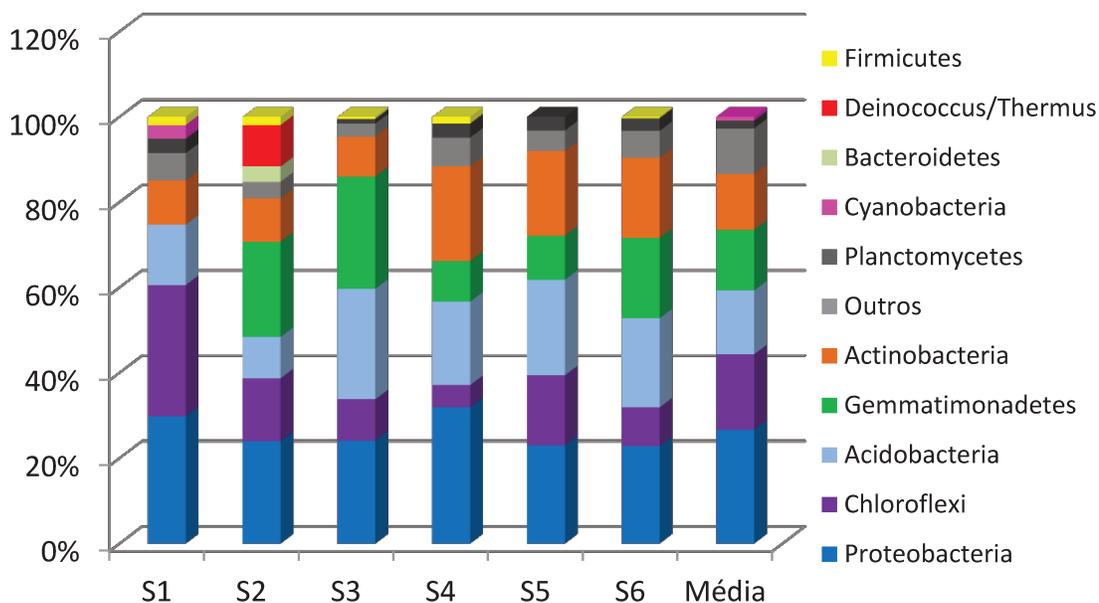
**Tabela 4.** Informações gerais das amostras de drenagem e solo.

Amostra	Localização	Número de sequências	Número de OTUs	Cobertura de Good
D1	6 25 35,52S, 50 3 5,66W	9.280	1.098	94,14%
D2	6 25 36,06S, 50 3 5,48W	10.101	358	98,15%
D3	6 25 36,65S, 50 3 5,5W	7.780	489	96,74%
D4	6 25 37,32S, 50 3 4,03W	4.730	542	94,23%
D5	6 25 50,92S, 50 2 58,42W	12.306	1.316	95,08%
D6	6 25 57,27S, 50 2 58,86W	5.684	933	91,47%
S1	6 25 35,52S, 50 3 5,66W	14.857	422	99,04%
S2	6 25 36,06S, 50 3 5,48W	21.198	1.312	97,14%
S3	6 25 36,65S, 50 3 5,5W	3.248	593	91,23%
S4	6 25 37,32S, 50 3 4,03W	5.596	1.654	83,86%
S5	6 25 50,92S, 50 2 58,42W	3.710	676	91,48%
S6	6 25 57,27S, 50 2 58,86W	4.165	1.132	86,1%

Os filos *Proteobacteria* (25,3%) e *Deinococcus/Thermus* (25,4%) foram dominantes nas amostras de drenagem (figura 3), enquanto que nas amostras de solo os filos dominantes foram *Proteobacteria* (26,6%), *Chloroflexi* (17,7%), *Acidobacteria* (15%), *Gemmatimonadetes* (14,2%) e *Actinobacteria* (13,1%) (figura 4). Dentro do filo *Proteobacteria*, o taxon dominante foi *Alphaproteobacteria* (44,7% em drenagem e 51,7% em solo), seguido por *Betaproteobacteria* (26,5% em drenagem e 19% em solo). Em geral, a abundância relativa dos diferentes filos foi mais bem distribuída nas amostras de solo, mostrando maior equilíbrio entre as populações bacterianas nessas amostras, diferente dos resultados encontrados nas amostras de drenagem



**Figura 3.** Abundância relativa dos filós bacterianos nas amostras de drenagem. Outros: *Armatimonadetes*, *BRC1*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *OD1*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Verrucomicrobia*, TM6, TM7, WPS-2, WS3 e bactérias não classificadas.



**Figura 4.** Abundância relativa dos filós bacterianos nas amostras de solo. Outros: *Acidobacteria*, AD3, *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, GAL15, *Nitrospirae*, OD1, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, TM6, TM7, WPS-2, WS3, WYO e bactérias não classificadas.

A análise da composição microbiana revelou que a comunidade de bactérias nas amostras de drenagem foi dominada por apenas dois filos (*Proteobacteria* e *Deinococcus/Thermus*), que corresponderam a 50% da diversidade total. A comunidade microbiana das amostras de solo apresentaram mais filos com abundâncias relativas semelhantes. Em áreas contaminadas com metais pesados, tem-se observado que a abundância de bactérias tolerantes aumenta, enquanto que a dos organismos mais sensíveis diminui (Kunito *et al.*, 1999). Portanto, o teor mais elevado de metais, tais como cobre, níquel e zinco nas amostras de drenagem, poderia ter atuado para selecionar as bactérias resistentes que dominaram esse ambiente.

*Proteobacteria* foi o filo com a maior abundância relativa nas amostras de drenagem e solo. *Proteobacteria* é reportado como o filo predominante em muitos ambientes de minas, incluindo sedimentos de mina de arsênio (Halter *et al.*, 2011) e sedimentos de rios de mina de ouro (Reis *et al.*, 2013). Este filo exibe um estilo de vida complexo e pode degradar uma variedade de moléculas orgânicas complexas, permitindo a sua adaptação a vários ambientes diferentes (Bouskill *et al.*, 2010).

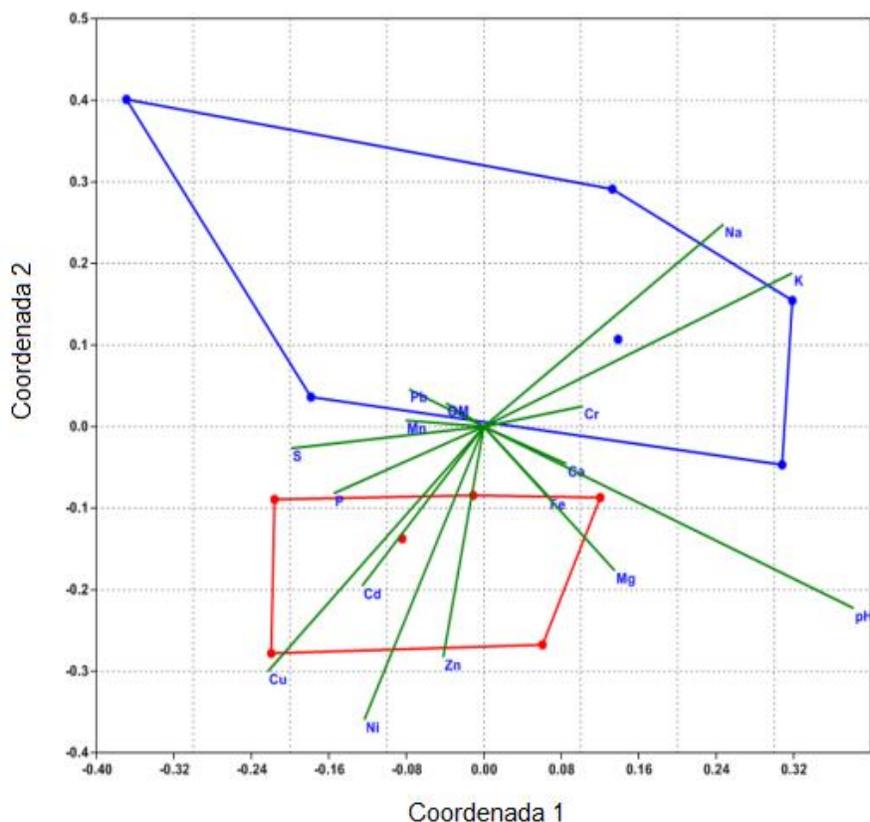
Os resultados obtidos sugerem que a composição bacteriana dos ambientes de drenagem de mina e solo é diferente.

### **Análise da diversidade**

A análise das similaridades (ANOSIM), que considerou a distribuição das OTUs, revelou diferenças significativas entre as comunidades bacterianas de drenagem e de solo ( $p = 0,0087$ ). Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando as amostras de drenagem foram comparadas entre si ( $p = 1$ ), e o mesmo foi observado para as amostras de solo ( $p = 1$ ).

A análise de n-MDS (figura 5) foi realizada para o grupo de amostras considerando os parâmetros químicos e as frequências das OTUs. Os resultados indicaram uma clara separação entre as amostras de drenagem e solo. As amostras de solo apresentaram maior dispersão, sugerindo maior heterogeneidade, e as concentrações de sódio e potássio foram os parâmetros químicos que mais contribuíram para a separação. As amostras de drenagem mostraram uma distribuição

mais homogênea e foram relacionadas com as quantidades de cobre, cádmio, níquel e zinco. Estes resultados estão de acordo com a análise estatística (teste *t* de Student) que mostra que os valores dos parâmetros químicos analisados foram diferentes para os dois ambientes. As análises de ANOSIM e n-MDS indicaram que a estrutura da comunidade bacteriana mudou quando o ambiente foi diretamente impactado pela drenagem de mina.



**Figura 5.** Escalonamento multidimensional não métrico usando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. As amostras de drenagem estão em vermelho, as amostras de solo estão em azul e os parâmetros químicos são indicados pelos vetores verdes. O valor do estresse é 0,095.

O teste *t* de Student aplicado aos índices de diversidade revelou que, considerando-se todas as amostras, não houve diferenças significativas entre a

drenagem e o solo em termos de diversidade ( $p = 0,210$ , índice de Shannon) e dominância ( $p = 0,26$ , índice de Berger- Parker,  $p = 0,25$ , índice de Simpson). A tabela 5 mostra os valores dos índices de diversidade para cada amostra.

**Tabela 5.** Índices de diversidade de Shannon, Simpson e Berger-Parker das amostras de drenagem e solo. Valores maiores em Shannon e valores próximos à um em Simpson indicam maior diversidade. Valores próximos a um em Berger-Parker indicam maior dominância.

<b>Amostra</b>	<b>Shannon (H)</b>	<b>Simpson (1-D)</b>	<b>Berger-Parker</b>
D1	5,38	0,9836	0,0814
D2	1,956	0,5592	0,658
D3	3,716	0,9087	0,261
D4	4,061	0,9159	0,255
D5	5,651	0,9904	0,038
D6	5,376	0,9837	0,091
S1	4,115	0,9542	0,174
S2	4,558	0,9505	0,181
S3	4,867	0,9604	0,172
S4	6,6	0,9965	0,024
S5	5,447	0,9868	0,085
S6	6,163	0,9942	0,042

Dessa forma, as comunidades de drenagem e solo não diferem em termos de diversidade de espécies. De acordo com Kandeler *et al.* (2000), o enriquecimento do solo com metais pesados reduz a biomassa e a atividade das bactérias, tendo, portanto, um impacto negativo na microbiota. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que após um século da exposição à drenagem, a comunidade microbiana tende a estabilizar e aumentar a sua diversidade, resultando em um ambiente com uma

diversidade microbiana semelhante à das zonas não impactadas (Bouskill *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2013). A mina do Sossego está em operação há 16 anos e a contaminação do solo é considerada relativamente recente. Portanto, esperava-se que a diversidade fosse inferior nos locais de drenagem, porque apenas alguns grupos de bactérias seriam resistentes às condições extremas deste ambiente. Por outro lado, tem sido sugerida que, enquanto a exposição aguda tem uma influência negativa sobre a diversidade bacteriana, em ambientes contaminados cronicamente, a proliferação de bactérias resistentes pode aumentar a diversidade (Roesch *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2013). Esta situação é comum em minas, como ocorre na mina do Sossego, onde a drenagem flui constantemente do depósito de minério. Além disso, concentrações elevadas de nutrientes podem aumentar a diversidade em sedimentos contaminados com metais pesados (Zhou *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2013). Na mina do Sossego, a drenagem flui sobre o solo até uma área de deságue, a qual está localizada a cerca de 700 m do depósito de minério, e a vegetação nesta área proporciona elevados níveis de matéria orgânica. O teor de nutrientes natural deste solo pode, portanto, desempenhar um papel fundamental na promoção da diversidade bacteriana.

Uma vez constatada uma diferença na composição e estrutura da comunidade microbiana entre os ambientes estudados, a análise de SIMPER foi usada para mostrar quais as OTUs que mais contribuíram para essa diferença. As cinco principais OTUs responsáveis pela diferença observada são mostradas na tabela 6.

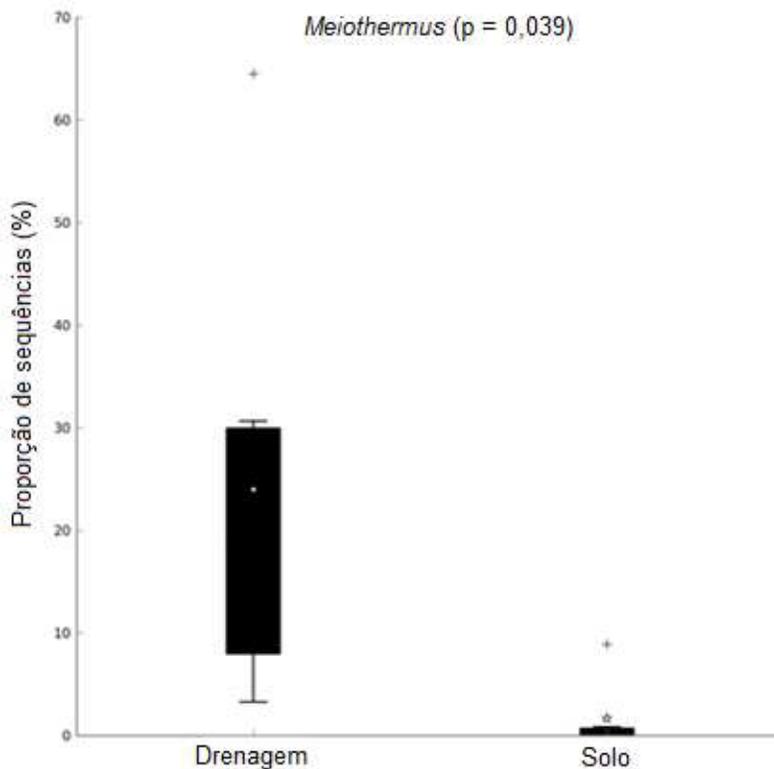
A OTU que mais contribuiu para as diferenças entre as comunidades de solo e de drenagem foi a 824 (12,7% da dissimilaridade total), pertencente ao gênero *Meiothermus*, que foi muito abundante nas amostras de drenagem. As OTUs 3607 e 4974 foram classificadas como *Gemmatimonas* e foram mais abundantes nas amostras de solo. Juntas, estas OTUs representaram 4,43% da diferença observada entre solo e drenagem. A OTU 1366 foi identificada como *Acidobacteria*, um filo contendo gêneros comumente encontrados no solo e na drenagem (Johnson, 2011). A OTU 303 foi classificada como *Bacteria* e apresentou 95% de identidade com as bactérias de solo.

**Tabela 6.** Principais OTUs responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras de drenagem e solo.

<b>OTU</b>	<b>Contribuição dissimilaridade (%)</b>	<b>Abundância Drenagem (%)</b>	<b>Abundância Solo (%)</b>	<b>RDP classifier [bootstrap]</b>
824	12,7	23,3	1,09	<i>Meiothermus</i> [99%]
3607	2,69	2,5	3,31	<i>Gemmatimonas</i> [99%]
303	1,8	0,19	3,11	<i>Bacteria</i> [100%]
1366	1,78	3,45	0,37	<i>Acidobacteria</i> [100%]
4974	1,74	0,012	3,06	<i>Gemmatimonas</i> [89%]

A maior contribuição da OTU 824 é particularmente interessante, uma vez que essa OTU foi dominante em todas as amostras de drenagem. Estes resultados revelam que a presença da drenagem de mina teve uma influência positiva na abundância dessa OTU no ambiente. A temperatura ótima de crescimento do gênero *Meiothermus* fica entre 50 e 65°C, o pH ótimo é 8,0, e essas bactérias são normalmente encontradas em ambientes quentes e pobres em nutrientes, como fontes geotermiais e áreas com influência antropogênica (Masurat *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2012; Mackenzie *et al.*, 2013). Outros pesquisadores têm relatado o filo *Deinococcus/Thermus* (onde está inserido o gênero *Meiothermus*), em menor proporção em relação a este trabalho, em sedimentos fluviais afetados por uma mina de arsênico (Halter *et al.*, 2011) bem como em drenagem ácida de mina (Kuang *et al.*, 2012). Esta é a primeira vez que este gênero foi encontrado em grande abundância em ambientes de drenagens de mina. A figura 6 mostra a proporção das sequências afiliadas como *Meiothermus* nos ambientes de drenagem e solo. É possível observar que este grupo de bactérias foi favorecido com a passagem da drenagem no solo, uma vez que sua abundância foi muito maior

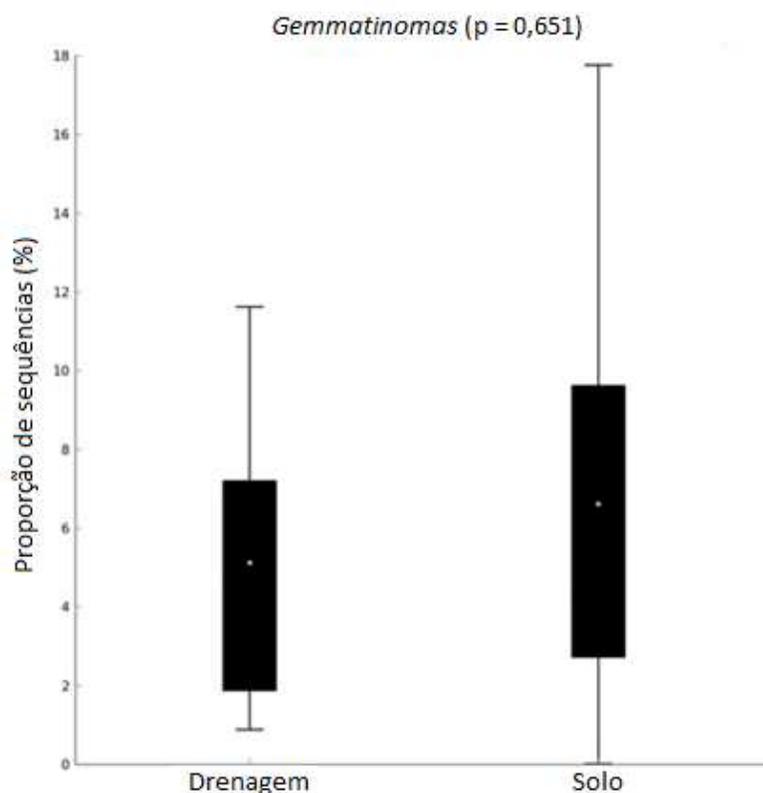
nessas condições. Isso sugere uma ampla capacidade de adaptação das espécies do gênero *Meiothermus*.



**Figura 6.** Gráfico *box-plot* da abundância de sequências afiliadas com *Meiothermus* sp. em amostras de drenagem e solo. Como mostra a figura, houve uma diferença significativa na abundância do gênero *Meiothermus* entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

As OTUs 3607 e 4974 foram classificadas como *Gemmatimonas* e foram mais frequentemente encontradas nas amostras de solo. O gênero *Gemmatimonas* tem sido relatado em estudos de diversidade em ambientes contaminados ou não com drenagem de mina. Mendez *et al.* (2008) utilizaram bibliotecas de rDNA 16S para estudar a composição bacteriana da mina Klondyke nos EUA. *Gemmatimonadetes* só foi encontrada em amostras não contaminadas, com pH em torno de 8,0. Reis *et al.* (2013) estudaram sedimentos afetados por metais pesados de áreas de mineração no Brasil e constatou que o filo *Gemmatimonadetes* só estava presente em ambientes

contaminados. Por conseguinte, é possível que estas bactérias estivessem amplamente presentes no solo na mina do Sossego e resistiram ao impacto da drenagem, embora a sua abundância diminuísse ligeiramente devido à prevalência de outras bactérias mais resistentes aos metais pesados (figura 7).

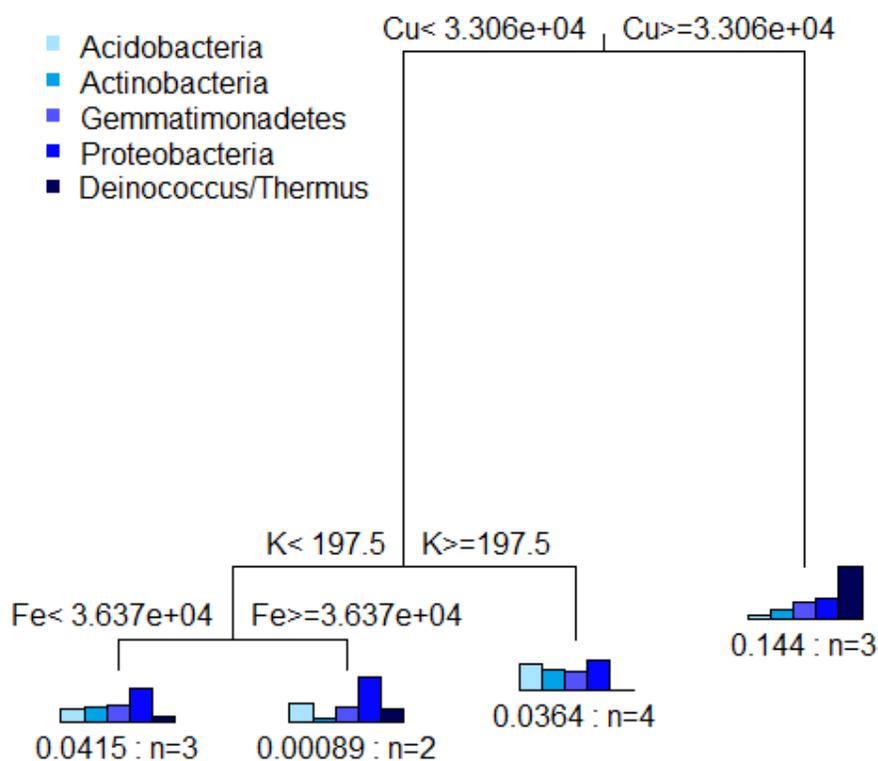


**Figura 7.** Gráfico *box-plot* da abundância de seqüências afiliadas com *Gemmatimonas* *sp.* em amostras de solo e drenagem. Como mostra a figura, não houve uma diferença significativa na abundância do gênero *Gemmatimonas* entre as amostras ( $p > 0,05$ ).

A OTU 1366 foi identificada como *Acidobacteria*, um filo que inclui gêneros usualmente encontrados em ambientes de solo e drenagem. Essas bactérias são encontradas em grande abundância em estudos de diversidade por métodos independentes de cultivo e pouco se sabe a respeito de sua importância ecológica (Männistö *et al.*, 2013; Steven *et al.*, 2013). A OTU 303 foi identificada apenas como *Bacteria* que apresenta 95% de identidade com uma bactéria encontrada em solo.

## Influência dos parâmetros químicos na composição e diversidade microbiana

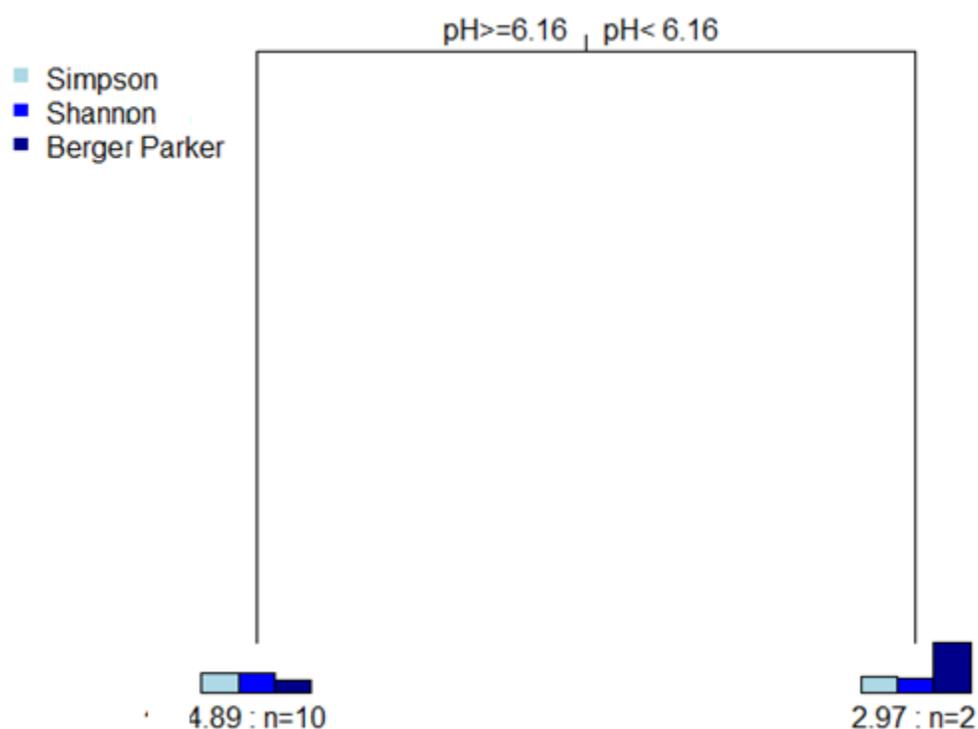
A análise MRT foi realizada para associar os parâmetros químicos tanto com a abundância relativa dos principais filos encontrados, quanto com os índices de diversidade normalizados. Na análise da distribuição dos filos dominantes, os parâmetros químicos geraram uma árvore com três separações baseadas em cobre, potássio e ferro (figura 8). A árvore explicou 70% da variação da abundância relativa dos filos. Nesta árvore, o cobre foi responsável pela primeira divisão, e parece ser um forte preditor neste ambiente, uma vez que explicou 58,4% da variância. *Deinococcus/Thermus* foi o filo mais abundante nas amostras que apresentam um teor elevado de cobre, enquanto que os outros filos eram menos abundantes.



**Figura 8.** Árvore de regressão multivariada da relação entre a abundância relativa dos filos dominantes e os parâmetros químicos. Os gráficos de barras mostram a abundância relativa média de cada filo nos nós terminais. Os números sob as parcelas de barras indicam o erro e o número de amostras (n) dentro de cada grupo. Erro: 0.299.

A segunda e terceira divisão foram determinadas por potássio (8,2% da variância) e ferro (3,5 % da variância), respectivamente. *Proteobacteria* foi abundante nas amostras que continham uma pequena quantidade de potássio e eram mais ricas em ferro. Em contraste, *Acidobacteria* e *Actinobacteria* foram predominantes em amostras que continham quantidades mais elevadas de potássio e *Actinobacteria* diminuiu quando a quantidade de ferro aumentou. *Gemmatimonadetes* mostrou uma distribuição homogênea ao longo da árvore (figura 8).

A árvore para os índices de diversidade padronizados (figura 9) mostrou uma divisão determinada pelo pH. Esta árvore explicou 58,1 % da variância.

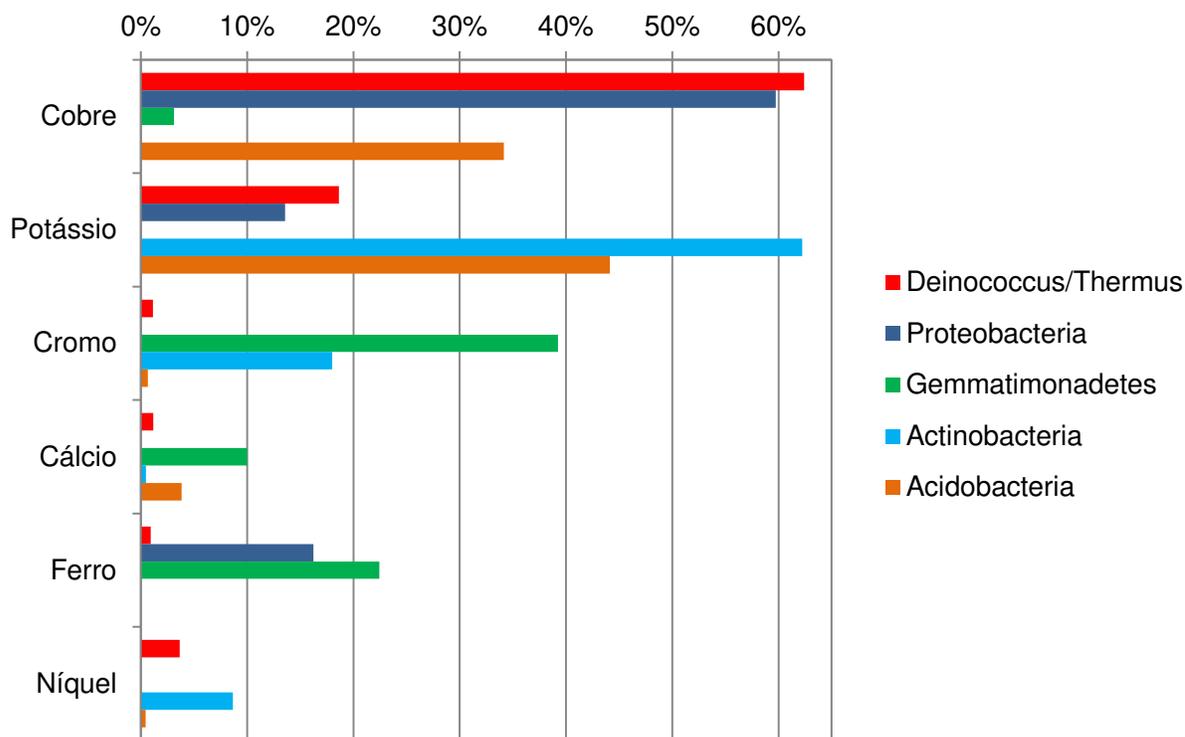


**Figura 9.** Árvore de regressão multivariada da relação entre os índices de diversidade normalizados e os parâmetros químicos. Os gráficos de barras mostram a média dos índices de diversidade nos nós terminais. Os números sob as parcelas de barras indicam o erro e o número de amostras (n) dentro de cada grupo. Erro: 0.744.

Como mostra a divisão, o índice de Berger-Parker diminuiu em pH acima de 6,16, enquanto os índices de Shannon e Simpson (1-D) apresentaram valores mais elevados, sugerindo menor dominância e maior diversidade de espécies em ambientes alcalinos. Esses dados sugerem que, de forma geral, a comunidade bacteriana da mina do Sossego está adaptada às condições neutras/alcalinas.

Os modelos ABT mostraram a importância relativa dos parâmetros químicos sobre a abundância relativa dos filos dominantes (figura 10). Em geral, a análise indicou que o cobre e o potássio exerceram uma forte influência sobre estes filos. O cobre foi a principal influência sobre *Proteobacteria* (59,74%) e *Deinococcus/Thermus* (62,42%) e uma influência intermediária sobre *Acidobacteria* (34,16%) e *Gemmatimonadetes* (3,12%). Este metal não mostrou a influência sobre *Actinobacteria*.

O potássio foi a principal influência sobre a distribuição das populações de *Acidobacteria* (44,14%) e *Actinobacteria* (62,24%) e mostrou uma influência intermediária sobre *Proteobacteria* (13,58%) e *Deinococcus/Thermus* (18,65%). Estes resultados apoiaram os resultados obtidos com a análise MRT, mostrando a importância dos parâmetros químicos na formação das comunidades microbianas nos ambientes de mina. Cromo, cálcio, ferro e níquel também foram parâmetros importantes que influenciaram a distribuição dos filos principais.



**Figura 10.** Análise de ABT mostrando a influência relativa dos principais parâmetros químicos sobre os filamentos dominantes na mina do Sossego.

A análise de correlação de Spearman (tabela 7) revelou uma relação ligeiramente positiva entre *Acidobacteria* e *Actinobacteria/Proteobacteria* ( $r = 0,69$ ). *Gemmatimonadetes* apresentou correlações significativas com cádmio, cromo, e enxofre, enquanto *Proteobacteria* foi negativamente correlacionada com cálcio e pH. O filo *Deinococcus/Thermus* apresentou forte correlação positiva com cobre e zinco e foi ligeiramente correlacionado positivamente com enxofre, fósforo e níquel, reforçando os resultados anteriores para as relações entre os dados químicos e biológicos.

**Tabela 7.** Correlação de Spearman entre os parâmetros químicos e a abundância relativa dos principais filos encontrados nas amostras de drenagem e solo.

<b>Parâmetros Químicos</b>	<b><i>Acidobacteria</i></b>	<b><i>Actinobacteria</i></b>	<b><i>Gemmatimonadetes</i></b>	<b><i>Proteobacteria</i></b>	<b><i>Deinococcus/Thermus</i></b>
Cádmio	0,18	0,09	0,61*	0,52	0,46
Cálcio	-0,34	-0,48	0,11	-0,64*	-0,04
Chumbo	0,31	0,19	0,45	0,57	0,28
Cobre	-0,34	-0,24	0,37	0,16	0,85*
Cromo	0,45	0,45	0,73*	0,35	0,02
Enxofre	-0,04	0,17	0,76*	0,15	0,62*
Ferro	0,22	0,13	0,56	0,36	0,08
Fósforo	-0,31	-0,11	0,51	-0,01	0,67*
Magnésio	-0,2	-0,17	0,25	-0,26	0,11
Manganês	-0,26	-0,22	0,22	0,06	0,25
Níquel	0,15	0,02	0,41	0,11	0,67*
Potássio	0,45	0,44	-0,14	-0,3	-0,74*
Sódio	0,5	0,51	-0,07	-0,17	-0,59*
Zinco	-0,25	-0,35	-0,08	-0,67*	0,7*
pH	-0,18	-0,05	0,55	0,27	-0,44
MO	-0,1	0,06	0,4	0,08	0,39

\*Significância estatística a 5%

As análises MRT, ABT e correlação de Spearman revelaram uma grande influência do cobre na comunidade bacteriana da mina do Sossego. Embora o pH neutro diminua o cobre disponível, a sua presença pode interferir na população microbiana. Kunito *et al.* (1999) avaliaram a influência das diferentes formas de cobre sobre a comunidade de micro-organismos do solo, e não encontraram nenhuma correlação significativa entre o cobre total e a tolerância das bactérias. No entanto, em solos alcalinos uma pequena (mas importante) proporção de cobre (cerca de 4% do total de cobre) pode permanecer adsorvido em partículas de solo e/ou associados com a matéria orgânica. A fração de cobre associada à matéria orgânica é parcialmente solúvel e pode ter um impacto negativo sobre a comunidade bacteriana. Além disso, as frações solúveis e adsorvidas de cobre estão em equilíbrio, ou seja, enquanto o cobre solúvel reflete a toxicidade do solo, o cobre adsorvido reflete a capacidade de toxicidade, porque é a fonte de cobre solúvel. Em solos com um elevado teor de metais pesados, os quais competem por locais de adsorção, o cobre é o cátion com maior probabilidade de ser retido por matéria orgânica, argila e óxidos. Este processo de competição ocorre principalmente em solos onde existem grandes quantidades de calcário, uma vez que este elemento aumenta a capacidade de absorção do solo (Jalali & Moradi, 2013). Dessa forma, o cobre foi capaz de influenciar a estrutura e a composição da comunidade bacteriana da mina do Sossego, uma vez que o solo foi exposto a diferentes condições de precipitação, estado redox e calagem.

O efeito mais interessante do cobre foi observado para o filo *Deinococcus/Thermus*, que mostrou uma forte correlação positiva com este metal, bem como com outros metais, como o zinco e o níquel (ver coeficientes de correlação de Spearman). Este filo inclui gêneros como *Deinococcus*, *Meiothermus*, *Thermus* e *Trupera*, que são conhecidos por sua resistência a condições extremas (radiação, estresse oxidativo, alta temperatura e dessecação) (Costa *et al.*, 2006; Tian & Hua, 2010). Apesar de terem uma capacidade de adaptação ampla, pouco se sabe sobre a sobrevivência dessas bactérias na presença de altos níveis de metais pesados, pois, até o momento, este filo só tinha sido detectado em baixa abundância em ambientes de mina. A importância ecológica de *Deinococcus/Thermus* ainda vem sendo estudada

devido a falta de representantes cultiváveis e, sua presença em ambientes de mina poderia proporcionar novas oportunidades para o estudo da resistência a metais nesses microrganismos.

Outro fator importante que influenciou a composição bacteriana na mina do Sossego foi a concentração de potássio. Potássio e sódio estavam presentes em níveis elevados nas amostras de solo e foram correlacionados ( $r = 0,94$ ) entre si. Ambos os elementos podem ter tido sua solubilidade e disponibilidade influenciados pelas bactérias da rizosfera das plantas que estavam presentes na maioria das amostras de solo. Essas bactérias são capazes de produzir diversas substâncias como oxalato, lactato, gluconato, citrato, entre outros, e utilizar diversos mecanismos (acidólise, quelatção e oxidoredução) para solubilizar nutrientes incluindo o potássio a partir de minerais, o que explica sua forte correlação com esse nutriente (Marschner & Rengel, 2007; Uroz *et al.*, 2009; Miransari, 2013).

A análise MRT revelou alta diversidade bacteriana em amostras com pH elevado. Uma vez que a exposição ao calcário foi elevada nesses ambientes, a comunidade de bactérias do solo e drenagem pode ter se adaptado às condições neutras/alcalinas, o que explicaria a maior abundância de gêneros geralmente associados com um pH elevado, tais como *Gemmatimonas* e *Meiothermus*.

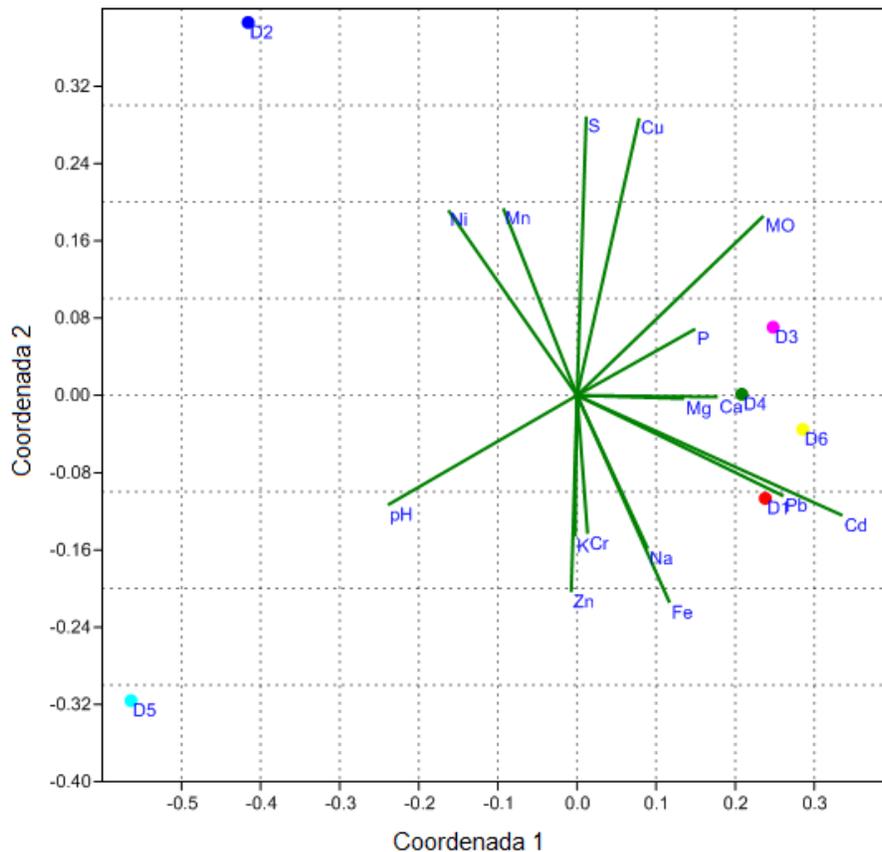
Verificou-se, portanto, que o impacto crônico da drenagem neutra de mina no solo mudou a composição e estrutura da comunidade bacteriana, mas não afetou a diversidade. Os altos índices de diversidade encontrados nas amostras de solo e drenagem são devido à exposição constante aos metais pesados, bem como a elevada disponibilidade de matéria orgânica que pode estar promovendo o crescimento de uma comunidade microbiana adaptada a essas condições.

De modo geral, os resultados obtidos sugerem que os metais pesados e os nutrientes (potássio e sódio) presentes nas amostras analisadas foram os parâmetros químicos responsáveis pelas diferenças observadas na composição da comunidade microbiana de solo e de drenagem. O filo *Deinococcus/Thermus* foi fortemente afetado por metais pesados (especialmente cobre), e o gênero *Meiothermus* foi dominante nas comunidades de drenagem.

## A comunidade da drenagem

As principais características da comunidade de bactérias associada à drenagem de mina foram analisadas para obter uma melhor compreensão sobre o comportamento da microbiota ao longo do canal de escoamento da drenagem.

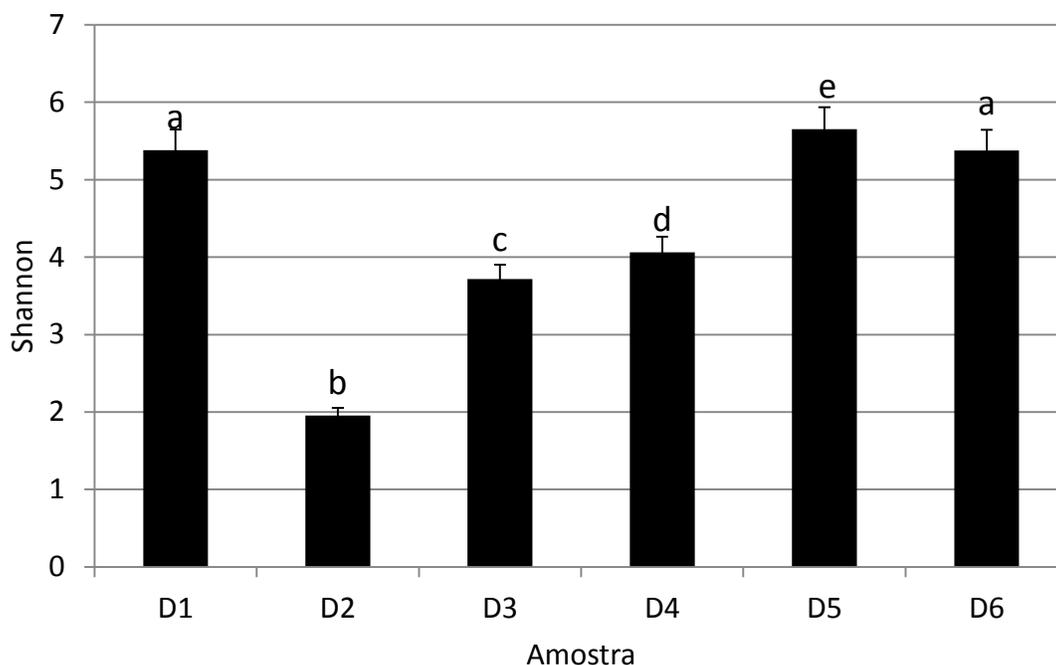
A análise de escalonamento multidimensional não métrico (figura 11) revelou uma maior semelhança entre as amostras D1, D3, D4 e D6. A amostra D2 foi separada das demais devido a menor quantidade dos metais cádmio e chumbo e maior quantidade de níquel, além de ter uma comunidade com níveis altos de dominância (alto índice de Berger-Parker). Essa amostra apresentou 12 OTUs únicas e outras 97 cuja frequência nas demais amostras era extremamente baixa (menor que 0,01).



**Figura 11.** Escalonamento multidimensional não métrico de similaridade Bray-Curtis entre as amostras de drenagem com base na distribuição da OTUs e nos parâmetros químicos. O valor do estresse é 0,0

A amostra D5, por sua vez, quando foi comparada com as demais amostras de drenagem, se diferenciou devido ao seu maior valor de pH e teores menores de matéria orgânica, além de uma baixa dominância de espécies. Essa amostra apresentou 103 OTUs únicas.

A figura 12 mostra a variação do índice de Shannon ao longo do canal de escoamento da drenagem. Com base no gráfico é possível notar que a diversidade cai bruscamente da amostra D1 (pé da pilha) para a amostra D2 e aumenta à medida que se afasta da amostra D2, recuperando o valor inicial de riqueza na última amostra. A distribuição do índice de diversidade sugere uma variação da comunidade ao longo do escoamento da drenagem no solo.

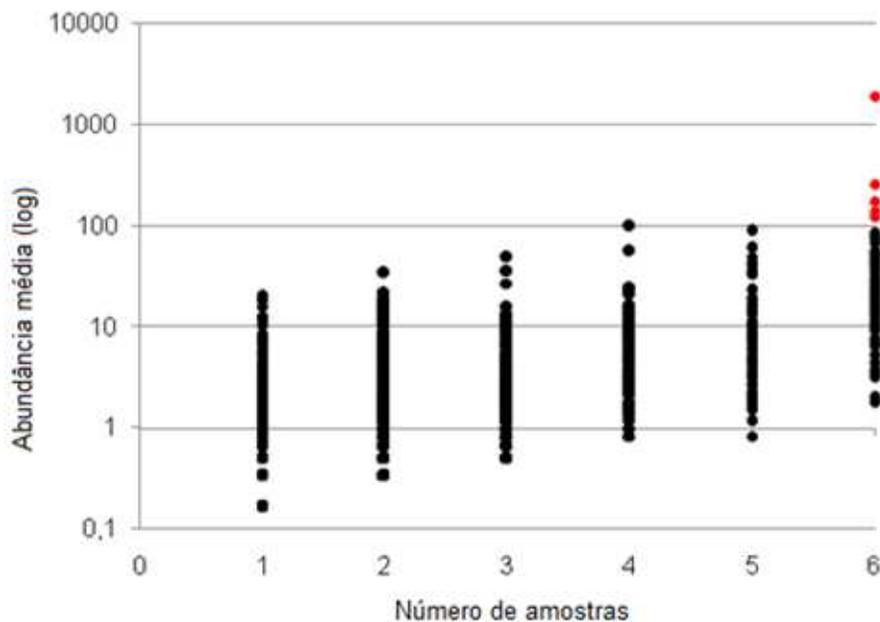


**Figura 12.** Índice de diversidade de Shannon das amostras de drenagem. Diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% são indicadas pelas letras nas barras do gráfico.

As diferenças entre a estrutura e a diversidade microbiana das amostras de drenagem, portanto, variam de acordo com a composição química única de cada amostra, sem levar em conta a distância entre elas, uma vez que amostras próximas ou adjacentes não tiveram, obrigatoriamente, composições microbianas similares. Os dados corroboram os estudos de Kuang *et al.* (2012) que avaliaram a diversidade bacteriana de 59 amostras de solo de 14 minas chinesas diferentes e observaram que a variação de parâmetros como pH e salinidade contribuiu mais para a diferenciação das amostras do que a distância geográfica.

Em estudos de ecologia é possível dividir os taxa em generalistas e especialistas. Uma OTU generalista é amplamente distribuída nos habitats de um determinado ecossistema, pois possui um metabolismo flexível capaz de utilizar diversos substratos diferentes, um de cada vez, ou simultaneamente. Uma comunidade dominada por estratégias generalistas sugere menos competição interespecífica por recursos, permitindo que muitos taxa utilizem os mesmos recursos. Uma OTU especialista, ao contrário, é restrita a certos habitats, onde é encontrada em grande abundância. Uma comunidade dominada por estratégias especialistas apresenta um alto nível de competição interespecífica por recursos, resultando no desenvolvimento de mecanismos metabólicos para evitar competição entre as espécies (Mihuc, 1997; Barberán *et al.*, 2012). Dessa forma, a identificação de OTUs generalistas e especialistas em um determinado ambiente pode revelar características relevantes sobre a estrutura e o comportamento das comunidades bacterianas.

Para a determinação de taxa generalistas e especialistas da comunidade de drenagem, a abundância e o número de amostras onde cada OTU foi encontrada foram analisadas (figura 13).



**Figura 13.** Gráfico da ocupação e abundância de OTUs nas amostras de drenagem. OTU generalista, definida por estar presente em todas as amostras e em alta abundância, é mostrada em vermelho.

Com base no gráfico da figura 13, é possível observar que, no ambiente de drenagem neutra, não foram encontradas OTUs especialistas e, cinco OTUs foram consideradas generalistas. As OTUs generalistas foram a 824 (*Meiothermus*), 1366 (*Acidobacteria*), 4351 (*Bacteroidetes*), 205 e 3607 (*Gemmatimonas*). A OTU 824 foi o taxon com a maior abundância relativa em todas as amostras de drenagem, e foi responsável pelo índice de dominância neste ambiente (índice de Berger-Parker). Esses resultados corroboram os resultados obtidos pela análise de SIMPER e do gráfico da abundância de sequências os quais indicaram que esse gênero foi favorecido pela passagem da drenagem no solo. Nenhuma OTU se destacou como especialista, portanto esse ambiente deve ter poucos nichos a serem ocupados ou pouca competição interespecífica por recursos na comunidade.

Um total de 60 OTUs foi encontrado em todas as amostras ao longo da drenagem e, assim sendo, essas OTUs foram consideradas neste trabalho a microbiota núcleo desse ambiente. A tabela 8 mostra essas OTUs e sua classificação no RDP.

**Tabela 8.** OTUs presentes em todas as amostras de drenagem e sua classificação taxonômica do banco de dados RDP.

<b>OTU</b>	<b>RDP classifier [bootstrap]</b>	<b>OTU</b>	<b>RDP classifier [bootstrap]</b>
58	<i>Rhodospirillaceae</i> [92%]	3089	<i>Chloroflexi</i> [95%]
76	<i>Alphaproteobacteria</i> [96%]	3100	<i>Acidobacteria_Gp4</i> [100%]
104	<i>Rhizobiales</i> [100%]	3113	<i>Phenylobacterium</i> [100%]
205	<i>Gemmatimonas</i> [100%]	3357	<i>Sphingomonas</i> [89%]
310	<i>Betaproteobacteria</i> [97%]	3607	<i>Gemmatimonas</i> [95%]
410	<i>Porphyrobacter</i> [99%]	3730	<i>Acidobacteria_Gp16</i> [100%]
442	<i>Bacteria</i> [100%]	3824	<i>Rhizobiales</i> [100%]
631	<i>Actinomycetales</i> [87%]	3837	<i>Acidobacteria_Gp6</i> [100%]
824	<i>Meiothermus</i> [98%]	3843	<i>Acidimicrobinae</i> [93%]
840	<i>Ohtaekwangia</i> [95%]	3988	<i>Rhodobacteraceae</i> [100%]
1007	<i>Acidobacteria_Gp4</i> [100%]	4079	<i>Novosphingobium</i> [100%]
1306	<i>Meiothermus</i> [96%]	4096	<i>Acidobacteria_Gp16</i> [100%]
1366	<i>Acidobacteria_Gp16</i> [100%]	4351	<i>Ohtaekwangia</i> [88%]
1464	<i>Alphaproteobacteria</i> [98%]	4388	<i>Mycobacterium</i> [100%]
1716	<i>Bacteria</i> [97%]	4461	<i>Meiothermus</i> [99%]
1900	<i>Bacteria</i> [100%]	4798	<i>Flavisolibacter</i> [97%]
1950	<i>Geodermatophilaceae</i> [94%]	4863	<i>Meiothermus</i> [100%]
2035	<i>Nannocystineae</i> [100%]	4873	<i>Meiothermus</i> [100%]
2109	<i>Novosphingobium</i> [82%]	4923	<i>Flavisolibacter</i> [100%]
2143	<i>Betaproteobacteria</i> [100%]	5002	<i>Bacteria</i> [100%]
2203	<i>Acidobacteria_Gp13</i> [100%]	5002	<i>Betaproteobacteria</i> [99%]
2237	<i>Sphingomonadales</i> [100%]	5118	<i>Rhodobacteraceae</i> [100%]
2253	<i>Rhodobacteraceae</i> [100%]	5295	<i>Microbacteriaceae</i> [100%]
2257	<i>Betaproteobacteria</i> [97%]	5400	<i>Betaproteobacteria</i> [100%]
2446	<i>Thermaceae</i> [77%]	5415	<i>Rhodobacteraceae</i> [99%]
2582	<i>Rhizobiales</i> [99%]	5436	<i>Microbacteriaceae</i> [100%]
2774	<i>Rhodocyclaceae</i> [95%]	5577	<i>Rhodocyclaceae</i> [90%]
3004	<i>Actinobacteria</i> [97%]	5699	<i>Acetobacteraceae</i> [96%]
3047	<i>Bacteria</i> [100%]	5742	<i>Acetobacteraceae</i> [100%]
3072	<i>Bradyrhizobium</i> [100%]	5874	<i>Rhizobiales</i> [100%]

A microbiota núcleo pode ser definida como um grupo de micro-organismos comuns a dois ou mais habitats (Turnbaugh *et al.*, 2007; Hamady & Knight, 2009). A identificação da microbiota núcleo de um dado ambiente pode ser essencial para o estudo de ecologia, pois a ocorrência dos mesmos organismos em todas as amostras de um determinado ambiente sugere que estes desempenhem papel crucial na manutenção dessa comunidade. O estudo da microbiota núcleo pode, ainda, ajudar a prever a resposta da comunidade microbiana às perturbações ambientais (Shade & Handelsman, 2012). Por esse motivo, a microbiota núcleo da comunidade de drenagem foi detalhada a seguir.

Os grupos bacterianos mais abundantes na microbiota núcleo da drenagem foram *Meiothermus* e *Gemmatimonas*. *Meiothermus* e sequências relacionadas à família *Thermaceae* apresentaram seis OTUs as quais foram responsáveis por 48,6% das sequências encontradas nessa comunidade núcleo. *Gemmatimonas* apresentaram duas OTUs e foram responsáveis por 7,9% das sequências encontradas em todas as amostras.

Foram identificadas cinco OTUs da ordem *Rhizobiales*, sendo uma OTU classificada como pertencente ao gênero *Bradyrhizobium*. A ordem *Rhizobiales* constitui um grupo heterogêneo formado por bactérias patogênicas de plantas e animais, endossimbiontes de plantas, oxidantes de metano e, principalmente, um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio. O gênero *Bradyrhizobium* contém bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico quando estão em forma de nódulos associados a raízes de plantas e são comumente tolerantes a metais pesados (Jordan, 1982; Garrity & Holt, 2001; Sadowsky & Graham, 2006). Dessa forma, acredita-se que esse grupo de bactérias desempenhe um papel importante no ciclo do nitrogênio no ambiente de drenagem de mina.

Outras quatro OTUs pertenciam à família *Rhodobacteraceae* e uma ao gênero *Phenylobacterium*. A família *Rhodobacteraceae* pertence à classe das *Alphaproteobacterias* e contém muitas bactérias encontradas em ambientes marinhos, além de linhagens presentes em solos hipersalinos; portanto, suas espécies são comumente resistentes a altas concentrações de sal (Martínez-Checa *et al.*, 2005; Kim

*et al.*, 2010). O gênero *Phenylobacterium* é comumente encontrado em superfícies de solos (Lingens *et al.*, 1985; Oh & Roh, 2012), mas também há relatos desse gênero em lodo ativado de tratamento de águas residuais (Aslam *et al.*, 2005) e água subterrânea alcalina (Tiago *et al.*, 2005), entre outros locais. Esse gênero possui potencial biotecnológico por conter espécies capazes de utilizar compostos xenobióticos, por exemplo, os herbicidas (cloridazon e piramidon), como fonte de carbono (Eberspächer & Lingens, 2006).

Outro grupo bacteriano (cinco OTUs) presente em todo o canal de drenagem relacionado à ordem *Sphingomonadales*, incluindo os gêneros: *Sphingomonas*, *Porphyrobacter* e *Novosphingobium*. O gênero *Sphingomonas* é amplamente distribuído na natureza e possui potencial biotecnológico devido à capacidade de degradação de contaminantes refratários (éter difenílico e derivados e dibenzofurano, por exemplo) e secreção de exopolímeros de açúcar. É constantemente associado à corrosão de tubulações de cobre e biosorção desse metal (Schmidt *et al.*, 1992; Wittich *et al.*, 1992 White *et al.*, 1996). Vilchez *et al.* (2007) estudaram a eficiência de um biofilme em filtro para remoção de cobre em águas subterrâneas. A eficiência de remoção do metal chegou a 90% e o gênero *Sphingomonas* foi o organismo predominante nos biofilmes (78% das sequências analisadas).

Wang *et al.* (2010) investigaram a absorção de cobre pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis* e seu potencial para o tratamento de efluentes com altos teores de metais pesados. A bactéria apresentou absorção máxima de cobre de 50,1 mg/g de Cu(II) em pH 5 e 20°C. Além disso, Altimira *et al.* (2012) utilizaram pirosequenciamento para estudar a diversidade bacteriana de solos agrícolas contaminados por cobre no Chile. Foi relatado que o gênero *Sphingomonas* continha genes de resistência em plasmídeos e poderia contribuir para a distribuição desses genes na comunidade do solo. Portanto, é esperada a persistência de *Sphingomonas* em todas as amostras de drenagem cujos teores de cobre são altos.

*Porphyrobacter* é um gênero descrito por Fuerst *et al.* (1993) e recebeu esse nome devido a sua capacidade de produzir porfirina (uma  $\alpha$ -bacterioclorofila encontrada em bactérias fototróficas) e carotenóides. Alguns membros desse gênero são termófilos

(Hanada *et al.*, 1997; Rainey *et al.*, 2003) e capazes de degradar compostos aromáticos como bifenilo e dibenzofurano (Hiraishi *et al.*, 2002). *Novosphingobium* contém espécies capazes de metabolizar contaminantes químicos. Foram identificadas espécies capazes de degradar policlorofenol (Tirola *et al.*, 2002), compostos aromáticos (Liu *et al.*, 2005), oestradiol (Fujii *et al.*, 2003), entre outros. Além disso, Sangwan *et al.* (2012) encontraram uma grande abundância de *Novosphingobium* e *Sphingomonas* em solos contaminados com o pesticida hexaclorocicloexano. Dessa forma, as características descritas acima sugerem que este grupo de bactérias possui propriedades biotecnológicas promissoras.

A família *Rhodospirillaceae* (uma OTU), por sua vez, é composta por bactérias fototróficas produtoras de bacterioclorofila e capazes de fixar nitrogênio atmosférico (Trüper & Schleifer, 2006). Muitos dos membros dessa família têm sido reportados como resistentes a altas concentrações de sal (Jonkers & Abed, 2003; Choi *et al.*, 2009). A família *Acetobacteraceae* (duas OTUs) é caracterizada pela oxidação aeróbia de etanol e formação do ácido acético, enquanto que algumas espécies ainda são capazes de oxidar o ácido acético produzindo gás carbônico e água (Kersters *et al.*, 2006). Apesar de serem amplamente associados a indústrias de bebidas, alguns gêneros são normalmente encontrados em solos e estão relacionados, em alguns casos, com a fixação de nitrogênio (Saravanan *et al.*, 2008; Margesin & Zhang, 2013).

Na comunidade de drenagem também é possível encontrar sequências afiliadas à subordem *Nannocystineae* (uma OTU) a qual inclui gêneros encontrados em ambientes marinhos e de solo. Esse grupo pertence à ordem das mixobactérias, conhecidas pela produção de metabólitos secundários e por se alimentarem de células de outros micro-organismos (Shimkets & Woese, 1992; Shimkets *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2010).

A família *Rhodocyclaceae*, representada por duas OTUs, também dominou os ambientes de drenagem. Essa família tem sido reportada em diversos estudos de diversidade de solo contaminado com xenobióticos. Singleton *et al.* (2011) analisaram a diversidade bacteriana por pirosequenciamento do gene de rRNA 16S em biorreatores de tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Os

autores encontraram sequências relacionadas com a família *Rhodocyclaceae* degradadoras desses compostos. Martin *et al.* (2012) avaliaram a diversidade bacteriana em solo contaminado com fenantreno. Nesse trabalho, as *Betaproteobacteria*, incluindo aquelas pertencentes à família *Rhodocyclaceae*, foram predominantes e estavam relacionadas com a mineralização do fenantreno.

Outro filo presente na comunidade de drenagem foi *Acidobacteria* (sete OTUs). *Acidobacteria* tem sido encontrada em diversos ambientes como solo, sedimentos, águas termais, solos contaminados com metais pesados, entre outros, e possuem um metabolismo bastante diverso (Rappé & Giovannoni, 2003; Thrash & Coates, 2010). Esse filo é amplamente distribuído em solos, sendo detectados em grande quantidade em estudos de diversidade por técnicas moleculares (Männistö *et al.*, 2013; Steven *et al.*, 2013). No entanto pouco se conhece sobre as características fisiológicas e papel ecológico desse grupo de bactérias.

Outros grupos importantes foram as famílias *Microbacteriaceae* (duas OTUs) e *Geodermatophilaceae* (uma OTU) e o gênero *Mycobacterium* (uma OTU), todas do filo *Actinobacteria*. A família *Microbacteriaceae* possui um grande número de bactérias predominantemente Gram-positivas e aeróbias, presentes em diversos ambientes terrestres e aquáticos. A família *Geodermatophilaceae*, por sua vez, é um grupo ainda pouco explorado (Evtushenko & Takeuchi, 2006; Normand, 2006). *Mycobacterium* possui espécies frequentes em solos e são capazes de crescer na presença de diferentes fontes de carbono, inclusive hidrocarbonetos e compostos aromáticos. Micobactérias também são capazes de produzir dois tipos diferentes de sideróforos (exoquelins e micobactins) ainda pouco caracterizados e de interesse em processos de biolixiviação (Hartmans *et al.*, 2006).

Finalmente foram encontradas sequências identificadas como *Flavisolibacter* e *Ohtaekwangia*. *Flavisolibacter* são bactérias Gram-negativas, aeróbias e quimioheterotróficas cujos primeiros indivíduos foram isolados de solos agrícolas sul coreanos. Espécies desse gênero também foram isoladas de florestas tropicais (Yoon & Im, 2007; Zhang *et al.*, 2007). *Ohtaekwangia* é um gênero bacteriano descrito por Yoon

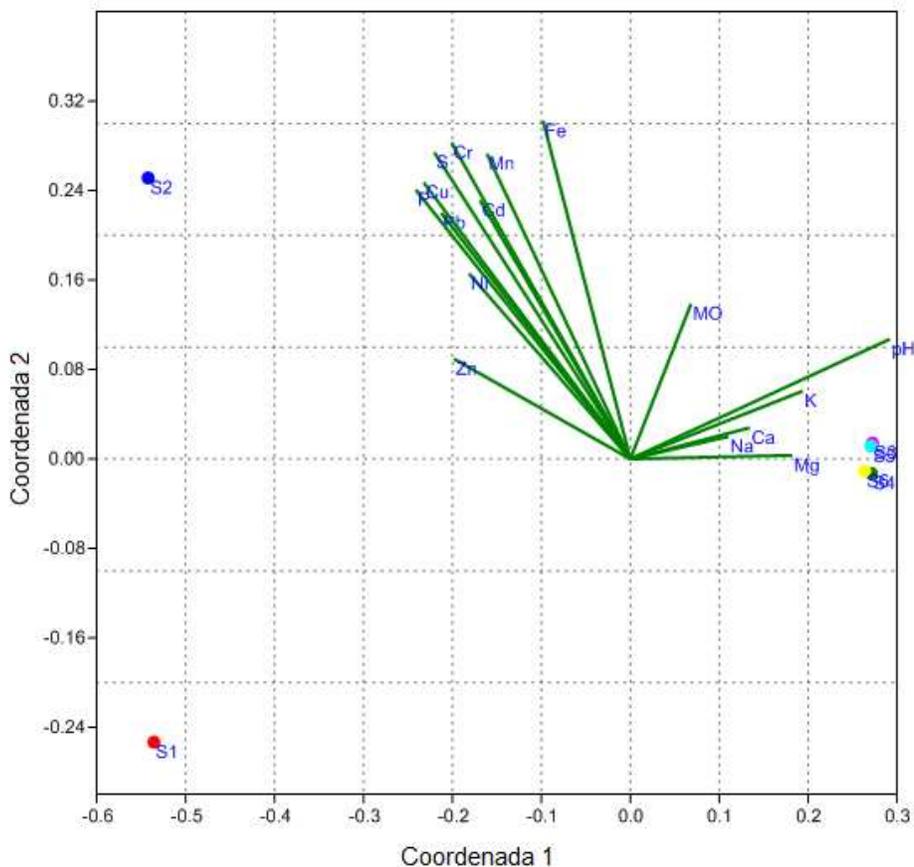
*et al.* (2011) de amostras de areia da Coréia do Sul e possui apenas duas espécies descritas. Portanto, pouco se conhece a respeito da sua ecologia e aplicabilidade.

Por meio da análise dos micro-organismos presentes na microbiota núcleo das amostras de drenagem de mina, conclui-se, de modo geral, que essa comunidade é basicamente formada por bactérias aeróbias, a maioria heterotróficas, com crescimento ótimo em pH neutro à alcalino, mesófilos e alguns termófilos com metabolismo variado. Muitas bactérias foram relacionadas à taxa com potenciais biotecnológicos para a degradação de compostos xenobióticos e outros ainda pouco explorados. A microbiota também apresentou resistência a metais pesados e alguns grupos são associados com resistência a altas concentrações de sal.

### **A comunidade do solo**

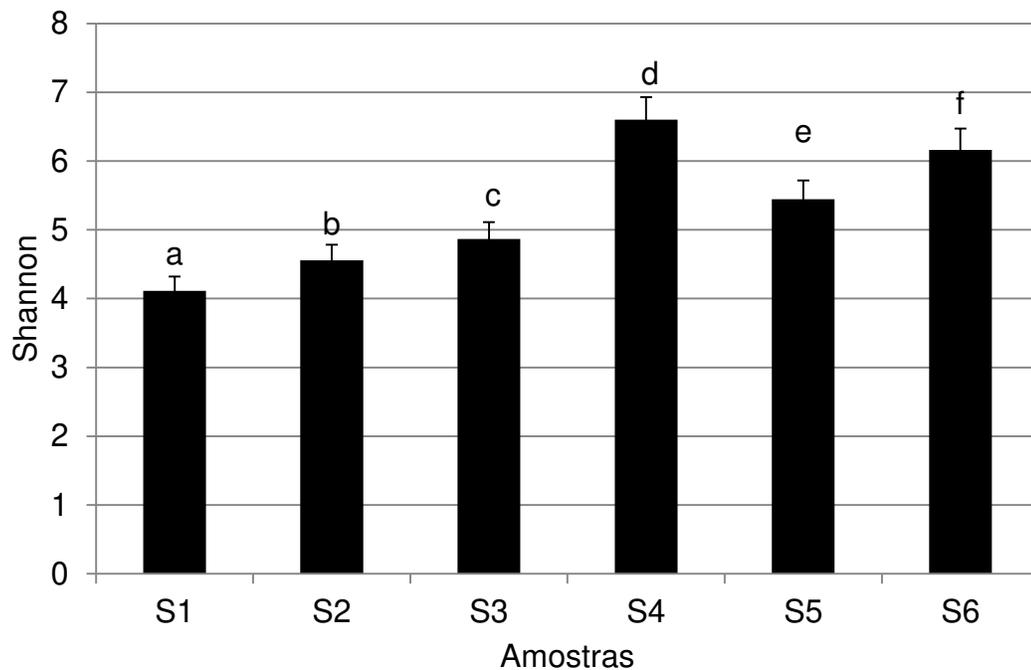
A comunidade do solo também foi analisada para melhor compreensão da microbiota desse ambiente. A figura 14 mostra a análise de n-MDS feita para as amostras de solo.

Segundo a análise de n-MDS, as amostras S3, S4, S5 e S6 foram mais semelhantes entre si em termos de distribuição das OTUs e teores de cálcio, potássio e sódio. A amostra S1 apresentou 212 OTUs únicas e se diferenciou das demais amostras devido à estrutura da sua comunidade (distribuição das OTUs). No entanto, nenhum parâmetro químico pôde explicar sua diferença. A amostra S2 se diferenciou das demais amostras de solo por apresentar 759 OTUs únicas além de ser a amostra que apresentou os teores mais elevados de metais.



**Figura 14.** Escalonamento multidimensional não métrico de similaridade Bray-Curtis entre as amostras de solo com base na distribuição da OTUs e nos parâmetros químicos. O valor do estresse é 0,127.

A figura 15 mostra a variação do índice de diversidade de Shannon entre as amostras de solo. Com base nesse gráfico é possível observar que todas as amostras de solo foram diferentes em termos de diversidade. Assim como ocorreu na drenagem, a comunidade bacteriana das amostras de solo também variou ao longo do canal de drenagem em termos de estrutura e diversidade. Novamente, as amostras próximas não apresentaram, necessariamente, a mesma microbiota e, portanto, essa é influenciada pela combinação dos parâmetros químicos únicos de cada amostra.

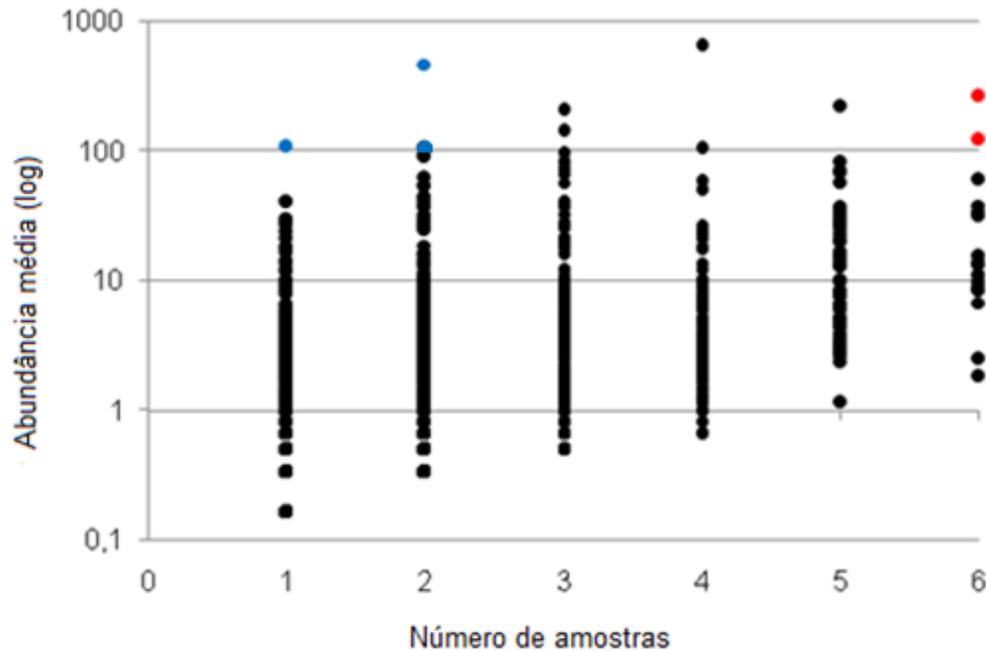


**Figura 15.** Índice de diversidade Shannon das amostras de solo. Diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% são indicadas pelas letras nas barras do gráfico

A figura 16 mostra o gráfico de dispersão das OTUs das amostras de solo com relação a sua abundância e número de amostras ocupadas, a fim de determinar as OTUs generalistas e especialistas desse ambiente.

As OTUs 303, 2446 e 3340 foram especialistas no solo. A primeira OTU não pode ser classificada em nenhum taxon, a segunda OTU foi identificada como *Acidobacteria* e a terceira OTU pertence à ordem *Rhodospirillales* (*Alphaproteobacteria*). As OTUS generalistas foram a 310 e a 3824. A OTU 310 foi identificada como uma bactéria pertencente à subordem *Frankinae* enquanto que a OTU 3824 foi identificada como *Alphaproteobacteria*. Apesar de essas OTUs acrescentarem poucas informações a respeito da comunidade do solo, o fato do solo apresentar OTUs especialistas indica que esse ambiente é mais heterogêneo em termos de nichos, o que pode favorecer a especialização das bactérias a determinados ambientes.

Além disso, essa comunidade pode apresentar um maior nível de competição interespecífica por recursos o que resultou em grupos bacterianos mais adaptados a nichos específicos.



**Figura 16.** Gráfico da ocupação e abundância de OTUs nas amostras de solo. As OTUs especialistas, definidas por estarem presentes em poucas amostras em alta abundância, são mostradas em azul. As OTUs generalistas, definidas por estarem presentes em todas as amostras em alta abundância, são mostradas em vermelho. Candidatos a especialista.

Um total de 17 OTUs foi encontrado em todas as amostras de solo, portanto, esse grupo de bactérias foi considerado a microbiota núcleo desse ambiente (tabela 9).

**Tabela 9.** OTUs presentes em todas as amostras de solo e sua classificação taxonômica no banco de dados RDP.

<b>OTU</b>	<b>RDP classifier [bootstrap]</b>
310	<i>Betaproteobacteria</i> [97%]
2022	<i>Alphaproteobacteria</i> [100%]
2237	<i>Sphingomonadales</i> [100%]
2299	<i>Acidimicrobineae</i> [99%]
2390	<i>Acidimicrobineae</i> [99%]
2756	<i>Acidobacteria_Gp6</i> [100%]
3072	<i>Bradyrhizobium</i> [100%]
3100	<i>Acidobacteria_Gp4</i> [100%]
3152	<i>Actinomycetales</i> [100%]
3730	<i>Acidobacteria_Gp16</i> [100%]
3824	<i>Rhizobiales</i> [100%]
4143	<i>Actinobacteria</i> [91%]
4184	<i>Actinomycetales</i> [100%]
4342	<i>Blastococcus</i> [92%]
5211	<i>Acidobacteria_Gp6</i> [100%]
5482	<i>Rhizobiales</i> [100%]
5874	<i>Rhizobiales</i> [100%]

O menor número de OTUs (17) encontradas em todas as amostras de solo sugere que este ambiente é mais heterogêneo em termos de nichos a serem ocupados, quando comparado com a drenagem, onde foram encontradas 60 OTUs ao longo do canal de drenagem. O ambiente mais heterogêneo do solo também justifica o aparecimento de OTUs especialistas, pois essas bactérias podem estar ocupando nichos específicos e contribuindo para que a comunidade do solo se torne mais diversificada.

As ordens *Sphingomonadales* e *Rhizobiales*, o gênero *Bradyrhizobium* e o filo *Acidobacteria* foram encontrados tanto em solo quanto em drenagem. Como mencionado anteriormente, essas bactérias são comuns em solos e apresentam papel

fundamental na fixação de nitrogênio e degradação de compostos xenobióticos. Estas taxa podem desempenhar um papel importante na manutenção da comunidade de solos contaminados com metais pesados e em pH alcalino uma vez que fazem parte da microbiota núcleo dos dois ambientes.

Sequências afiliadas ao gênero *Blastococcus* também foram encontradas na microbiota núcleo do solo. *Blastococcus* são actinobactérias encontradas em diversos ambientes como solo (Ahrens & Moll, 1970), mar (Qin *et al.*, 2009) e rochas calcárias (Urzi *et al.*, 2001). A fisiologia desse gênero ainda é pouco conhecida, mas estudos vêm mostrando que esse grupo de bactérias apresenta maior resistência a metais pesados, do que outros grupos relacionados, além de utilizar uma variedade de fontes de carbono, o que justifica sua presença em amostras de solo (Essoussi *et al.*, 2010; Chouaia *et al.*, 2012).

Muitas OTUs não puderam ser classificadas com precisão, como é o caso de sequências afiliadas aos taxa *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Acidimicrobinae*, *Actinobacteria* e *Actinomycetales*. De uma maneira geral, pode-se concluir que a comunidade microbiana do solo é basicamente formada por bactérias heterotróficas e com alguns grupos tolerantes a metais pesados. No entanto, a maioria dos grupos de bactérias dessa comunidade continua desconhecida ou pouco caracterizada.

Golebiewski *et al.* (2014) utilizaram pirosequenciamento de rDNA 16S de solos contaminados com metais pesados nas proximidades de uma instalação de enriquecimento de minério de zinco e chumbo. No estudo da microbiota núcleo desse ambiente, sequências afiliadas com o gênero *Sphingomonas*, a família *Acidobacteriaceae*, as ordens *Rhodospirillales* e *Rhizobiales* e os filós *Acidobacteria* e *Chloroflexi* foram encontradas. Sequências representando estas taxa também foram encontradas na microbiota de drenagem e solo da mina do Sossego indicando que eles devem ter um papel fundamental na comunidade bacteriana de solos contaminados com metais pesados, principalmente em condições de pH neutro.

## CONCLUSÕES

- As comunidades bacterianas de drenagem e solo diferem em termos de composição e estrutura, mas não em termos de diversidade;
- Com base dos resultados de MRT, ABT e correlação de Spearman, os fatores que mais influenciaram a microbiota nos ambientes da mina do Sossego foram principalmente cobre e potássio. Níquel, ferro e sódio, também apresentaram influência na microbiota estudada;
- A comunidade bacteriana do solo e drenagem da mina do Sossego apresenta resistência a metais e a ambientes neutro/alcalino;
- O ambiente de drenagem é relativamente homogêneo em termos de nichos, mas a distribuição das OTUs e a diversidade da comunidade bacteriana diferem ao longo do canal de drenagem;
- A microbiota núcleo da drenagem é formada basicamente por bactérias resistentes a metais, com alguns grupos halófilos, possui potencial para degradação de diversos compostos xenobióticos e algumas das famílias presentes são pouco conhecidas;
- O ambiente do solo é heterogêneo em termos de nichos. A distribuição das OTUs e a diversidade da comunidade bacteriana diferem entre as diferentes amostras analisadas;
- A microbiota núcleo do solo é formada basicamente por bactérias heterotróficas, com alguns grupos que apresentam resistência a metais pesados. No entanto, essa comunidade ainda é pouco conhecida.

- O estudo da microbiota núcleo das amostras de drenagem e solo revelou a presença de alguns taxa comuns (*Sphingomonadales*, *Rhizobiales*, *Bradyrhizobium* e *Acidobacteria*). Estes taxa podem desempenhar um papel importante na manutenção da comunidade de solos contaminados com metais pesados e em pH alcalino.
- O filo *Deinococcus/Thermus*, especialmente o gênero *Meiothermus*, está presente em grande abundância nas amostras de drenagem e apresentou correlação positiva com os metais cobre, níquel e zinco. Esses resultados são originais, pois diferem dos demais trabalhos de diversidade em ambientes de mina publicados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahrens R, Moll G (1970) A New Budding Bacterium from the Baltic Sea. *Arch Mikrobiol* 70: 243–265.
- Altimira F, Yáñez C, Bravo G, González M, Rojas L, Seeger M (2012) Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol* 12: 193.
- Aslam Z, Im WT, Ten LN, Lee ST (2005) *Phenylobacterium koreense* sp. nov., isolated from South Korea. *Int J Syst Evol Micr* 55: 2001-2005.
- Baker BJ, Banfield JF (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 139-152.
- Banks D, Younger PL, Arnesen RT, Iversen ER, Banks SB (1997) Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environ Geol* 32: 157–174.
- Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J* 6: 343-351.
- Bouskill N, Barker-Finkel J, Galloway TS, Handy RD, Ford TE (2010) Temporal bacterial diversity associated with metal-contaminated river sediments. *Ecotoxicology* 19: 317–328.
- Bruneel O, Volant A, Gallien S, Chaumande B, Casiot C, Elbaz-Poulichet F, Personné JC (2006) Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France. *Appl Environ Microb* 72: 551–556.

- Camargo AO, Moniz AC, Jorge JA, Valadares JMAS (2009) Methods of chemical analysis, physical and mineralogical soil Agronomic Institute of Campinas. Campinas, Brazil: Agronomic Institute.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335-336.
- Choi DH, Hwang CY, Cho BC (2009) *Pelagibius litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater. *Int J Syst Evol Micr* 59: 818-823.
- Chouaia B, Crotti E, Brusetti L, Daffonchio D, Essoussi I, Nouioui I *et al.* (2012) Genome sequence of *Blastococcus saxobsidens* DD2, a stone-inhabiting bacterium. *J Bacteriol* 194: 2752-2753.
- Costa MS, Rainey FE, Nobre MF (2006) The genus *Thermus* and relatives. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. New York, Springer, pp 797-812.
- de Andrade JC, de Abreu MF (ed) (2006) Chemical analysis for solid waste monitoring and agri-environmental studies. Campinas, IAC. 77p.
- De'ath G (2002) Multivariate regression trees: a new technique for modeling species–environment relationships. *Ecology* 83: 1105–1117.
- De'ath G (2007) Boosted trees for ecological modeling and prediction. *Ecology* 88: 243–251.

- Denef VJ, Mueller RS, Banfield JF (2010) AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME J* 4: 599–610.
- Eberspächer J, Lingens F (2006) The genus *Phenylobacterium*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. New York, Springer, pp. 250-256.
- Environmental Protection Agency (EPA) (1986) Test methods for evaluating solid waste physical chemical methods—SW 846, 3rd ed, Washington, D.C: US.
- Essoussi I, Ghodhbane-Gtari F, Amairi H, Sghaier H, Jaouani A, Brusetti L *e al.* (2010) Esterase as an enzymatic signature of *Geodermatophilaceae* adaptability to Sahara desert stones and monuments. *J Appl Microbiol* 108: 1723-1732.
- Evtushenko LI, Takeuchi M (2006) The family *Microbacteriaceae*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). New York, Springer, pp. 1020-1098.
- Ferris FG, Schultze S, Witten TC, Fyfe WS, Beveridge TJ (1989) Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. *Appl Environ Microb* 55: 1249-1257.
- Fuerst JA, Hawkins JA, Holmes A, Sly LI, Moore CJ, Stackebrandt E (1993) *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int J Syst Bacteriol* 43: 125-134.
- Fujii K, Satomi M, Morita N, Motomura T, Tanaka T, Kikuchi S (2003) *Novosphingobium tardaogens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Micr* 53: 47-52.

- Garcia R, Gerth K, Stadler M, Dogma Jr IJ, Müller R (2010) Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the 'unculturables'. *Mol Phylogenet Evol* 57: 878-887.
- Garrity GM, Holt JG (2001) The road map to the Manual. In Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W *et al.* (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Springer, pp. 119–166.
- Ge Y, He JZ, Zhu YG, Zhang JB, Xu Z, Zhang LM, Zheng YM (2008) Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies?. *ISME J* 2: 254-264.
- Golebiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A, Wróbel B (2014) 16S rDNA Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils. *Microbial Ecol* 1-13.
- Gray NF (1997) Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. *Environ Geol* 30: 62-71.
- Guo Z, Megharaj M, Beer M, Ming H, Mahmudur RM, Wu W, Naidu R (2009) Heavy metal impact on bacterial biomass based on DNA analyses and uptake by wild plants in the abandoned copper mine soils. *Bioresource Technol* 100: 3831–3836.
- Halter D, Cordi A, Gribaldo S, Gallien S, Goulhen-Chollet F, Heinrich-Salmeron A *et al.* (2011) Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arsenic-contaminated sediments. *Res Microbiol* 162: 877–887.
- Hamady M, Knight R (2009) Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. *Genome Res* 19: 1141–1152.

- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4: 1-9.
- Hanada S, Kawase Y, Hiraishi A, Takaichi S, Matsuura K, Shimada K, Nagashima, KV (1997) *Porphyrobacter tepidarius* sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring. *Inter J Systemat Bacteriol* 47: 408-413.
- Hartmans S, de Bont JA, Stackebrandt E (2006) The genus *Mycobacterium*: nonmedical. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. New York, Springer, pp 889-918.
- Heikkinen PM, Räsänen ML, Johnson RH (2009) Geochemical characterisation of seepage and drainage water quality from two sulphide mine tailings impoundments: acid mine drainage versus neutral mine drainage. *Mine Water Environ* 28: 30-49.
- Hiraishi A, Yonemitsu Y, Matsushita M, Shin Y, Kuraishi H, Kawahara K (2002) Characterization of *Porphyrobacter sanguineus* sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium capable of degrading biphenyl and dibenzofuran. *Arch Microbiol* 178: 45-52.
- Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM (2008) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol* 8: R143.
- International Copper Study Group (2013) *The world copper factbook 2013*. Lisboa, ICSG Press Release, 62 pp.
- Iglesia R, Castro D, Ginocchio R, Lelie D, Gonzalez B (2006) Factors influencing the composition of bacterial communities found at abandoned copper-tailings dumps. *J App Microbiol* 100: 537-544.

Instituto Brasileiro de Mineração (2011) Informações a análises da economia mineral brasileira. 6ª Ed. Brasília, IBRAM, 28 pp.

Instituto Brasileiro de Mineração. Cobre da Vale tem seu melhor primeiro trimestre. Disponível em: <http://www.ibram.org.br>. Acesso em nov. 2013.

Jain RK, Karera AC (2009) Mining operations and environmental monitoring. *Minervis* 63: 1-5.

Jalali M, Moradi F (2013) Competitive sorption of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in polluted and unpolluted calcareous soils. *Environ Monit Assess* 1-16.

Johnson DB (2011) Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiol Ecol* 81: 2–12.

Jonkers HM, Abed RMM (2003) Identification of aerobic heterotrophic bacteria from the photic zone of a hypersaline microbial mat. *Aquat Microb Ecol* 30: 127-133.

Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* b Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Inter J Systemat Bacteriol* 32: 136-139.

Kandeler E, Tschirko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung, W (2000) Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol Fert Soils* 32: 390-400.

Kerstens K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J (2006) The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and

*Kozakia*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). New York, Springer, pp. 163-200.

Kim KK, Lee JS, Lee KC, Oh HM, Kim SG (2010) *Pontibaca methylaminivorans* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Rhodobacteraceae*. *Inter J Syst Evol Microbiol* 60: 2170-2175.

Kock D, Schippers A (2008) Quantitative microbial community analysis of three different sulfidic mine tailing dumps generating acid mine drainage. *Appl Environ Microb* 74: 5211–5219.

Kontopoulos, A (1998) Acid mine drainage control. In Castro SH, Vergara F, Sánchez MA. Effluent treatment in the mining industry, Chile, University of Concepción, pp. 57-118.

Kuang JL, Huang LN, Chen LX, Hua ZS, Li SJ, Hu M *et al.* (2012) Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *ISME J* 7: 1038–1050.

Kunito T, Saeki K, Oyaizu H, Matsumoto S (1999) Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotox Environ Safe* 44: 174-181.

Labrenz M, Banfield JF (2004) Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system. *Microbial Ecol* 47:205-217.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microb* 75: 5111–5120.

- Lindsay MBJ, Condon PD, Jambor JL, Lear KG, Blowes DW, Ptacek CJ (2009) Mineralogical, geochemical, and microbial investigation of a sulfide-rich tailings deposit characterized by neutral drainage. *Appl Geochem* 24: 2212–2221.
- Lingens F, Blecher R, Blecher H, Blobel F, Eberspächer J, Fröhner C *et al.* (1985) *Phenylobacterium immobile* gen. nov., sp. nov., a gram-negative bacterium that degrades the herbicide chloridazon. *Inter J Systemat Bacteriol* 35: 26-39.
- Liu ZP, Wang BJ, Liu YH, Liu SJ (2005) *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. *Int J Syst Evol Micr* 55: 1229-1232.
- Lottermoser BG (2010) *Mine Water, Mine Wastes: Characterization, Treatment, Environmental Impacts*, Berlin, Springer pp. 91-152.
- Ma Y, Rajkumar M, Luo Y, Freitas H (2013) Phytoextraction of heavy metal polluted soils using *Sedum plumbizincicola* inoculated with metal mobilizing *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b. *Chemosphere* 93: 1386-1392.
- Mackenzie R, Pedro´s-Alió C, Diez B (2013) Bacterial composition of microbial mats in hot springs in Northern Patagonia: variations with seasons and temperature. *Extremophiles* 17: 123–136.
- Majzlan J, Lalinská B, Chovan M, Bläb, U, Brecht B, Göttlicher J, Gescher, J (2011) A mineralogical, geochemical, and microbiological assessment of the antimony- and arsenic-rich neutral mine drainage tailings near Pezinok, Slovakia. *Am Mineral* 96: 1-13.
- Männistö MK, Kurhela E, Tirola M, Haggblom MM (2013) *Acidobacteria* dominate the active bacterial communities of Arctic tundra with widely divergent winter-time snow accumulation and soil temperatures. *FEMS Microbiol Ecol* 84: 47-59.

- Marcin C, Marcin G, Justyna MP, Katarzyna K, Maria N (2013) Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl Soil Ecol* 64: 7–14.
- Margesin R, Zhang DC (2013) *Humitalea rosea* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium of the family *Acetobacteraceae* isolated from soil. *Int J Systemat Evol Microbiol* 63: 1411-1416.
- Marschner P, Rengel Z (2007) Contributions of rhizosphere interactions to soil. In: Abbott LK, Murphy DV (eds) *Soil biological fertility: a key to sustainable land use in agriculture*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp 81–98.
- Martin F, Torelli S, Le Paslier D, Barbance A, Martin-Laurent F, Bru D (2012) *Betaproteobacteria* dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environ Pollut* 162: 345-353.
- Martínez-Checa F, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I, Béjar V (2005) *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the ‘*Alphaproteobacteria*’, isolated from a saline soil. *Int J Systemat Evol Microbiol* 55: 2525-2530.
- Masoud W, Takamiya M, Vogensen FK, Lillevang S, Al-Soud WA, Sorensen SJ *et al.* (2011) Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *Int Dairy J* 21: 142-148.
- Masurat P, Fru EC, Pedersen K (2005) Identification of *Meiothermus* as the dominant genus in a storage system for spent nuclear fuel. *J Appl Microbiol* 98: 727-740.

- Mendez MO, Neilson JW, Maier RM (2008) Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Appl Environ Microbiol* 74: 3899-3907.
- Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M *et al.* (2008) The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics* 9: 386-393.
- Mihuc TB (1997) The functional trophic role of lotic primary consumers: generalist versus specialist strategies. *Freshwater Biol* 37: 455-462.
- Miransari M (2013) Soil microbes and the availability of soil nutrients. *Acta Physiol Plant* 35: 3075-3084.
- MME. Plano Nacional de Mineração 2030. Brasília, MME/SGM, 2010.
- MME. Sinopse 2012: Mineração e transformação mineral. Brasília, MME/SGM, 2013.
- Mohapatra BR, Douglas GW, Dinardo O, Koren DW (2011) Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: a review of molecular methods. *Miner Eng* 24: 709-718.
- Mori K, Iino T, Ishibashi J, Kimura H, Hamada M, Suzuki KI (2012) *Meiothermus hypogaeus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Micr* 62: 112–117.
- Noguez AM, Arita HT, Escalante AE, Forney LJ, García-Oliva F, Souza V (2005) Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecol Biogeogr*, 14: 241-248.

- Normand P (2006) *Geodermatophilaceae* fam. nov., a formal description. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2277-2278.
- Oh YS, Roh DH (2012) *Phenylobacterium muchangponense* sp. nov., isolated from beach soil, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62: 977-983.
- Pancholi DA, Sharma N, Singh G (2009) Problems of acid mine drainage and the remedial measures at Panandhro lignite mines, Kutch, W. India. *Minervis* 63: 6-12.
- Parks DH, Beiko RG (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26: 715-721.
- Piotrowska-Seget Z, Cycoń M, Kozdroj J (2005) Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology* 28: 237-246.
- Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL *et al.* (2009) Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *App Environ Microb*, 75: 6176-6186.
- Rainey FA, Silva J, Nobre MF, Silva MT, da Costa MS (2003) *Porphyrobacter cryptus* sp. nov., a novel slightly thermophilic, aerobic, bacteriochlorophyll a-containing species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53: 35-41.
- Rappé MS, Giovannoni SJ (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57: 369-394.
- Reis MP, Barbosa FAR, Chartone-Souza E and Nascimento AMA (2013) The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. *Extremophiles* 17: 301-309.

- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent A *et al.* (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1: 283–290.
- Rose AW, Cravotta CA (1998) Geochemistry of coal-mine drainage. In Brady KBC, Smith MW, Schueck JH (eds.). *Coal mine drainage prediction and pollution prevention in Pennsylvania*. Harrisburg, Pennsylvania Department of Environmental Protection, pp. 1-22.
- Sadowsky MJ, Graham PH (2006) Root and stem nodule bacteria of legumes. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. New York, Springer, pp. 818-841.
- Sánchez-Andrea I, Rodríguez N, Amils R, Sanz JL (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microb* 77: 6085-6093.
- Sangwan N, Lata P, Dwivedi V, Singh A, Niharika N, Kaur J *et al.* (2012) Comparative metagenomic analysis of soil microbial communities across three hexachlorocyclohexane contamination levels. *PLoS One* 7: e46219.
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 55: 130-140.
- Schmidt S, Wittich RM, Erdmann D, Wilkes H, Francke W, Fortnagel P (1992) Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas sp.* strain SS3. *Appl Environ Microbiol* 58: 2744-2750.

- Shade A, Handelsman J (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14: 4-12.
- Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H (2006) The myxobacteria. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. New York, Springer, pp. 31-115.
- Shimkets L, Woese CR (1992) A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9459–9463.
- Silvas FPC (2010) *Biotecnologia aplicada ao tratamento de drenagem ácida de mina*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 123p.
- Singleton DR, Richardson SD, Aitken MD (2011) Pyrosequence analysis of bacterial communities in aerobic bioreactors treating polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation* 22: 1061-1073.
- StatSoft Inc. (2003) *STATISTICA* (data analysis software system). Version 6. URL [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Steven B, Lionard M, Kuske CR, Vincent WF (2013) High Bacterial Diversity of Biological Soil Crusts in Water Tracks over Permafrost in the High Arctic Polar Desert. *PloS One*, 8: e71489.
- Streten-Joyce C, Manning J, Gibb KS, Neilan BA, Parry DL (2013) The chemical composition and bacteria communities in acid and metalliferous drainage from the wet-dry tropics are dependent on season. *Sci Total Environ* 443: 65–79.

- Sun MY, Dafforn KA, Johnston EL, Brown MV (2013) Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environ Microbiol* doi:10.1111/1462-2920.12133.
- Thrash JC, Coates JD (2010) Phylum XVII. *Acidobacteria* phyl. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, New York, Springer, pp. 725-735.
- Tiago I, Mendes V, Pires C, Morais PV, Veríssimo A (2005) *Phenylobacterium falsum* sp. nov., an *Alphaproteobacterium* isolated from a nonsaline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *Syst App Microbiol* 28: 295-302.
- Tian B, Hua Y (2010) Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus–Thermus* bacteria. *Trends Microbiol* 18: 512-520.
- Tiirola MA, Männistö MK, Puhakka JA, Kulomaa MS (2002) Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a groundwater bioremediation system. *App Environ Microb* 68: 173-180.
- Trüper HG, Schleifer KH (2006) Prokaryote characterization and identification. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. New York, Springer, pp. 58-79.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007) The Human Microbiome Project. *Nature* 449: 804–810.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault M-P, Frey-klett P (2009) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol* 17:378–387.

- Urzi C, Brusetti L, Salamone P, Sorlini C, Stackebrandt E, Daffonchio D (2001) Biodiversity of *Geodermatophilaceae* isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin. *Environ Microbiol* 3: 471-479.
- Vera M, Schippers A, Sand W (2013) Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 7529-7541.
- Vilchez R, Pozo C, Gómez MA, Rodelas B, González-López J (2007) Dominance of *Sphingomonas* in a copper-exposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology*, 153: 325-337.
- Wang W, Deng Z, Tan H, Cao L (2013) Effects of Cd, Pb, Zn, Cu-Resistant endophytic *Enterobacter* sp. CBSB1 and *Rhodotorula* sp. CBSB79 on the growth and phytoextraction of *Brassica* plants in multimetal contaminated soils. *Int J Phytorem* 15: 488-497.
- Wang XS, Huang LP, Li Y, Chen J (2010) Removal of copper (II) ions from aqueous solution using *Sphingomonas paucimobolis* biomass. *Adsorpt Sci Technol* 28: 137-147.
- Wittich RM, Wilkes H, Sinnwell V, Francke W, Fortnagel P (1992) Metabolism of Dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RWI. *Appl Environ Microbiol* 58:1005-1010.
- White DC, Sutton SD, Ringelberg DB (1996) The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol* 7: 301-306.
- Xie J, He Z, Liu X, Liu X, Van Nostrand JD, Deng Y *et al.* (2011) GeoChip-Based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. *Appl Environ Microb* 77: 991-999.

- Yang R, Luo C, Chen Y, Wang G, Xu Y, Shen Z (2013) Copper-resistant bacteria enhance plant growth and copper phytoextraction. *Int J Phytorem* 15: 573-584.
- Yoon MH, Im WT (2007) *Flavisolibacter ginsengiterrae* gen. nov., sp. nov. and *Flavisolibacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1834-1839.
- Yoon JH, Kang SJ, Lee SY, Lee JS, Park S (2011) *Ohtaekwangia koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Ohtaekwangia kribbensis* sp. nov., isolated from marine sand, deep-branching members of the phylum *Bacteroidetes*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1066-1072.
- Zhang H, Shi W, Yang M, Sha T, Zhao Z (2007) Bacterial diversity at different depths in lead-zinc mine tailings as revealed by 16S rRNA gene libraries. *J. Microbiol* 45: 479.
- Zhang K, Han W, Zhang R, Xu X, Pan Q, Hu X (2007) *Phenylobacterium zucineum* sp. nov., a facultative intracellular bacterium isolated from a human erythroleukemia cell line K562. *Syst Appl Microbiol* 30: 207-212.
- Zhou J, Kia B, Treves DS, Wu LY, Marsh TL, O'Neill RV *et al.* (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microb* 68: 326–334.