



VIVIANE DRUMOND RODRIGUES

Avaliação da Biodiversidade de Bactérias Associadas a Ambientes de Mina

Campinas, 2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Viviane Drumond Rodrigues

**Avaliação da Biodiversidade de Bactérias
Associadas a Ambientes de Mina**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em Genética
e Biologia Molecular, na Área Genética de
Microrganismos.*

Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA VIVIANE DRUMOND
RODRIGUES E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. LAURA MARIA MARISCAL
OTTOBONI.

Laura m. m. Ottoboni

ASSINATURA DA ORIENTADORA

Campinas

2014

iii

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

R618a Rodrigues, Viviane Drumond, 1983-
Avaliação da biodiversidade de bactérias associadas a ambientes de mina /
Viviane Drumond Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Comunidades bacterianas. 2. 16S rRNA. 3. Cobre - Minas e mineração. 4.
Análise funcional. 5. Biomineração. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biodiversity evaluation of bacteria associated with mine environments

Palavras-chave em inglês:

Bacterial communities

16S rRNA

Copper mines and mining

Functional analysis

Biomining

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Laura Maria Mariscal Ottoboni [Orientador]

Fabiana Fantinatti Garborggini

Salete Aparecida Gaziola

Edmilson Ricardo Gonçalves

Mônica Barbosa de Melo

Data de defesa: 22-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

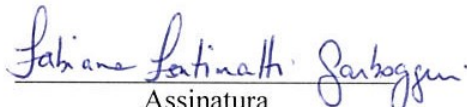
Campinas, 22 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (orientadora)


Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini


Assinatura

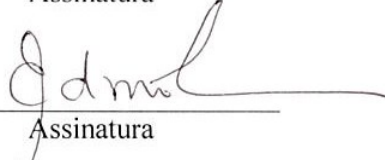
Dra. Salete Aparcida Gaziola


Assinatura

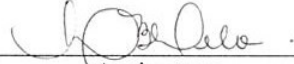
Dra. Tatiana Amabile de Campos

Assinatura

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves


Assinatura

Dra.. Mônica Barbosa De Melo


Assinatura

Dra. Amanda Keller Siqueira

Assinatura

Matilde Da Silva Costa

Assinatura

Resumo

O conhecimento acerca da diversidade microbiana associada a ambientes de mina é limitado, apesar da importância que alguns micro-organismos podem ter no processo de biolixiviação e biorremediação ambiental. Adicionalmente, micro-organismos que vivem em condições inóspitas, como os diferentes ambientes de mina, vêm despertando interesse cada vez maior por possuírem enzimas de interesse industrial. Neste sentido, a análise da biodiversidade funcional e estrutural de micro-organismos presentes em ambientes de mina é de fundamental importância para entender a estrutura e a complexidade das comunidades microbianas em ambientes extremos. Neste trabalho, a diversidade microbiana foi analisada em diversos ambientes da mina de cobre do Sossego, localizada em Canaã dos Carajás, sudeste do Pará por abordagens dependentes e independentes de cultivo. A composição taxonômica associada a ambientes da mina do Sossego: taludes (estruturas geotécnicas) e entorno da drenagem dos depósitos de Sossego (T-SO1, T-SO2, ED-SO1, ED-SO2) e Sequeirinho (T-SE1, T-SE2, ED-SE1, ED-SE2) foi avaliada por pirosequenciamento do gene de rRNA 16S. Os resultados indicaram que a comunidade de bactérias de talude é distinta do entorno da drenagem e o conteúdo de matéria orgânica e maior disponibilidade de água foram os principais fatores para as diferenças. Os principais táxons responsáveis pelas diferenças foram *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gammaproteobacteria* e *Firmicutes*. Por meio de técnicas dependentes de cultivo, 64 bactérias heterotróficas foram isoladas a partir das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9. Estes isolados foram identificados e avaliados quanto à capacidade de produção de enzimas (hidrolases, monoxigenases, sulfoxidases e betalactamase) e compostos (sideróforos, biossurfactantes e antimicrobianos). Foram identificadas bactérias afiliadas aos seguintes gêneros: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Kocuria*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Roseomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus*, sendo o último representado por 43 isolados. Com relação à triagem funcional, 95% das bactérias foram capazes de produzir sideróforos, 58% biossurfactantes, 69% betalactamases, 50% antimicrobianos, 53% proteases, 75% esterases, 20% monoxigenases e três isolados (SO5.4, SO5.9 e SO6.2) apresentaram oxidação seletiva para sulfetos orgânicos. A partir de amostras de drenagem (SO5, SO6 e SO7) foram obtidos consórcios de micro-organismos oxidantes de ferro. Estes consórcios

foram testados com relação à capacidade de biolixiviação da calcopirita e foram mais eficientes para a dissolução do cobre do que *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR. A identificação dos microorganismos presentes nos consórcios foi realizada por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e as bandas mais evidentes foram classificadas em *Bacillus* sp., *Delftia* sp., *Phenylobacterium* sp. e *Methylobacterium* sp. A comunidade de bactérias na mina de cobre do Sossego foi diversa e complexa. Estes resultados mostram um inventário da microbiota em diferentes ambientes da mina do Sossego e as enzimas e compostos obtidos destas bactérias poderão ser utilizadas em processos e tecnologias que permitam a recuperação de metais, como a biolixiviação e biorremediação ou em outras aplicações industriais.

Abstract

The knowledge concerning microbial diversity associated with mine environments is limited, despite the importance that some microorganisms can have on environmental bioremediation and bioleaching process. Additionally, microorganisms that live in inhospitable conditions, such as different mine environments, have attracted growing interest because they could have enzymes with industrial applications. In this way, structural and functional biodiversity analysis in mine environments is an important issue to understand the structure and complexity of the microbial communities in extreme environments. The present work shows a microbial diversity analyses in some cooper mine environments of Sossego Mine localized in Canaã dos Carajás mineral province, Pará state, Brazil. The bacterial taxonomic composition associated with Sossego cooper mine: slopes (geotechnical structures) and surrounding drainage of Sossego and Sequeirinho deposits was evaluated using pyrosequencing of 16S rRNA gene. The results indicated slope bacterial community differs from surrounding drainage and organic matter content and higher water availability were the main factors of these differences. The foremost taxons accountable by those differences were *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gammaproteobacteria* and *Firmicutes*. Sixty four bacteria were isolated using culture-dependent methods from SO5, SO6, SO7 and SO9 samples. These bacteria were identified and evaluated concerning the capability of enzyme production (hydrolase, betalactamase, monooxygenase and sulphoxidases) and compounds (siderophore, biosurfactants and antimicrobials). It was identified bacteria related with the followed genera: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Kocuria*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Roseomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* and *Bacillus*, the last one showed 43 isolates. In relation with functional screening, 95% of bacteria were capable to produce siderophores, 58% to produce biosurfactants, 69% betalactamases, 50% antimicrobials, 53% proteases, 75% esterases, 20% monooxygenases and three strains (SO5.4, SO5.9 and SO6.2) exhibited selective oxidation for organic sulphides. Iron oxidizing microorganism consortia were obtained from drainage samples and were tested according with its ability for bioleaching of chalcopyrite. The consortia obtained from SO5, SO6, and SO7 samples were more efficient than *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR regarding bioleaching of copper from chalcopyrite. The identification of microorganism presented in the consortia was performed using

DGGE technique and the more evident bands were classified as *Bacillus* sp., *Delftia* sp., *Phenylobacterium* sp. and *Methylobacterium* sp. The bacterial community in Sossego cooper mine was diverse and complex. These results showed a microbiota inventory in distinct mine environments and enzymes and compounds obtained from those bacteria could be used in new processes and technologies that allow to recovery metals as bioleaching, bioremediation or others industrial applications.

SUMÁRIO

I.	Introdução	1
II.	Objetivos	11
CAPÍTULO 1: Avaliação da diversidade de bactérias em ambientes de mina de cobre		13
1.1	Introdução	13
1.2	Material e Métodos	14
1.2.1	Coleta de amostras	14
1.2.2	Isolamento e purificação do DNA	16
1.2.3	Construção das bibliotecas de rDNA 16S e pirosequenciamento	17
1.2.4	Processamento das sequências e análises estatísticas	18
1.3	Resultados e Discussão	19
1.3.1	Caracterização das amostras	19
1.3.2	Isolamento de DNA das amostras de mina e construção de bibliotecas para pirosequenciamento	22
1.3.3	Análise da diversidade por pirosequenciamento	23
1.3.3.1	Análises dos dados obtidos por pirosequenciamento	23
1.3.3.2	Composição taxonômica e análise das comunidades	24
1.3.3.3	OTUs abundantes	30
1.3.3.4	OTUs habitat-específicas	35
1.4	Conclusão	37
1.5	Referências Bibliográficas	38
CAPÍTULO 2: Diversidade funcional e potencial biotecnológico de bactérias heterotróficas isoladas de ambientes de mina de cobre		45
2.1	Introdução	45
2.2	Material e Métodos	47
2.2.1	Coleta de amostras	47
2.2.2	Isolamento de bactérias heterotróficas das amostras de mina SO5, SO6, SO7 e SO9	47
2.2.2.1	Plaqueamento das amostras em meio PCA	48
2.2.2.2	Inóculo das colônias isoladas em meio TSB	48
2.2.2.3	Isolamento das colônias em meio TSA	48
2.2.2.4	Exclusão de possíveis contaminações com fungos	48
2.2.3	Caracterização e identificação de bactérias isoladas	49
2.2.3.1	Coloração de Gram	49
2.2.3.2	Identificação das bactérias heterotróficas isoladas	49
2.2.4	Caracterização funcional das bactérias heterotróficas	50
2.2.4.1	Produção de protease	50
2.2.4.2	Deteção de sideróforos	50
2.2.4.3	Produção de betalactamase	51
2.2.4.4	Deteção de antimicrobianos	52
2.2.4.5	Produção de biossurfactante	53
2.2.4.6	Triagem de alto desempenho (High-Throughput Screening – HTS)	54

2.2.4.7	Ensaio de multibiorreação	57
2.3	Resultados e Discussão	59
2.3.1	Caracterização das amostras	59
2.3.2	Isolamento e identificação das bactérias isoladas das amostras de mina	61
2.3.3	Caracterização funcional das bactérias heterotróficas: capacidade de produção de enzimas compostos	68
2.3.3.1	Detecção de protease	68
2.3.3.2	Detecção de sideróforos	69
2.3.3.3	Triagem de betalactamase e compostos antimicrobianos	72
2.3.3.4	Detecção da produção de biossurfactante	76
2.3.3.5	Triagem de alto desempenho	79
2.3.3.6	Ensaio de multibiorreação	82
2.4	Conclusão	84
2.5	Referências Bibliográficas	85

CAPÍTULO 3: Obtenção de consórcios de micro-organismos a partir de amostras de sedimentos aquosos de mina de cobre		95
3.1	Introdução	95
3.2	Material e métodos	97
3.2.1	Coleta de amostras	97
3.2.2	Obtenção de consórcios	97
3.2.3	Teste da capacidade de biolixiviação dos consórcios	97
3.2.4	Identificação dos micro-organismos presentes nos consórcios	98
3.3	Resultados e Discussão	100
3.3.1	Obtenção dos consórcios	100
3.3.2	Teste da capacidade de biolixiviação dos consórcios	103
3.3.3	Identificação dos micro-organismos presentes nos consórcios isolados	105
3.4	Conclusão	111
3.5	Referências Bibliográficas	111
III.	Considerações Finais	117
IV.	Referências bibliográficas	119

*Ao meu esposo, Tiago Felipe, pelo amor e apoio incondicionais, que faz dos obstáculos
escadas para subir cada vez mais alto.
Aos meus pais, Ailton e Marise, pelos exemplos de vida, honestidade e dignidade.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, meu alicerce, meu guia.

Agradeço o meu esposo, meus pais e familiares que me muito incentivaram ao longo dessa caminhada.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), especialmente ao Departamento de Genética e Biologia Molecular e o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, pela oportunidade de execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, pela oportunidade que me foi dada, pela orientação para a realização deste trabalho.

À todos do laboratório de biologia molecular ambiental: Camila Carlos, Thiago Miranda, Nancy Stoppe, Bruna Zanardi, Letícia Pereira, Daniel Castro e Silvia Turcinelli, com os quais tive ótimos momentos trabalhando e aprendendo junto. Pelas conversas e debates enriquecedores, pelos anos de convívio, pelo apoio e ajuda em situações técnicas e pessoais.

Ao CNPq/Vale, pelo financiamento do projeto.

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Vale, por disponibilizar as amostras deste trabalho.

Ao Pablo Pina e ao José Antônio de Matteo, pela prestatividade na coleta de material para este estudo e Francinaldo Ferreira do Rego Sindeaux, por todo o suporte, auxílio e esclarecimentos sobre a mina do Sossego e das amostras que nos foram enviadas.

À Profa. Dra. Clarice Arns, pelos conhecimentos repassados, pela orientação durante o programa de estágio docente (PED); pela confiança e por todo apoio.

À Profa. Dra Tatiana Teixeira, pela participação e suporte com o seu vasto conhecimento em biologia molecular.

À Profa. Dra Anita Marsaioli e a Bruna Z. Costa, por compartilharem conhecimento e experiências com as triagens de alto desempenho e biocatálise.

À Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira, por compartilhar conhecimento, experiências, pela colaboração na identificação de bactérias e a Samantha, por toda atenção e ajuda dispensada com os géis de DGGE.

Aos membros da banca de qualificação, que contribuíram com críticas e sugestões para o

aprimoramento deste trabalho e aos membros da pré-banca, pelas valiosas sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves, Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, Profa. Dra. Salete Aparecida Gaziola e Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pelo aceite do convite, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições acerca deste trabalho.

Aos professores, funcionários e secretárias do CBMEG, pelo aporte físico e material.

À secretária do programa de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular, Lourdes, pela prestatividade, auxílio e paciência em toda parte burocrática.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o meu convite.

Aos amigos que me incentivaram com palavras de apoio e carinho.

À todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho e com meu engrandecimento pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

“... terra onde vais comer o pão sem escassez - nela, nada te faltará! Terra cujas pedras são de ferro e de cujas montanhas extrairás o cobre.”

Deuteronômio 8, 9

Lista de Ilustrações

- Figura 1.1. Imagem de satélite da Mina do Sossego. Mina de cobre da companhia Vale, localizada em Canaã dos Carajás, Pará. Destaque para os pontos de amostragem no depósito de Sossego, amostras T-SO1, T-SO2, ED-SO1 e ED-SO2 e no depósito de Sequeirinho: T-SE1, T-SE2, ED-SE1 e ED-SE2. Em azul, são destacadas as amostras do entorno da drenagem e, em vermelho, as amostras de talude. Fonte: *Google Earth™ Mapping Service*. 16
- Figura 1.2. Amostras de diferentes pontos da mina do Sossego, mina de cobre da Companhia Vale, localizada em Canaã dos Carajás, Pará. (a) Amostra ED-SO1 – entorno da drenagem natural de depósito estéril do Sossego; (b) Amostra ED-SO2 – entorno da drenagem a jusante do depósito de estéril do depósito do Sossego, próximo ao dique Taboa; (c) T-SO1 – talude próximo à entrada do depósito do Sossego; (d) Amostra T-SO2 – talude a jusante drenagem da cava do Sossego Amostra; (e) Amostra ED-SE1 – entorno da drenagem do depósito de misto em Sequeirinho; (f) Amostra ED-SE2 – entorno da drenagem a jusante do depósito de oxidado verde de Sequeirinho; (g) Amostra T-SE1 – talude leste do depósito do Sequeirinho, próximo à superfície saprolito roxo; (h) Amostra T-SE2 – talude próximo à falha de contato com o minério do depósito de Sequeirinho. 21
- Figura 1.3. Abundância relativa de filos e classe *Proteobacteria* presentes na comunidade de bactérias do entorno da drenagem e talude. Foram descritos somente grupos filogenéticos que representaram sequências classificadas > 1% em pelo menos uma das amostras. A categoria “outras bactérias” se refere aos grupos que representaram sequências classificadas ≤ 1% das amostras. 26
- Figura 1.4. Dendograma gerado pelo método UPGMA pelas dissimilaridades genéticas, com base na matriz de *Bray-Curtis*, utilizando a abundância relativa de OTUs das amostras de talude e do entorno da drenagem. 27
- Figura 1.5. Escalonamento multidimensional não métrico (n-MDS) para as duas primeiras dimensões, baseadas na matriz de dissimilaridade de *Bray-Curtis*. Comparação das amostras de talude (T-SE1, T-SE2, T-SO2 e T-SO1) e do entorno da drenagem (ED-SE2, ED-SE1, ED-SO2 e ED-SO1), elementos químicos (Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, S, Fe, P, Mg, Mn, Ni e Zn), pH, conteúdo de água (U) e matéria orgânica (MO). . 29
- Figura 2.1. Teste para a detecção da betalactamase das bactérias isoladas a partir das amostras de mina de cobre. Foram atribuídos símbolos (0), (1), (2) e (3), de acordo com a variação da intensidade da coloração dos discos de cefinase utilizados no teste da betalactamase. 52
- Figura 2.2. Amostras de pontos diferentes da mina do Sossego. Mina de cobre da Companhia Vale localizada em Canaã dos Carajás, Pará. (a) Amostra de solo úmido, colhida na base de pilhas de deposição de rejeitos da Cava do Sossego; (b) Amostra de minério

sulfetado de cobre coletada na cava do Sequeirinho; (c) Amostra SO5; (d) Amostra SO6; (e) Amostra SO7; (f) Amostra SO9.....	59
Figura 2.3. Análise de componentes principais baseada na concentração dos elementos químicos das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9.....	61
Figura 2.4. Distribuição dos diferentes gêneros das bactérias isoladas das amostras SO5, SO6 SO7 e SO9.	66
Figura 2.5. (a) teste para a protease, mostrando o caso positivo (p) e o negativo (n). Em (b) é representada a porcentagem das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9 em relação ao total do número de isolados positivos.....	68
Figura 2.6. Tipos de sideróforos produzidos pelas bactérias heterotróficas (a) meio <i>overlay</i> CAS sem inóculo, (b) hidroxamato, (c) catecolato (d) carboxilato (e) mistura de carboxilato e hidroxamato, (f) ausência da produção de sideróforo.....	70
Figura 2.7. Teste antimicrobiano envolvendo a linhagem referência <i>S. marcescens</i> (a) <i>Serratia marcescens</i> ; (b) Ausência de inibição de <i>S. marcescens</i> (c) Nível de inibição 1; (d) Nível de inibição 2; (e) Nível de inibição 3.....	75
Figura 2.8. Teste do colapso da gota. (a) Colapso positivo; (b) Colapso negativo.	76
Figura 2.9. Teste da emulsificação do querosene. (a) Emulsão estável após 24 h; (b) Emulsão não estável após 24 h.	79
Figura 2.10. Biooxidação diasterosseletiva do sulfeto rac-cis-21 catalisado pelas bactérias SO5.4, SO5.9 e SO6.2.	84
Figura 3.1. Valores de pH dos consórcios obtidos das amostras ambientais SO5, SO6 e SO7 ao longo do tempo de cultivo na presença de ferro.	101
Figura 3.2. Amostras dos consórcios SO5, SO6 e SO7 para a seleção dos micro-organismos oxidantes de ferro inicial (a) e após sucessivos subcultivos (b).	102
Figura 3.3. Teste da capacidade de oxidação da calcopirita pelos consórcios obtidos das amostras SO5, SO6, SO7, AFE-LR (<i>A. ferrooxidans</i> LR, controle biótico) e T&K (controle abiótico). Teor de cobre (mg/L) dissolvido em cada uma das amostras.....	103
Figura 3.4. Análise de variância das médias da concentração de cobre dissolvido para as amostras SO5, SO6, SO7, AFE-LR (<i>A. ferrooxidans</i> LR, controle biótico) e T&K (controle abiótico).	104
Figura 3.5. Teste da capacidade de biolixiviação da calcopirita pelos consórcios obtidos a partir das amostras SO5, SO6 e SO7, <i>A. ferrooxidans</i> LR e meio T&K. Observam-se diferentes tonalidades de verde-azulado nos consórcios e coloração acinzentada em <i>A. ferrooxidans</i> LR.	105
Figura 3.6. Exemplo de <i>fingerprinting</i> obtido por eletroforese em gel de agarose dos produtos da	

amplificação do rDNA 16S para a detecção de bactérias presentes nos consórcios obtidos a partir das amostras SO5, SO6 e SO7. M (marcador – 1 Kb *plus*, Invitrogen); amostras 1 a 3 (produto de amplificação das amostras SO5, SO6 e SO7, respectivamente); CN (controle negativo). 106

Figura 3.7. Exemplo de *fingerprinting* obtido por DGGE das amostras dos consórcios obtidos das amostras SO5, SO6, SO7. M (marcador 100 pb, Invitrogen); Bandas identificadas b1, b2, b3 e b4, respectivamente, bandas 1, 2, 3 e 4. 107

Figura 3.8. Exemplo de *fingerprinting* obtido por eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação das bandas excisadas e amplificadas com o *primer* 341F e 907R em diferentes diluições. M (marcador 1 Kb, Invitrogen); Amostras 1, 2 e 3 (banda excisada 1 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); amostras 4, 5 e 6 (banda excisada 2 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); amostras 7, 8 e 9 (banda excisada 3 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); amostras 10, 11 e 12 (banda excisada 4 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); CN (controle negativo). 107

Figura 3.9. Exemplo de *fingerprinting* obtido durante a segunda DGGE. M (marcador 100 pb, Invitrogen); Amostras 1- 4 (bandas excisadas 1 a 4, respectivamente). 108

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Informações das amostras coletadas na Mina do Sossego.....	15
Tabela 1.2. <i>Primers</i> utilizados no estudo. A sequência em negrito, na porção 5' corresponde ao adaptador, seguida da sequência “key” TCAG, a sequência em vermelho corresponde ao <i>barcode</i> específico de cada amostra e, em seguida, a sequência do <i>primer</i> 338F ou 533R.....	18
Tabela 1.3. Caracterização físico-química das amostras do entorno da drenagem e talude coletadas na mina do Sossego.....	22
Tabela 1.4. Índices resultantes da análise do pirosequenciamento e estimativas da diversidade..	23
Tabela 1.5. Composição de bactérias em mina de cobre ativa. Filotipos abundantes observados em dois ambientes (entorno da drenagem e talude) e a sua porcentagem de contribuição.	25
Tabela 1.6. OTUs mais abundantes. Média da frequência das OTUs identificadas pela análise do SIMPER responsáveis pelas maiores diferenças da composição da comunidade de bactérias do entorno da drenagem e de talude.	31
Tabela 1.7. Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> obtidos para as OTUs mais abundantes, elementos químicos, matéria orgânica (MO) e conteúdo de água (U).	32
Tabela 1.8. Relação das OTUs específicas e porcentagem de contribuição para a comunidade de bactérias de acordo com a classificação do ambiente.....	36
Tabela 2.1. Linhagens de referência utilizadas nos testes de produção de compostos antimicrobianos pelas bactérias heterotróficas de ambientes de mina.	53
Tabela 2.2. Sondas utilizadas e/ou desenvolvidas pelo grupo da Profa. Dra. Anita Marsaioli para a triagem de alto desempenho e os produtos primários que são esperados após a atuação da bactéria.....	56
Tabela 2.3. Substratos utilizados para a triagem de sulfoxidases e produtos esperados após as multibiorreações.....	58
Tabela 2.4. Caracterização físico-química das amostras de drenagem (SO5, SO6 e SO7) e de mineral sulfetado de cobre (SO9) coletadas na mina do Sossego. Valores dos elementos químicos expressos em mg/kg.....	60
Tabela 2.5. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO5.....	62
Tabela 2.6. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO6.....	63

Tabela 2.7. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO7.....	64
Tabela 2.8. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO9.....	64
Tabela 2.9. Identificação das bactérias heterotróficas isoladas das amostras de mina de cobre (SO5, SO6, SO7 e SO9).....	65
Tabela 2.10. Bactérias positivas para a produção de protease.....	69
Tabela 2.11. Tipos de sideróforos produzidos pelas bactérias heterotróficas isoladas das amostras de mina de cobre SO5, SO6, SO7 e SO9.....	71
Tabela 2.12. Triagem de betalactamase e detecção de antimicrobianos produzidos pelas bactérias heterotróficas isoladas de mina de cobre (SO5, SO6, SO7 e SO9).	74
Tabela 2.13. Bactérias positivas para a produção de biossurfactantes.	77
Tabela 2.14. Produção de esterase e monoxigenase por bactérias heterotróficas isoladas de drenagens determinadas por fluorimetria.	80
Tabela 2.15. Conversão cromatográfica dos ensaios de multibiorreação para a oxidação de sulfetos catalisados por bactérias isoladas de drenagem de mina.....	83
Tabela 3.1. <i>Primers</i> e condições utilizadas para a padronização da amplificação dos consórcios SO5, SO6 e SO7.	99
Tabela 3.2. Relação das bandas excisadas, bactérias identificadas e a porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada.	108

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACP	Análise de Componentes Principais
ADIMB	Agência para o Desenvolvimento Tecnológico da Indústria Brasileira
ANOSIM	Análises de similaridades
ANOVA	Análise de variância
BC	<i>Bacillus cereus</i>
BSA	Albumina de soro bovino
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Índice de Cobertura
CAS	Cromo azurol S
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CG	Colapso da gota
CG/DIC	Cromatografia gasosa em coluna quiral acoplada a detector de ionização de chama
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CN	Controle negativo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPRM	Serviço Geológico do Brasil
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
CuFeS ₂	Calcopirita
d	Índice de Berger-Parker
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPM	Departamento Nacional de Produção Mineral
E24	Índice de emulsificação após 24 h
ED	Entorno da drenagem
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediamine tetra acetic acid</i>)
EG	Espalhamento da gota
EI	Índice de emulsificação
Eh	Potencial de óxido-redução
EQ	Emulsificação do querosene
ERIC-PCR	Sequência consenso intergênica repetitiva enterobactéria (<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>)
GC	Guanina-citosina
Genbank	Banco de dados público do National Center for Biological Information
H'	Índice de Shannon
IBRAM	Instituto Brasileiro de Mineração
ICP-AES	Espectroscopia de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado
IDESP	Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará
LB	Luria-Bertani
MO	Matéria orgânica
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)

n-MDS	Escalonamento Multimensional Não Métrico
NMP	Número mais provável
OTU	Unidade Taxonômica Operacional (<i>Operational Taxonomic Unit</i>)
pB	Pares de base
PCA	Ágar Contagem de Placas (<i>Plate Counting Agar</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PED	Programa Estágio Docente
PIPES	Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RDP	Banco de Dados Ribossomal (<i>Ribosomal Database Project</i>)
REM	Revista Escola de Minas
RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
rRNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIMINERAL	Sindicato das Indústrias Mineraias do Estado do Pará
SE	Sequeirinho
SIMPER	Análise de percentual de similaridade (<i>similarity percentage breakdown</i>)
SM	<i>Serratia marcescens</i>
SO	Sossego
T	Talude
T&K	Tuovinen & Kelly
TSA	Ágar triptona de toja (<i>Tryptic Soy Agar</i>)
TSB	Caldo triptona de soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
U	Conteúdo de água
UPGMA	Agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>)
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VP	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

I. INTRODUÇÃO

As atividades de mineração estão entre as principais responsáveis pela degradação dos solos em todo mundo (Bradshaw, 1997), além de provocar modificações visuais na paisagem e na disposição de rejeitos decorrente dos processos de exploração. Ademais, as indústrias de mineração e de processamento de metais são as principais fontes de poluição mundial (Blacksmith Institute, 2011) e expõe milhões de pessoas ao risco de intoxicação por componentes altamente nocivos (Blacksmith Institute, 2013). A crescente demanda por metais para a produção de bens manufaturados é acompanhada pelo progressivo esgotamento das reservas minerais. As oscilações nos preços dos minerais são fortemente influenciadas pela relação entre a demanda e a oferta do metal; as questões ambientais, entraves trabalhistas e instabilidades políticas e econômicas contribuíram, de forma significativa, para o aumento do valor dos metais, como o cobre. Nesse sentido, a recuperação de metais a partir de minérios de baixo teor, bem como a minimização dos impactos ambientais são metas das grandes empresas mineradoras (Watling, 2006).

Os micro-organismos representam a base da sustentação da vida na Terra e são importantes fontes de recursos genéticos, com capacidade de colonizar diversos nichos ecológicos (Oliveira *et al.*, 2006), tais como ambientes de mineração. Uma forma de recuperar o cobre em jazidas minerais ocorre por meio de micro-organismos, cujo processo é denominado biolixiviação (Rawlings, 2002). A biolixiviação é utilizada em escala industrial principalmente para produção de cobre (15%), ouro, urânio, zinco e níquel (Bosecker, 1997; Rawlings, 1998; Brierley & Brierley, 2013). Entretanto, a limitada quantidade de informação acerca das comunidades de bactérias em ambientes de mina de cobre ativa do Brasil fundamentou a hipótese deste trabalho em algumas questões, tais como: quais bactérias estão presentes? Como ocorre a sua distribuição? Existem bactérias capazes de produzir compostos de interesse biotecnológico? Há bactérias com capacidade de oxidar sulfetos metálicos? Estas informações sobre a diversidade microbiana em mina de cobre brasileira podem contribuir para melhorar a compreensão das funções exercidas pelas comunidades de micro-organismos e suas interações neste ambiente. Adicionalmente, tem potencial de direcionar a composição de consórcios bacterianos para a biolixiviação e biorremediação.

1. Cobre: aplicações e jazidas

O cobre, metal dúctil de cor avermelhada, é um ótimo condutor de calor e eletricidade e apresenta boa resistência mecânica e boa resistência à corrosão. A sua maleabilidade o permite se ligar a outros metais, formando ligas com diversas aplicações industriais (Davis, 2001). Dentre as inúmeras finalidades da utilização do cobre destacam-se as indústrias eletro-eletrônicas, engenharia metalúrgica, construção civil, indústria naval, automobilística, aeronáutica e ferroviária. Outras utilizações do cobre incluem a cunhagem de moedas, a fabricação de armas e munições, as indústrias química, alimentícia e farmacêutica (Procobre, 2014).

O cobre em estado puro, chamado de cobre nativo, raramente é encontrado na natureza. Normalmente está associado a outros elementos químicos sob a forma de minerais que quando possuem valor econômico são denominados minérios (Nunes & Kreischer, 2010). As jazidas de cobre são geralmente de grandes dimensões e apresentam baixos teores do metal. Nos depósitos de grande porte e nas lavras subterrâneas, o teor de cobre não deve ser inferior a 1%, e nos de pequeno porte, não deve ser abaixo de 3%. Em lavra a céu aberto, o teor mínimo pode atingir 0,5% de Cu (DNPM, 2012). As principais reservas mundiais de cobre concentram-se no Chile, Peru, Estados Unidos e China (DNPM, 2009). No Brasil, as principais ocorrências de minério de cobre são no Pará, Goiás e Bahia (Nunes & Kreischer, 2010). O estado do Pará, além de deter as maiores reservas de minério de cobre do Brasil (cerca de 85%), possui os depósitos de cobre mais significativos e promissores do país (IBRAM, 2012), tais como Sossego, Salobo, Cristalino e Alemão. No Brasil, as principais empresas produtoras de cobre são a Vale, Mineração Maracá (Yamana) e Mineração Caraíba, cujas produções correspondem a 61%, 29% e 10% de cobre, respectivamente (SIMINERAL, 2013).

1.1. Província Mineral de Carajás: Mina do Sossego

A Província Mineral do Carajás, situada na região sudeste do Cráton Amazônico, Estado do Pará, no Brasil, tem características geológicas singulares e abrange uma área de aproximadamente 30.000 km², entre os rios Xingu e Tocantins/Araguaia (MINBEC, 2001; Villas & Santos, 2001; Machado *et al.*, 1991). Sua designação como província ocorre pelo fato de existir no local uma enorme riqueza mineral, como os depósitos de ferro (considerado o mais puro do mundo), cobre, alumínio, manganês, ouro, níquel, prata, platina, entre outros (Tassinari & Macambira, 1999; ADIMB, 2005).

No início dos anos de 1990, a equipe de exploração da Vale identificou, na Província Mineral de Carajás, a existência de minério de cobre, sendo a calcopirita o principal mineral sulfetado de cobre. Pesquisas posteriores confirmaram a existência de cinco depósitos de cobre: Sossego, Salobo, Cristalino, Alvo 118 e Alemão. A mina de cobre do Sossego foi descoberta em 1997 e é a segunda maior mina de cobre do Brasil. Sua implantação foi iniciada em 2002 e o primeiro embarque aconteceu em junho de 2004. A expressiva evolução da produção de cobre nos anos subsequentes possibilitou a inserção da Vale no mercado mundial desse minério (CPRM, 2013).

A mina do Sossego, localizada em Canaã dos Carajás, possui reservas prováveis de 244,7 milhões de toneladas de minério de cobre (REM, 2004). O teor de cobre é estimado em 1,1%, com aproximadamente 0,28 g de ouro por tonelada como subproduto (Monteiro *et al.*, 2008a). O cobre da mina do Sossego é extraído a céu aberto e processado por uma usina com capacidade de produção anual média de 467.000 t de concentrado de cobre, equivalente a 140.000 t de cobre (CPRM, 2010). A mina do Sossego é constituída de duas cavas principais: Sequeirinho e Sossego (Marschik *et al.*, 2003). Essas cavas se distinguem pela distribuição das zonas de alteração hidrotermais, onde em Sossego ocorrem alterações potássica e cloríticas e em Sequeirinho predominam as alterações sódica, sódica-cálcica associadas à magnetita (Monteiro *et al.*, 2008b). A cava do Sequeirinho, primeira a ser minerada, movimentou em apenas um ano cerca de 1,93 milhão de toneladas de minério e estéril e apresentou uma taxa de recuperação metalúrgica de 92% (Vale, 2012). Estimativas apontam que a cava do Sequeirinho atingirá cerca de 1 km de largura por 2,8 km de comprimento e profundidade de 450 m. A cava do Sossego, um pouco

menor, alcançará em torno de 1 km de largura por 800 m de comprimento e até 350 m de profundidade (CPRM, 2013).

A mina do Salobo, segundo projeto de cobre desenvolvido pela Vale, é o maior depósito de cobre já descoberto no Brasil está em operação desde junho de 2012 e possui capacidade de produção de cerca de 100 kt Cu/ano (Pinto, 2012). As reservas cupríferas do Alemão, Alvo 118 e Cristalino deverão ser transformadas pela Vale em projetos mineríferos possivelmente nesta década. Outros projetos de exploração mineral poderão ocorrer em outros estados do país, em função das pesquisas em andamento realizadas principalmente pela Vale, Codelco, Noranda-Falconbridge, Phelps Dodge e Gold Fields.

2. Biolixiviação de metais

Ao longo do século passado os métodos de lavra e as etapas de tratamento e concentração de minérios sofreram aprimoramentos importantes que resultou em um grande desenvolvimento na tecnologia mineral. A exaustão das reservas de minérios de alto teor e a necessidade de manter a constante produção foram os principais fatores que impulsionaram tal inovação (Damasceno, 2007). Atualmente, a recuperação de metais a partir de minérios é feita por métodos metalúrgicos convencionais (pirometalurgia ou hidrometalurgia) e por biolixiviação (Izatt *et al.*, 2014). A pirometalurgia é um processo em que altas temperaturas são utilizadas para auxiliar na extração dos metais. Uma grande desvantagem desse processo é a potencial liberação de dióxido de enxofre para o ambiente, o que pode levar a produção de chuva ácida. A hidrometalurgia baseia-se na utilização de solventes líquidos para lixiviar o metal e o processo de biolixiviação pode ser classificado como um processo hidrometalúrgico no qual micro-organismos específicos catalisam as reações de dissolução de minerais sulfetados (Norgate & Jahanshahi, 2010; Alvarado *et al.*, 2002; Bridge, 2000).

A biolixiviação é o processo em que metais existentes em minérios na forma de compostos insolúveis são solubilizados pela ação direta ou indireta de uma comunidade de micro-organismos (Rawlings & Johnson, 2007). Como resultado da ação microbiana na oxidação dos minerais ocorre a liberação dos metais e a geração da drenagem ácida, que se não controlados geram efluentes prejudiciais ao meio ambiente (Nordstrom & Alpers, 1999; Vera *et al.*, 2013).

Entretanto, a biolixiviação é um processo vantajoso em relação aos métodos convencionais, pois existe uma economia dos insumos utilizados em processos hidrometalúrgicos (ácidos e agentes oxidantes), uma vez que a ação bacteriana sobre os minérios produz tais insumos (Garcia Jr 1997). Além disso, é um processo com baixo consumo energético, o custo de capital para implantação dessa tecnologia e os custos operacionais são reduzidos, comparativamente aos processos convencionais, e não emite gases que são prejudiciais ao meio ambiente, como por exemplo, o SO₂, que é o agente causador da chuva ácida (Rawlings *et al.*, 2003; Garcia Jr, 1997). A principal desvantagem desta técnica é o tempo de lixiviação, que é elevado quando comparado aos métodos tradicionais, em função das características intrínsecas do processo e do metabolismo bacteriano (Watling, 2006). Todavia, devido a crescente demanda mundial por metais, estima-se que seja cada vez mais comum e rentável utilizar minérios de baixo teor para reprocessar os resíduos a fim de recuperar os metais por biolixiviação (Johnson, 2013). Contudo, a cinética de dissolução do minério é muito variável e pode mudar dependendo das associações e dos tipos de minerais presentes no mesmo (Watling, 2006).

A eficiência do processo de biolixiviação pode ser afetada por fatores ambientais, biológicos ou físico-químicos: temperatura, pH, potencial de óxido-redução (Eh), disponibilidade de gases (O₂ e CO₂), composição e concentração de bactérias, concentração de íons metálicos, interações galvânicas, recirculação da solução lixiviante, além da composição, morfologia e granulometria do metal (Rawlings, 2005; Garcia Jr & Urenha, 2001; Das *et al.*, 1999). Atualmente, 21% da produção mundial de cobre é obtida por biolixiviação, sendo o Chile responsável por 42% desta produção (Schipper *et al.*, 2013). A grande quantidade do metal é produzida, principalmente, a partir de sulfetos metálicos secundários, como a calcosita e a covelita (Watling, 2006). Em relação aos sulfetos primários de cobre, a calcopirita (CuFeS₂) é o mineral de cobre mais amplamente distribuído na natureza, porém é recalcitrante ao ataque químico e biológico (Pradhan *et al.*, 2008; Watling, 2006). Desta forma, o desenvolvimento de rotas hidrometalúrgicas, biológicas ou químicas, para o processamento de minérios calcopiríticos, especialmente de baixo teor, representa um grande desafio para a indústria do cobre (Third *et al.*, 2000; Schipper *et al.*, 2013).

Há casos isolados de utilização do processo de biolixiviação para a obtenção de cobalto (Brierley & Brierley, 2001) e zinco (Rawlings *et al.*, 2003). A extração de níquel já foi demonstrada em escala piloto em meados de 2008 por biolixiviação na planta de Talvivaara

localizada nas proximidades das cidades de Kajaani e Sotkamo (Finlândia). A produção iniciou em escala industrial do precipitado sulfetado de níquel a partir de biolixiviação em pilha de um minério poli-metálico de baixo teor, seguida por precipitação do metal com sulfeto de hidrogênio (Brierley & Brierley, 2001; Olson *et al.*, 2003). Em escala laboratorial, já foi demonstrada a obtenção de molibdênio, gálio e chumbo (Brierley & Brierley, 2001). A biolixiviação é também utilizada industrialmente para o tratamento de minérios refratários de ouro, aumentando consideravelmente o rendimento do processo de obtenção deste metal. Cerca de 5% da produção mundial de ouro é obtida de minérios submetidos ao processo de biolixiviação (Johnson *et al.*, 2013).

A extração de metais por biolixiviação pode ser realizada a partir de *dump leaching* (pilhas de rejeitos ou pilhas de estéril), *heap leaching* (pilhas de minérios) e *stirred tank* (tanques de agitação), sendo a escolha do tipo de processo baseada fundamentalmente no teor de metal no minério a ser processado (Brierley & Brierley, 2013; Rawlings, 2002). Os ambientes de biolixiviação são bastante complexos e apresentam oscilações de pH e temperatura, assim como variações na concentração de metais pesados e ânions inorgânicos. Dependendo do ambiente em que as reações de dissolução dos metais ocorrem, a acidez gerada pode ser neutralizada por minerais ou compostos básicos (principalmente carbonatos ou calcário, respectivamente); caso contrário, o local de oxidação do mineral se torna cada vez mais ácido (Johnson, 2010). Até o momento, foi isolado um número limitado de bactérias capazes de oxidar ferro e enxofre de depósitos minerais. Estas bactérias são acidofílicas, com crescimento em pH menor do que 3,0 e devem representar apenas uma pequena parte da comunidade de micro-organismos com capacidade de processar minerais (Watling, 2006).

2.1. Biodiversidade de micro-organismos em ambientes de mineração

Os micro-organismos encontrados em ambientes de mineração possuem algumas características em comum (Schippers *et al.*, 2010; Rawlings, 2005), como:

- São quimiolitotóxicos e capazes de utilizar o íon ferroso ou enxofre inorgânico (ou ambos) como fonte de energia;
- São acidofílicos, sendo que a maioria deles cresce em valores de pH que variam de 1,5 a

2,0;

- Crescem na presença de oxigênio, no entanto são capazes de utilizar outros aceptores de elétrons além do oxigênio, como por exemplo, o íon ferroso, enxofre elementar, hidrogênio;
- São capazes de fixar o dióxido de carbono e sintetizar material celular a partir do ciclo de Calvin;
- São resistentes a elevadas concentrações de cátions metálicos e ânions.

Entre as bactérias encontradas em ambientes de biolixiviação, as mais relevantes para a oxidação dos sulfetos metálicos são aquelas capazes de oxidar ferro e/ou enxofre. As bactérias mais estudadas pertencem ao gênero *Acidithiobacillus* (Kelly & Wood, 2000). Assim, *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* são bactérias Gram negativas, acidofílicas, mesofílicas, que juntamente com a termofílica moderada *A. caldus*, pertencem ao subgrupo *Gammaproteobacteria* (Halberg & Johnson, 2001). O primeiro micro-organismo envolvido na biolixiviação a ter o genoma sequenciado foi *A. ferrooxidans* (<http://cmr.jcvi.org>), e foram identificados genes associados a rotas metabólicas e/ou funções que são importantes para o processo de biolixiviação (Jerez, 2008; Valdés *et al.*, 2008a). Alguns destes genes ou proteínas codificadas por estes genes estão envolvidos nos mecanismos de captação, assimilação e metabolismo de enxofre (Valdés *et al.*, 2008b), adesão celular (Ossa Henao *et al.*, 2014), metabolismo energético na presença de íon ferroso ou enxofre (Quatrini *et al.*, 2006), estresse oxidativo (Rodrigues *et al.*, 2010) e metabolismo de carbono (Appia-Ayme *et al.*, 2006).

Tem sido observada uma grande variabilidade genética no gênero *Acidithiobacillus* e, particularmente, entre linhagens de *A. ferrooxidans*. Estas diferenças foram detectadas por diversas metodologias moleculares, como hibridização DNA-DNA, determinação do conteúdo de C+G (Harrison, 1982), RAPD (Novo *et al.*, 1996; Selenska-Pobell *et al.*, 1998; Waltenbury *et al.*, 2005), PCR dos elementos repetitivos BOX e ERIC (Selenska-Pobell *et al.*, 1998; Paulino *et al.*, 2001), sequenciamento de rDNA 16S (Pizarro *et al.*, 1996; He *et al.*, 2007), polimorfismo da região espaçadora entre os genes de rRNA 16S e 23S (Selenska-Pobell *et al.*, 1998; Bergamo *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2007) e outras.

Nas últimas décadas, as técnicas moleculares têm sido utilizadas para a investigação da diversidade microbiana e quantificação de micro-organismos envolvidos em biolixiviação (Schippers, 2007). A vantagem destas técnicas é que potencialmente todos os tipos de micro-organismos presentes podem ser detectados, enquanto que as técnicas dependentes de cultivo se

limitam na capacidade das células crescerem de acordo com as propriedades nutricionais e fisiológicas disponibilizadas. A análise das seqüências do rDNA 16S é uma das abordagens mais usadas para análise de diversidade e consiste das seguintes etapas: isolamento de DNA a partir de uma amostra ambiental, amplificação do gene de rRNA 16S com pares de oligonucleotídeos específicos, purificação dos produtos da PCR, clonagem dos produtos purificados da PCR em vetores adequados, triagem dos clones e sequenciamento da biblioteca (Mohapatra *et al.*, 2011). Alternativamente, a técnica do pirosequenciamento se consolida como uma das mais avançadas ferramentas para a investigação da diversidade usando o rDNA 16S, pois além de dispensar as etapas de clonagem apresenta maior eficiência na determinação da estrutura da comunidade (Margulies *et al.*, 2005) e permite identificar espécies pouco frequentes (Sogin *et al.*, 2006).

A análise das seqüências do gene de rRNA 16S tem sido amplamente utilizada para a caracterização da comunidade de bactérias em ambientes de mina, principalmente para identificação e estudos filogenéticos de *Acidithiobacillus*. Assim sendo, Pizarro *et al.* (1996) utilizaram seqüências parciais de rDNA 16S e polimorfismo de tamanho da região espaçadora entre os genes 16S e 23S de rRNA para identificar e caracterizar espécies de uma população bacteriana presente em amostras de minério de cobre após biolixiviação. Foram identificadas linhagens pertencentes às espécies de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, além de *Leptospirillum ferrooxidans*. A análise do rDNA 16S de amostras de sedimentos de minas de cobre e chumbo/zinco identificou a predominância de bactérias dos gêneros *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* e *Sulfobacillus* e a estrutura das comunidades foi modulada de acordo com a concentração de cobre e arsênio (He *et al.*, 2008). Ni *et al.* (2008) analisaram 35 isolados de *Acidithiobacillus* por sequenciamento do rDNA 16S e da região espaçadora entre o rDNA 16S e 23S. Esses autores observaram que os isolados foram incluídos em oito grupos filogenéticos distintos e mais, aparentemente cinco isolados representam, pelo menos, uma nova espécie do gênero *Acidithiobacillus*.

Além das bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, bactérias do gênero *Leptospirillum* também são muito frequentes em ambientes de biolixiviação (Coram & Rawlings, 2002), assim como bactérias Gram positivas pertencentes aos gêneros *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* e *Sulfobacillus* (Clark & Norris, 1996, González-Toril *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 1996). Em amostras de drenagem ácida da mina Yunfu, localizada na China, a análise do sequenciamento do rDNA 16S indicou a dominância de bactérias dos gêneros *Acidithiobacillus* e *Gallionella* (He *et*

al., 2007). Em biorreatores utilizados para o tratamento de concentrados de ouro, a análise das sequências de rDNA 16S permitiu a identificação de bactérias dos gêneros *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* e *Sphingomonas*, além da arqueia *Ferroplasma* sp (Chen *et al.*, 2007). Também podem estar presentes em ambientes de mineração arqueias termofílicas extremas capazes de oxidar enxofre e íons ferrosos como, por exemplo, as pertencentes aos gêneros *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* e *Sulfurisphaera* (Norris *et al.*, 2000).

Para melhor compreender a diversidade de micro-organismos em pilhas de biolixiviação alguns autores combinaram a abordagem molecular com as técnicas dependentes de cultivo, já que a diversidade de bactérias pode ser influenciada pelas condições físicas, químicas e microbiológicas inerentes do processo. A técnica de eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGGE), por exemplo, é utilizada para investigar a composição da comunidade microbiana, os grupos dominantes e a sua evolução espaço-temporal (He *et al.*, 2010a; He *et al.*, 2010b). Durante a biolixiviação de sulfetos de cobre em pilhas, a sucessão e a atividade de micro-organismos dependem principalmente da disponibilidade do substrato mineral (Demergasso *et al.*, 2010). Pela técnica do número mais provável (NMP) e PCR em tempo real, Demergasso *et al.* (2010) identificaram maior abundância de *A. ferrooxidans* nos primeiros estágios da biolixiviação da calcosita em que ocorre a oxidação do íon ferroso e, posteriormente, a oxidação do enxofre. Porém, a abundância de espécies foi superada nos estágios mais tardios pela população de *Leptospirillum*, responsável pela lixiviação de sulfetos com maiores potenciais de oxidação (covelita e pirita).

A complementaridade das técnicas dependentes e independentes de cultivo é mostrada por Watling *et al.* (2014) durante o período de transição da biolixiviação de minerais oxidados a minerais sulfetados nas frações da pilha de minérios e na solução de rejeitos. Utilizando o isolamento clássico, cultivos de enriquecimento e análise de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (T-RFLP), os autores observaram que a maioria dos gêneros e espécies identificadas estava presente em ambas as etapas de biolixiviação e nas soluções de rejeitos. Na solução intermediária de lixiviação foram identificadas as seguintes bactérias: *A. ferrooxidans*, *A. caldus*, *L. ferriphilium*, *Sulphobacillus thermosulfidooxidans*, *Acidiphilium cryptum*, *Acidiomicrobium ferrooxidans* e a arqueia *F. acidiphilium*.

As bactérias heterotróficas, ao contrário das quimiolitotróficas, não receberam tanta atenção no processo de dissolução dos sulfetos metálicos. Sabe-se que esses micro-organismos

podem desempenhar um papel fundamental para a ciclagem do carbono (Johnson, 2009) e nitrogênio (Sánchez-Andrea *et al.*, 2011). Delavat *et al.* (2012) mostraram que a bactéria heterotrófica *Paenibacillus* Q8 isolada de drenagem ácida de mina foi resistente a metais pesados e apresentou um importante papel na ciclagem da matéria orgânica (celulose, hemicelulose, amido), principalmente quando as condições físico-químicas de crescimento eram alteradas. Adicionalmente, alguns dos possíveis benefícios da presença de bactérias heterotróficas são auxiliar a produção de biofilmes, vitaminas, co-fatores, agentes quelantes e surfactantes (Johnson, 2008; Schippers *et al.*, 2013) ou atenuar a acidez das drenagens (Johnson, 2014) .

As informações acerca da composição de bactérias associadas a ambientes de mina podem acarretar benefícios ambientais e econômicos; bactérias com capacidade de recuperar metais podem ser isoladas e adaptadas para biolixiviar minerais ou biorremediar locais contaminados (Mishra & Rhee, 2014). Além disso, enzimas obtidas de micro-organismos de ambientes extremos, como mina de cobre, podem ser meios versáteis para o desenvolvimento sustentável em diversas aplicações industriais devido à sua maior capacidade de biodegradação e estabilidade específica sob condições extremas, melhor utilização das matérias-primas e redução da quantidade de resíduos gerados (Antranikian *et al.*, 2005). Portanto, bactérias isoladas de mina ou metabólitos gerados têm potencial para serem utilizados e/ou adaptados para processos de biolixiviação, biorremediação ou outras aplicações industriais.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a diversidade de bactérias em diferentes ambientes da Mina do Sossego e obter bactérias/consórcios de micro-organismos capazes de realizar biolixiviação e/ou produzirem compostos de interesse biotecnológico.

Objetivos Específicos

- Capítulo 1: investigar a diversidade de bactérias em diferentes ambientes da mina do Sossego por meio de uma abordagem independente de cultivo.
- Capítulo 2: avaliar a diversidade funcional e o potencial biotecnológico de bactérias heterotróficas isoladas de ambientes de mina de cobre quanto à produção de enzimas (hidrolases, monoxigenases, sulfoxidases) e compostos (sideróforos, antimicrobianos e biossurfactantes).
- Capítulo 3: obter consórcios de micro-organismos com potencial para biolixiviação de sulfeto de cobre.

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS EM AMBIENTES DE MINA DE COBRE

1.1 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração geram elevada quantidade de rejeitos e resíduos provenientes das rochas e devido à instabilidade dos metais são fontes de poluição (Salomons, 1995). Os ambientes de mina contêm elevada concentração de metais pesados, sulfato, carbonato e pH ácido resultando em condições extremas à vida (Sheoran & Sheoran, 2006). A maior parte dos trabalhos que descrevem a análise da diversidade de micro-organismos em ambientes de mineração está focada nas drenagens ácidas. Esse tipo de ambiente pode apresentar muitos nichos microbianos, mas devido ao baixo pH, elevada concentração de metais e as limitadas fontes de energia disponíveis o número de espécies encontradas é restrito (Baker & Banfield, 2003; Deneff *et al.*, 2010). Embora alguns micro-organismos acidófilos (heterótrofos e mixotróficos) sejam capazes de utilizar carbono orgânico, a maior abundância é representada por bactérias quimioautotróficas acidófilas que utilizam compostos inorgânicos como fonte de energia, tais como ferro, enxofre e, ocasionalmente, hidrogênio (Johnson, 2012).

A utilização dos métodos independentes de cultivo para a caracterização da diversidade permitiu identificar a composição e distribuição dos micro-organismos presentes em ambientes de mina, que podem ser influenciados pelo local e período da amostragem, pH, profundidade de coleta da amostra, temperatura, presença de metais, dentre outros (Tan *et al.*, 2009; Sánchez-Andrea *et al.*, 2011; Kimura *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014). Falteisek & Cepicka (2012) analisaram por bibliotecas da subunidade menor do rDNA 16S a biodiversidade de micro-organismos presentes em amostras de uma mina de sulfetos desativada e identificaram seis espécies de Archaea, 137 de Bactéria e cinco espécies de protozoários. Cada um dos três nichos principais amostrais analisados (gossan: produto do intemperismo de sulfetos, zona de oxidação ou amostras de galeria da mina contendo água ácida) apresentou diferenças na composição da comunidade e o processo de mineralização e pH foram fundamentais para determinar a composição e estrutura das comunidades.

Edberg *et al.* (2012) analisaram por pirosequenciamento a composição da comunidade de bactérias presentes em amostras da coluna estratificada de água de mina de urânio a céu aberto desativada e observaram que as características geoquímicas do ambiente influenciaram a composição da população de bactérias em função da profundidade da amostragem. Para Chen *et al.* (2013), a composição da comunidade de micro-organismos identificada a partir de rejeitos de mina de chumbo foi afetada pelo pH e teor de umidade. As sequências relacionadas à *Proteobacteria* foram predominantes nas amostras de rejeitos de mina com baixa acidez e para aquelas cujos rejeitos de mina eram extremamente ácidos predominaram sequências de *Ferroplasma*.

No presente trabalho, bibliotecas de amplicons do rDNA 16S foram utilizadas para avaliar a comunidade de bactérias presentes em solos de mina de cobre ativa brasileira por pirosequenciamento do rDNA 16S. Para isso, foram coletadas amostras de solo a partir de taludes de mina (estruturas geotécnicas) e de amostras de solo com maior conteúdo de água e vegetação no entorno da drenagem da mina.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas em fevereiro de 2011 na Mina do Sossego, localizada na Província Mineral de Carajás, em Canaã dos Carajás, sudeste do Pará nos depósitos de Sossego (605689,83 a 606690,0E e 9290194,47 a 921395,36N) e Sequeirinho (602975,51 a 604930,0E e 9289564,0 a 9291377,32N) (Tabela 1.1, Figura 1.1). Estes depósitos vulcano-sedimentares afloram na forma de uma série de morros contendo principalmente minerais sulfetados de cobre associados a metais como ouro, prata, chumbo, zinco, dentre outros. A região possui temperatura média anual de 26 °C e os períodos chuvosos ocorrem, notadamente, de novembro a maio (IDESP, 2012). Nos depósitos de Sossego e Sequeirinho foram coletadas amostras de talude (T-SO1, T-SO2, T-SE1 e T-SE2) e quatro amostras do entorno da drenagem (ED-SO1, ED-SO2, ED-SE1 e ED-SE2) (Tabela 1.1). Os taludes são compostos por materiais não detonados que afetam negativamente a percolação e a absorção da água. Além disso, os taludes são constituídos

de material *in situ* (rocha ou saprolito) e são majoritariamente desprovidos de vegetação. As drenagens são canais por onde são escoados os rejeitos resultantes da mineração ou da ação natural (chuvas). As amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento do isolamento do DNA total e realização das análises químicas. Para cada amostra foi avaliado o pH e teor (g/dm³) de matéria orgânica (MO) (Camargo *et al.*, 2009). O conteúdo de água (U) (% m/m) foi determinado por perda de massa a 65°C e a quantidade (mg/Kg) dos elementos químicos (Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, S, Fe, P, Mg, Mn, Ni, K, Na e Zn) foi realizada pela técnica de espectroscopia de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (de Andrade & de Abreu, 2006).

Tabela 1.1. Informações das amostras coletadas na Mina do Sossego.

Amostra	Localização do depósito	Tipo de amostra	Coordenadas		
			X	Y	Z (m)
ED-SO1	Sossego	Entorno da drenagem	9290537,23N	606025,89E	212,0
ED-SO2	Sossego	Entorno da drenagem	9290194,47N	606690,92E	190,8
T-SO1	Sossego	Talude	9290775,83N	605765,72E	228,0
T-SO2	Sossego	Talude	9291395,36N	605689,83E	191,7
ED-SE1	Sequeirinho	Entorno da drenagem	9289564,0N	604930,0E	218,4
ED-SE2	Sequeirinho	Entorno da drenagem	9291377,32N	603727,52E	250,7
T-SE1	Sequeirinho	Talude	9291049,04N	604290,46E	208,0
T-SE2	Sequeirinho	Talude	9290105,85N	602975,51E	196,5

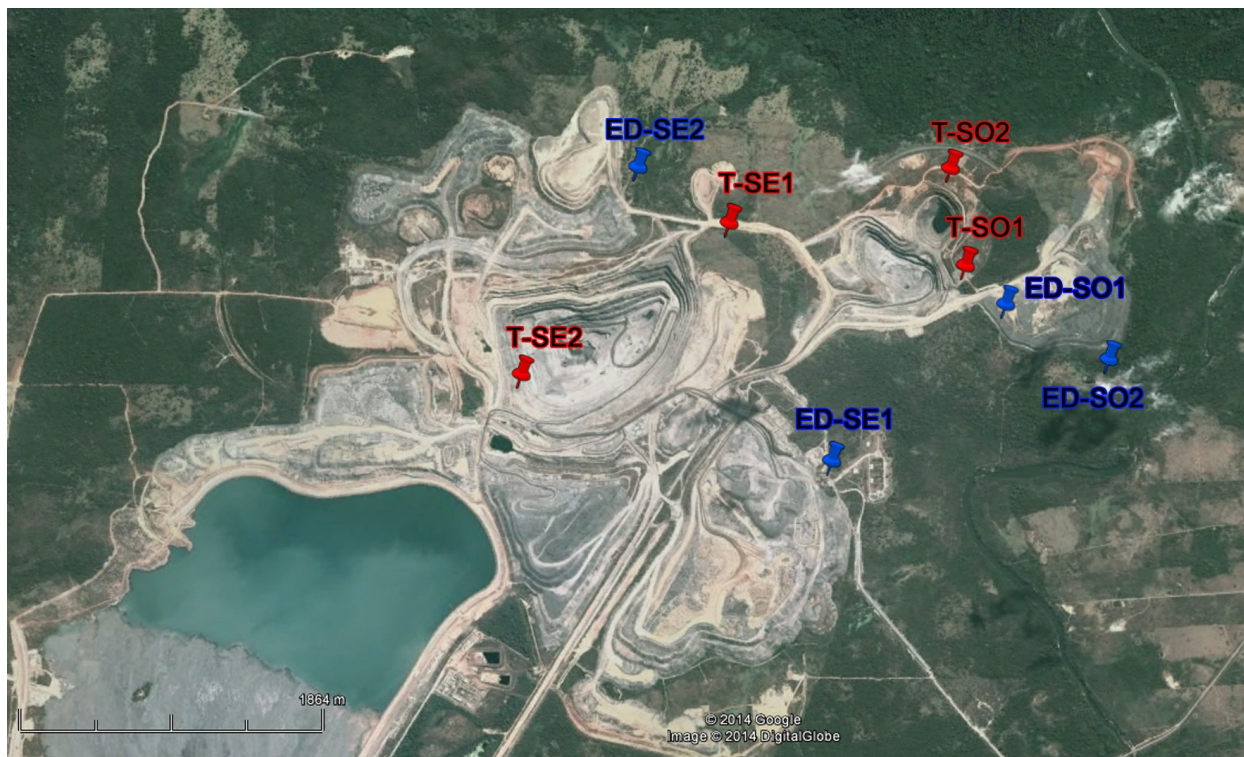


Figura 1.1. Imagem de satélite da Mina do Sossego. Mina de cobre da companhia Vale, localizada em Canaã dos Carajás, Pará. Destaque para os pontos de amostragem no depósito de Sossego, amostras T-SO1, T-SO2, ED-SO1 e ED-SO2 e no depósito de Sequeirinho: T-SE1, T-SE2, ED-SE1 e ED-SE2. Em azul, são destacadas as amostras do entorno da drenagem e, em vermelho, as amostras de talude. Fonte: Google Earth™ Mapping Service.

1.2.2 Isolamento e purificação do DNA

Todas as amostras foram processadas individualmente. O isolamento do DNA foi realizado segundo Zhou *et al.* (1996), cujas modificações são descritas a seguir. Foi misturada 1,0 g de cada amostra com um mL de tampão de extração contendo: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 100 mM fosfato de sódio pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1% (p/v) SDS e 10 µL de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram colocadas em um agitador a 225 rpm, 37 °C, por 40 min. Em seguida, para cada um mL de amostra foram adicionados 115 µL de SDS 20%. As amostras foram incubadas a 60 °C, por períodos que variaram de 30 a 45 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $6.000 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos estéreis. Os sobrenadantes foram misturados a um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e a fase aquosa foi recuperada e

misturada com 0,6 v de isopropanol. As amostras permaneceram por 1 h a -20 °C e, a seguir, foram centrifugadas a 16.000 × g por 20 min. O precipitado foi lavado com etanol 70%. O DNA foi ressuspendido em água Milli-Q, quantificado em um espectrofotômetro e armazenado a -20 °C. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1% e, em seguida, o DNA foi purificado com o auxílio do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). As amostras foram armazenadas a -20 °C.

1.2.3 Construção das bibliotecas de rDNA 16S e pirosequenciamento

A amplificação da região V3 do rDNA 16S foi feita segundo Clingenpeel *et al.* (2011) utilizando-se os *primers* 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) e 533R (TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Huse *et al.*, 2008). As reações de amplificação (volume final 25 µL) foram compostas de 5 a 10 ng de DNA, 1U de *AccuPrime Pfx[®] DNA Polymerase* (Invitrogen), 2,5 µL *Reaction Mix AccuPrime Pfx[®] 1X* (Invitrogen) e 0,6 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 94 °C por 1 min, 20 ciclos a 94 °C por 15 s – 62 °C por 30 s – 72 °C por 30 s. Depois de 20 ciclos foi feita uma nova amplificação para a inserção do *barcode* específico de cada amostra e o adaptador A e B (reação com volume final 50 µL), utilizando, aproximadamente, 5 µL do produto de amplificação da primeira PCR, 1U de *AccuPrime Pfx[®] DNA Polymerase* (Invitrogen), 5,0 µL *Reaction Mix AccuPrime Pfx[®] 1X* (Invitrogen) e 0,6 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram: 94 °C por 1 min, 5 ciclos a 94 °C por 15 s – 62 °C por 30 s – 72 °C por 30 s e extensão final a 72°C por 2 min. A Tabela 1.2 mostra os *primers* utilizados nessa segunda amplificação. Os produtos de amplificação foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), quantificados por fluorometria utilizando-se o kit *Qubit* (Invitrogen) e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. As bibliotecas de amplicons foram compostas por oito amostras: quatro do entorno da drenagem e quatro de talude. Os produtos da PCR purificados e quantificados foram misturados para obter 5000 ng de DNA, com concentração mínima de 20 ng/µL. Os produtos da amplificação foram sequenciados na plataforma 454 GS FLX (Roche) na *University of Iowa DNA Facility* (Estados Unidos).

Tabela 1.2. *Primers* utilizados no estudo. A sequência em negrito, na porção 5' corresponde ao adaptador, seguida da sequência “key” TCAG, a sequência em vermelho corresponde ao *barcode* específico de cada amostra e, em seguida, a sequência do *primer* 338F ou 533R.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>
338F_454A1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG ACGAGT GCGT ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG ACGCTCGACA ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AGACGCACTC ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AGCACTGTAG ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG ATCAGACACG ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG ATATCGCGAG ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CGTGTCTCTA ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
338F_454A8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CTCGCGTGTCTC ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
533R_454B	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC

Primer utilizado para cada amostra: 338F_454A1: ED-SO1; 338F_454A2: T-SE1; 338F_454A3: T-SE2; 338F_454A4: ED-SE2; 338F_454A5: T-SO2; 338F_454A6: ED-SE1; 338F_454A7: T-SO1; 338F_454A8: ED-SO2.

1.2.4 Processamento das sequências e análises estatísticas

O processamento inicial das sequências foi realizado a partir do programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* - QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). Inicialmente, o arquivo contendo as sequências geradas pelo pirosequenciamento em formato ssf foi convertido em formatos fna pelo *script*: process_sff.py. A partir do formato fna as sequências foram editadas para a remoção de regiões de baixa qualidade. As diferentes bibliotecas foram identificadas e separadas pela sequência exata do *barcode* utilizando o *script*: split_libraries.py. As sequências foram triadas de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho entre 140 - 250 pb, qualidade mínima de 25 e tamanho máximo de homopolímeros igual a 6. Não foram admitidas bases ambíguas ou *mismatches* na sequência de *primers* e presença de quimeras, sendo essa avaliada por meio do *script*: identify_chimeric.py. Com o auxílio do *script*: pick_outs_through_otu_table.py as sequências foram agrupadas em *Operational Taxonomic Units* (OTU), considerando-se uma distância evolutiva $\geq 3\%$ (Kunin *et al.*, 2010) e a classificação taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados do *Ribosomal Database Project II* (Cole *et al.*, 2005) com 80% de confiança. As curvas de rarefação foram construídas com o auxílio do programa QIIME. O índice de cobertura (C) foi calculado de acordo com a fórmula $C = 1 - n_i/N$, onde n_i é o número de OTUs que foram amostradas apenas uma vez (*singletons*) e N é o número total de sequências na amostra. O índice de Shannon (H') foi calculado de acordo com a fórmula $H' = -\sum p_i \ln p_i$, onde p_i indica a proporção de OTU i relativa ao número total de OTUs. O índice

de Berger-Parker (d) foi utilizado para determinar a importância proporcional das OTUs mais abundantes.

Para as análises das comunidades foi utilizado o software PAST, (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) utilizando os dados de frequência relativa das OTUs em cada amostra. O escalonamento multidimensional não métrico (n-MDS) foi usado a fim de determinar a similaridade entre as comunidades e os parâmetros físico-químicos. A matriz de dissimilaridade de *Bray-Curtis* foi calculada com base na abundância relativa de OTUs. As similaridades foram apresentadas em um espaço multidimensional, onde as amostras mais similares foram agrupadas. Para estimar a distância genética, foi empregada a análise de agrupamento pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), com base na matriz de dissimilaridade de *Bray-Curtis*, utilizando as abundâncias relativas de OTUs de todas as amostras. Para validar a estabilidade dos agrupamentos obtidos a partir da matriz de dissimilaridade a análise do *bootstrap* foi conduzida considerando-se 1000 reamostragens. A análise de similaridades (ANOSIM) avaliou a significância entre as diferenças na composição das comunidades entre vários *clusters* de n-MDS: entorno da drenagem e talude. Esta análise utilizou um critério de 9999 permutações e foi conduzida com base na matriz de dissimilaridade de *Bray-Curtis*. A análise de percentual de similaridade (SIMPER) foi realizada para identificar quais foram os micro-organismos responsáveis pelas diferenças observadas na composição da comunidade após a classificação taxonômica de cada OTU. A correlação de *Spearman* rs foi usada para testar a relação entre as OTUs mais abundantes identificadas pela análise do SIMPER e os parâmetros (elementos químicos, matéria orgânica e conteúdo de água) analisados, considerando o nível de significância 0,05.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Caracterização das amostras

Foram coletadas oito amostras na Mina do Sossego, distribuídas entre os depósitos de Sossego e Sequeirinho. No depósito de Sossego foram coletadas as amostras de talude T-SO1 e T-SO2 e as amostras do entorno da drenagem ED-SO1 e ED-SO2. No depósito de Sequeirinho

foram coletadas as amostras de talude T-SE1 e T-SE2 e as amostras do entorno da drenagem ED-SE1 e ED-SE2 (Figura 1.2). Estas amostras se diferenciaram quanto à localização, classificação do ambiente, valor de pH, concentração de elementos químicos, conteúdo de água e matéria orgânica (Tabela 1.3).

As amostras de mina foram caracterizadas por valores de pH próximos da neutralidade. O pH das amostras foi medido e apresentou variações de 6,2 a 7,6, para as amostras de talude e 5,0 a 7,6 para as amostras do entorno da drenagem. Este valor de pH neutro pode ter sido influenciado pela atividade mineradora do local, pois Sossego é uma mina de cobre ativa. Por isso, compostos básicos (geralmente calcário) são adicionados para neutralizar a drenagem resultante da atividade de extração dos minerais, em cumprimento das leis ambientais vigentes. O conteúdo de água (U) variou de 14,6 a 27,1% (% m/m) A quantidade de matéria orgânica apresentou diferenças entre as amostras, variando de 4 a 40 g/dm³. Os elementos químicos analisados Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, S, Fe, P, Mg, Mn, Ni, K e Zn apresentaram diferentes concentrações.

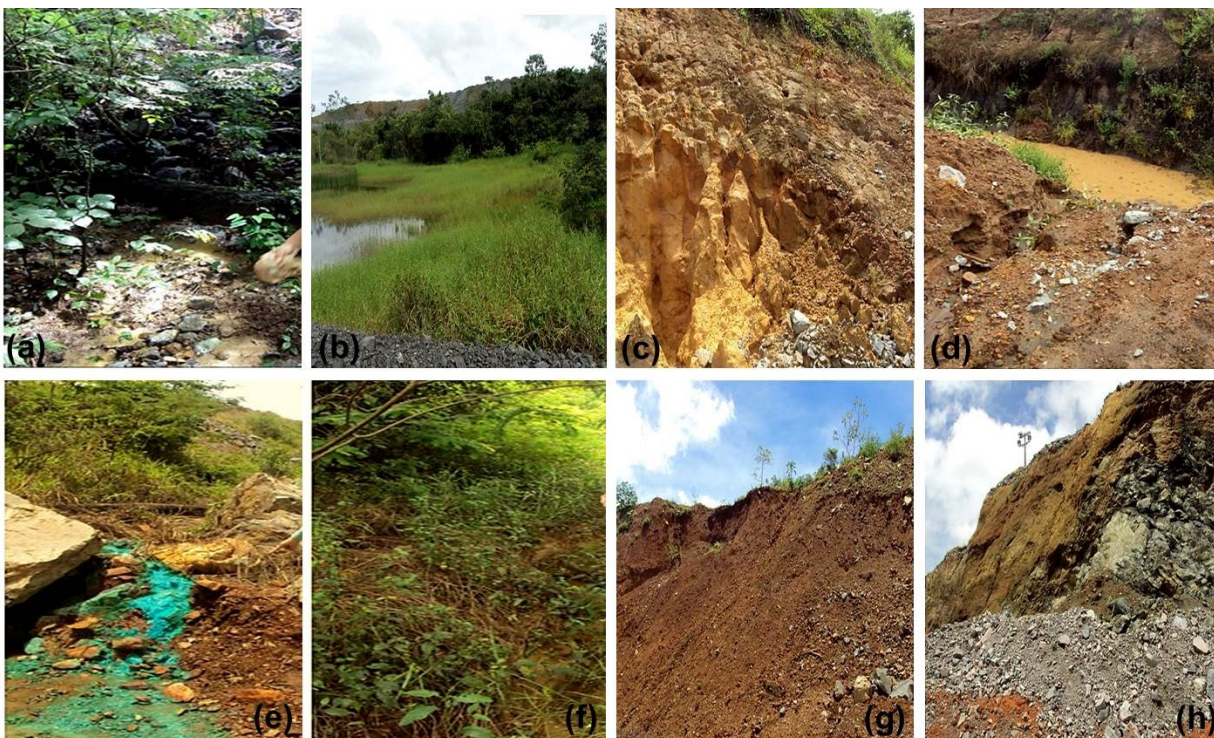


Figura 1.2. Amostras de diferentes pontos da mina do Sossego, mina de cobre da Companhia Vale, localizada em Canaã dos Carajás, Pará. (a) Amostra ED-SO1 – entorno da drenagem natural de depósito estéril do Sossego; (b) Amostra ED-SO2 – entorno da drenagem a jusante do depósito de estéril do depósito do Sossego, próximo ao dique Taboa; (c) T-SO1 – talude próximo à entrada do depósito do Sossego; (d) Amostra T-SO2 – talude a jusante drenagem da cava do Sossego Amostra; (e) Amostra ED-SE1 – entorno da drenagem do depósito de misto em Sequeirinho; (f) Amostra ED-SE2 – entorno da drenagem a jusante do depósito de oxidado verde de Sequeirinho; (g) Amostra T-SE1 – talude leste do depósito do Sequeirinho, próximo à superfície saprolito roxo; (h) Amostra T-SE2 – talude próximo à falha de contato com o minério do depósito de Sequeirinho.

Tabela 1.3. Caracterização físico-química das amostras do entorno da drenagem e talude coletadas na mina do Sossego.

Descrição	ED-SO1	ED-SO2	ED-SE1	ED-SE2	T-SO1	T-SO2	T-SE1	T-SE2
Cd	<0,4	<0,4	0,7	<0,4	0,7	<0,4	1,4	0,9
Ca	3300	640	680	1400	190	940	1900	4400
Pb	<3,0	2,9	14,6	2,2	17,6	3,8	4,1	3,9
Cu	631	43,6	7650	4480	4810	7130	2650	5090
Cr	3,8	7,9	58,3	6,9	3,8	14	30,4	170
S	300	160	780	400	90	129000	100	140
Fe	9540	6230	38070	13040	41690	11240	67030	44900
P	400	30	460	580	350	470	800	400
Mg	2400	100	790	2000	5900	1800	5800	19300
Mn	163	244	916	189	753	117	474	814
Ni	14,6	<2,4	46,6	43,6	60,4	29,2	156	513
K	5,8	<1,0	<1,0	6	<1,0	15,6	30,1	<1,0
Na	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Zn	7,7	<3,3	12,7	11,5	41,2	34,5	12,4	51,8
MO	11,0	21,0	40,0	9,0	11,0	22,0	8,0	4,0
U	22,7	22,4	27,1	19,9	14,6	22,1	18,0	18,2
pH	7,6	7	5	7,1	6,2	6,3	6,5	7,6

Valores dos elementos químicos expressos em mg/kg. MO: matéria orgânica expresso (g/dm³); U: conteúdo de água (% m/m).

1.3.2 Isolamento de DNA das amostras de mina e construção de bibliotecas para pirosequenciamento

Para otimização do procedimento para o isolamento de DNA das amostras de mina, vários métodos de extração de DNA foram usados, tais como Pizarro *et al.* (1996), Zhou *et al.* (1996), Zeng *et al.* (2008), Matheson *et al.* (2009) e pelo kit *Power SoilTM DNA Isolation* (MoBio). Somente a metodologia modificada de Zhou *et al.* (1996) permitiu isolar DNA de boa qualidade para todas as amostras. Um fator que pode ter interferido o isolamento e a amplificação do DNA pode ter sido a composição mineralógica das amostras, pois de acordo com Demeke & Jenkins (2010), a presença de certos compostos e moléculas, principalmente de ácidos húmicos e cátions divalentes, podem provocar a inibição de processos químicos e enzimáticos da PCR. Segundo Matheson *et al.* (2009), o cobre pode provocar inibição da atuação da Taq DNA polimerase durante a amplificação do DNA. As amostras ambientais foram obtidas a partir de mina de cobre, com elevada concentração de cátions, tais como Mg, Mn e Ca, que podem ter influenciado o isolamento do DNA pelas metodologias testadas, exceto a de Zhou *et al.* (1996). Em relação à

amplificação do DNA das amostras, foram utilizadas duas etapas da PCR, pois de acordo com Berry *et al.* (2011), o uso de duas etapas da PCR aumenta a reprodutibilidade e a cobertura da diversidade genética das bibliotecas no pirosequenciamento.

1.3.3 Análise da diversidade por pirosequenciamento

1.3.3.1 Análises dos dados obtidos por pirosequenciamento

O pirosequenciamento das oito amostras de ambientes de mina gerou 106591 sequências. Essas sequências foram agrupadas, classificadas em OTUs e para as análises de diversidade foram removidas as sequências que não apresentaram classificação e aquelas classificadas como cloroplastos ou arqueias. A fim de minimizar a superestimação de filotipos raros, a análise de clusterização foi realizada com divergências genéticas $\geq 2\%$ (Huse *et al.*, 2010). Como resultado, foram obtidas 105563 sequências de alta qualidade, que variaram de 6593 a 23690, com média de 13195 sequências por amostra. Estas sequências foram classificadas em 10978 OTUs, sendo que mais de 48% foram *singletons* (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Índices resultantes da análise do pirosequenciamento e estimativas da diversidade.

Amostra	Sequências (inclui singletons)	Número de OTUs	Cobertura (C) (%)	Shannon (H')	Berger- Parker (d)	Localização	Tipo de amostra
ED-SO1	23690	4257	90,70	6,94	0,06	Sossego	entorno da drenagem
ED-SO2	11700	3027	86,04	6,97	0,03	Sossego	
ED-SE1	10056	738	96,35	4,39	0,12	Sequeirinho	
ED-SE2	18514	2272	93,71	5,64	0,14	Sequeirinho	
T-SO1	7850	968	92,36	4,47	0,16	Sossego	talude
T-SO2	7568	1438	89,05	5,27	0,17	Sossego	
T-SE1	19592	2374	92,82	4,81	0,22	Sequeirinho	
T-SE2	6593	1180	90,14	5,11	0,15	Sequeirinho	

O valor médio da cobertura (C) variou entre 86 a 96%, sendo a média de 91%, mostrando que a amostragem foi suficientemente boa para gerar OTUs representativas (Tabela 1.4). Os maiores

índices de Shannon (H') foram observados para as OTUs presentes em amostras do entorno da drenagem ($5,98 \pm 1,23$). Estes tipos de amostra mostraram uma maior diversidade quando comparadas com as OTUs encontradas em amostras de talude ($4,91 \pm 0,35$). O índice de Berger-Parker (d), expressa a importância proporcional de OTUs mais dominantes de uma determinada amostra e as amostras de talude ($0,18 \pm 0,03$) apresentaram maior abundância de OTUs do que as amostras do entorno da drenagem ($0,09 \pm 0,05$) (Tabela 1.4). Isto mostra que as amostras de talude apresentaram OTUs com maior frequência de contribuição que as amostras do entorno da drenagem.

1.3.3.2 Composição taxonômica e análise das comunidades

O pirosequenciamento das amostras de ambiente de mina possibilitou a classificação das bactérias em 36 filos e cinco classes de Proteobacteria. Para todas as amostras analisadas, os filotipos mais abundantes foram representados pelas sequências classificadas em *Firmicutes* (19,5%), *Alphaproteobacteria* (19,0%), *Actinobacteria* (9,7%), *Acidobacteria* (8,6%), *Chloroflexi* (3,4%), *Gemmatimonadetes* (3,6%) e *Bacteroidetes* (2,9%) (Tabela 1.5). Essa composição de filotipos mais abundantes encontrados foi similar à composição taxonômica encontrada por Sánchez-Andrea *et al.* (2011), a partir de amostras de sedimentos do Rio Tinto, por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e clonagem do rDNA 16S, cuja comunidade foi composta por *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*.

Tabela 1.5. Composição de bactérias em mina de cobre ativa. Filotipos abundantes observados em dois ambientes (entorno da drenagem e talude) e a sua porcentagem de contribuição.

	Talude (%)	Entorno da drenagem (%)	Total (%)
<i>Acidobacteria</i> *	3,6	13,8	8,8
<i>Actinobacteria</i>	8,3	11,2	9,6
<i>Alphaproteobacteria</i>	16,7	21,2	19,0
<i>Bacteroidetes</i>	1,3	4,5	3,7
<i>Betaproteobacteria</i>	10,0	6,5	8,2
<i>Chloroflexi</i> *	0,9	6,0	3,4
<i>Deltaproteobacteria</i>	1,2	3,0	2,1
<i>Firmicutes</i> **	36,0	3,1	19,5
<i>Gammaproteobacteria</i> *	11,2	2,1	6,7
<i>Gemmatimonadetes</i>	2,3	4,8	3,6
<i>Nitrospirae</i>	0,3	1,4	0,8
<i>TM7</i>	0,2	1,6	0,9
Outros filos	2,7	6,5	3,9
Bactérias não classificadas	5,3	14,3	9,8

Teste t: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$

As abundâncias relativas dos principais filos identificados praticamente não se modificaram considerando os depósitos de Sossego e Sequeirinho, exceto quando se considerou a classificação do ambiente: entorno da drenagem e talude. De acordo com a classificação do ambiente, foram observadas diferenças da abundância relativa da comunidade de bactérias em filos e classe *Proteobacteria* para cada amostra (Figura 1.3).

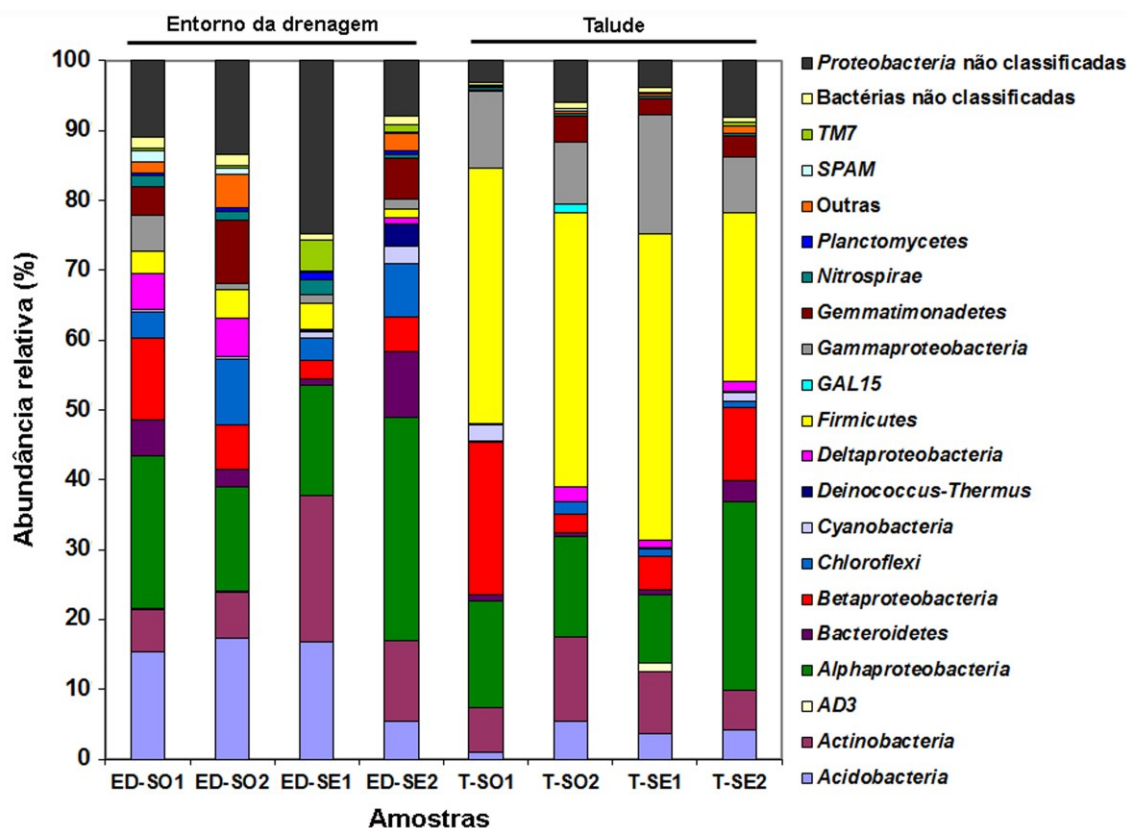


Figura 1.3. Abundância relativa de filos e classe *Proteobacteria* presentes na comunidade de bactérias do entorno da drenagem e talude. Foram descritos somente grupos filogenéticos que representaram sequências classificadas > 1% em pelo menos uma das amostras. A categoria “outras bactérias” se refere aos grupos que representaram sequências classificadas $\leq$ 1% das amostras.

Os principais filos e classe *Proteobacteria* responsáveis pela diferença da composição de bactérias foram: *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* e *Gammaproteobacteria* (Tabela 1.5). Em relação às amostras de talude, foi observada uma alta proporção de sequências classificadas em *Firmicutes* (36,0%), *Betaproteobacteria* (10,0%) e *Gammaproteobacteria* (11,2%). Para as amostras do entorno da drenagem, predominaram as sequências de *Acidobacteria* (13,8%), *Actinobacteria* (11,2%), *Chloroflexi* (6,0%), *Deltaproteobacteria* (3,0%), *Gemmatimonadetes* (4,8%) e *Bacteroidetes* (4,5%), *TM7* (1,6%) e *Nitrospirae* (1,4%) (Tabela 1.5). Pouco é conhecido sobre o candidato a filo TM7, que até o momento é composto apenas por sequências do rDNA 16S, sem representantes cultiváveis, recuperadas de diversos ambientes como do trato digestório humano (Stearns, *et al.*, 2011), solo (Luo *et al.*, 2009), drenagem ácida de mina (Hao *et al.*, 2007) e ambientes de mineração de ouro (Rastogi *et al.*, 2009). As OTUs que representaram os filos ou classe de *Proteobacteria* raros ($\leq$ 1% de todas as sequências

classificadas) mais representativas para as amostras de talude e do entorno da drenagem incluem *Epsilonproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Fusobacteria*, *Elusimicrobia*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* e os candidatos a filo *TM7*, *AD3*, *GAL15*, *GN02*, *GOUTA4*, *NC10*, *OP3*, *SBR1093*, *SC3*, *SC4*, *SM2F11*, *SPAM*, *TG3*, *BRC1*, *CCM11b*, *WS3*, *ZB2* e *TM6*.

A análise de similaridades (ANOSIM) mostrou que a composição de OTUs foi significativamente diferente entre as comunidades de bactérias encontradas nas amostras do entorno da drenagem e de talude ($R = 0,6458$; $p = 0,0291$). Além disso, a análise de agrupamento pelo método UPGMA com base na matriz de dissimilaridade de *Bray-Curtis* revelou que as OTUs obtidas do pirosequenciamento se diferenciaram em dois grandes grupos que correspondem à classificação do ambiente (Figura 1.4). Tanto as amostras de talude como as do entorno da drenagem estão mais relacionadas filogeneticamente dentro de cada grupo, corroborando com a análise ANOSIM. Para as amostras de talude, a comunidade de bactérias foi bastante similar, mas distante para aquelas amostras associadas ao entorno da drenagem, com exceção da amostra ED-SE1, que foi a mais dissimilar e se agrupou a parte.

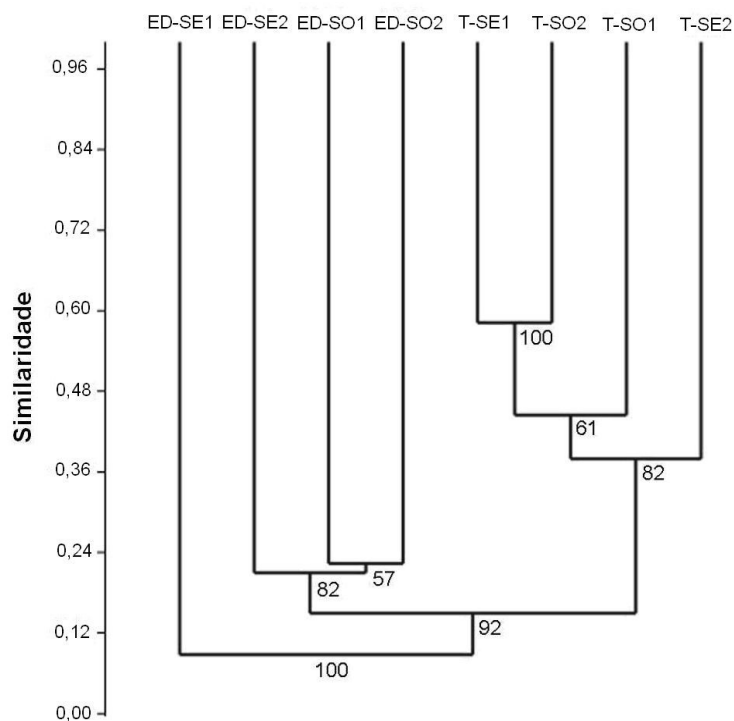


Figura 1.4. Dendrograma gerado pelo método UPGMA pelas dissimilaridades genéticas, com base na matriz de *Bray-Curtis*, utilizando a abundância relativa de OTUs das amostras de talude e do entorno da drenagem.

Para avaliar a possível relação entre a estrutura das comunidades microbianas com o tipo de amostra e os parâmetros físico-químicos foi realizada a análise do escalonamento multidimensional não métrico (n-MDS). A qualidade do ajuste da representatividade do n-MDS foi boa, pois apresentou um baixo valor de estresse (0,151). Esta análise mostrou que há diferenças na estrutura da comunidade de bactérias de diferentes ambientes de mina: houve um agrupamento entre as amostras de talude (T-SO2, T-SO1, T-SE1 e T-SE2) e as amostras do entorno da drenagem (ED-SO1, ED-SE2, ED-SE1 e ED-SO2) (Figura 1.5). Além disso, dentre os vários parâmetros analisados, observou-se que a matéria orgânica e o conteúdo de água influenciaram significativamente a comunidade de bactérias das amostras do entorno da drenagem, em que o aumento do conteúdo da matéria orgânica e água foram relacionados com o aumento da diversidade de bactérias. Estes resultados sugerem que a presença de água e de matéria orgânica podem ser mais importantes na determinação e diferenciação das comunidades microbianas das amostras do entorno da drenagem e de talude do que propriamente os elementos químicos e o pH das amostras. Kuang *et al.* (2013) encontraram em ambientes de mineração da China uma diversidade de micro-organismos moderadamente maior em locais com pHs mais baixos, a qual foi atribuída ao elevado teor de carbono orgânico. De acordo com Zhou *et al.* (2002) e Stach *et al.* (2003) existe uma correlação positiva entre o conteúdo de carbono do *habitat* e a diversidade de espécies.

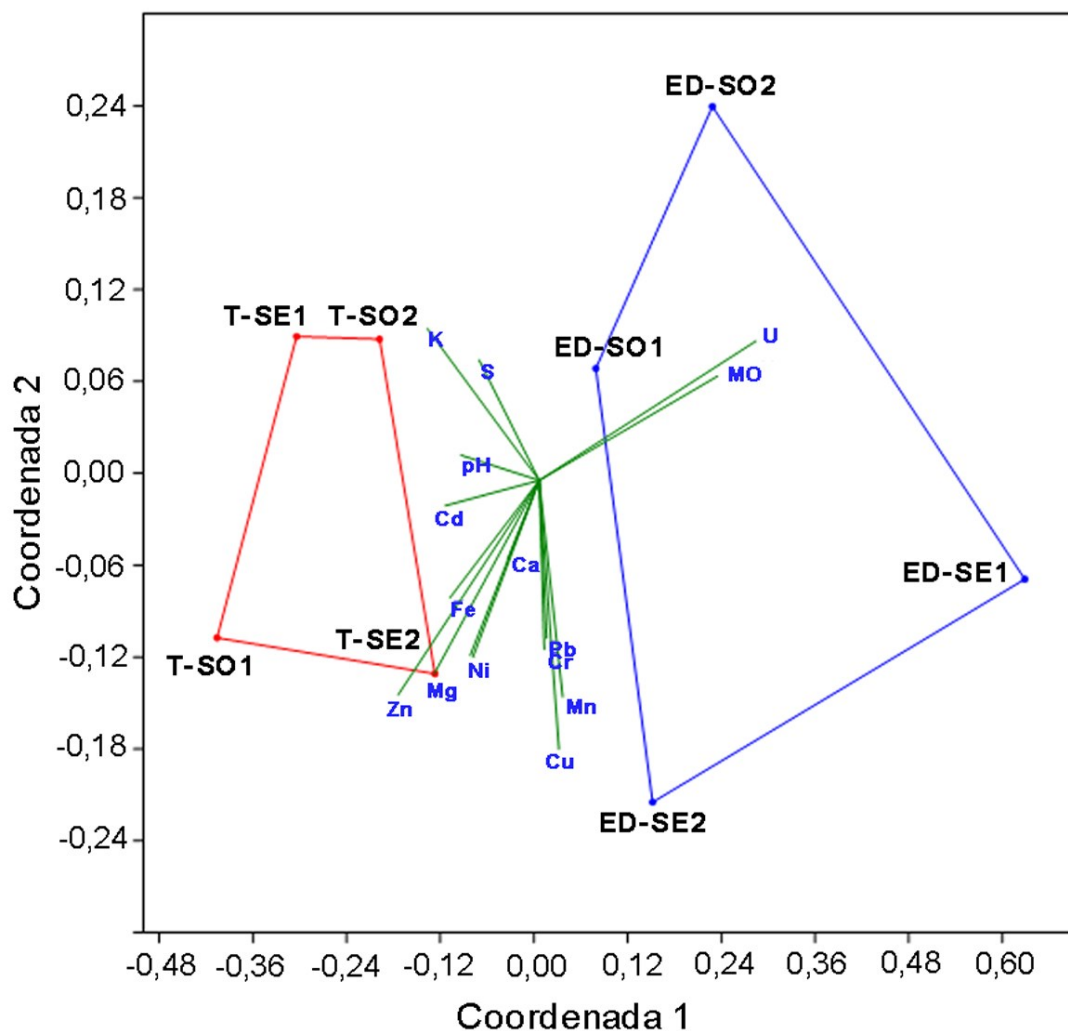


Figura 1.5. Escalonamento multimensional não métrico (n-MDS) para as duas primeiras dimensões, baseadas na matriz de dissimilaridade de *Bray-Curtis*. Comparação das amostras de talude (T-SE1, T-SE2, T-SO2 e T-SO1) e do entorno da drenagem (ED-SE2, ED-SE1, ED-SO2 e ED-SO1), elementos químicos (Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, S, Fe, P, Mg, Mn, Ni e Zn), pH, conteúdo de água (U) e matéria orgânica (MO).

As amostras de talude apresentaram condições mais restritas à vida microbiana quando comparadas às amostras do entorno da drenagem, pois apresentaram menor disponibilidade de água e a cobertura vegetal é escassa ou ausente. Tanto a disponibilidade de água como a matéria orgânica já foram reportadas por influenciarem a abundância e diversidade de bactérias em diferentes ambientes (Pointing *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2009; Pasternak *et al.*, 2013). As condições extremas dos taludes afetaram a composição da comunidade de bactérias já que apenas três filos: *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*, corresponderam a mais de 80% das OTUs

responsáveis pela formação da comunidade. No caso das amostras do entorno da drenagem, a presença de vegetação e o aumento da disponibilidade de água podem ter contribuído para a maior diversidade de bactérias.

1.3.3.3 OTUs abundantes

Pela análise do SIMPER, foi possível identificar as OTUs mais representativas e responsáveis pela discriminação de cada tipo de amostra (Tabela 1.6). Nesta tabela pode ser observado que as OTUs mais representativas para as amostras de talude apresentaram maior proporção de contribuição do que as amostras do entorno da drenagem, sugerindo maior frequência de OTUs mais abundantes. Esse resultado corrobora com o índice Berger-Parker calculado anteriormente para as amostras de talude ($d = 0,18$), cujo valor observado foi maior (Tabela 1.4). As amostras do entorno da drenagem, por outro lado, apresentaram as OTUs distribuídas proporcionalmente e pode indicar que as OTUs dessas amostras sejam menos abundantes, porém mais diversas.

Tabela 1.6. OTUs mais abundantes. Média da frequência das OTUs identificadas pela análise do SIMPER responsáveis pelas maiores diferenças da composição da comunidade de bactérias do entorno da drenagem e de talude.

OTU	Classificação		Contribuição para diferenciação (%)	Média da abundância relative em:	
	RDP [bootstrap value]	Blastn (identidade)		Talude	Entorno da drenagem
9730	<i>Bacillus</i> [82%]	JN800343.1 (100%)	9,57	16,70	0,08
4623	<i>Bacillus</i> [92%]	AM900775.1 (99%)	2,34	4,18	0,11
11297	<i>Actinobacteria</i> [86%]	GU202408.1 (99%)	1,80	0,23	3,07
10227	<i>Actinobacteria</i> [99%]	JN596541.1 (99%)	1,63	2,90	0,07
8512	<i>Bacillus</i> [54%]	JX575606.1 (100%)	1,58	2,77	0,04
9116	<i>Bacillus</i> [72%]	KC236438.1 (100%)	1,51	2,62	0
8630	<i>Achromobacter</i> [100%]	AB773113.1 (99%)	1,49	2,87	0,29
2377	<i>Stenotrophomonas</i> [65%]	KF958492.1 (100%)	1,40	2,61	0,19
5304	<i>Delftia</i> [70%]	KF511885.1 (97%)	1,25	2,34	0,20
3339	<i>Acidobacteria</i> [100%]	KF287747.1 (100%)	1,13	0,16	2,10
4064	<i>Acidobacteria</i> [77%]	JF988800.1 (99%)	1,06	0,04	1,88
10126	<i>Rhizobiales</i> [78%]	KF226071.1 (99%)	1,03	0,29	2,08
6956	<i>Alphaproteobacteria</i> [100%]	GU936374.1 (100%)	0,81	0,15	1,54
7208	<i>Caulobacteraceae</i> [100%]	KF787079.1 (99%)	0,68	1,59	0,55
3663	<i>Actinobacteria</i> [75%]	JF990228.1 (100%)	0,47	0,20	1,03

A fim de avaliar a possível relação entre as principais OTUs responsáveis por discriminar as amostras de talude e entorno da drenagem os dados referentes aos parâmetros físico-químicos foram analisados como um conjunto de dados agrupados. Nessa análise, somente as correlações significativas ($p < 0,05$) foram listadas: as OTUs classificadas em *Firmicutes* (OTU 4623), *Actinobacteria* (OTU 11297) e *Betaproteobacteria* (OTU 5304, OTU 8630) apresentaram correlação positiva com os metais; *Alphaproteobacteria* (OTU 10126) correlacionou

positivamente com o conteúdo de água e *Acidobacteria* (OTU 3339) se correlacionou positivamente com a matéria orgânica e o conteúdo de água. Por outro lado, as OTUs classificadas em *Actinobacteria* (OTU 3663), *Acidobacteria* (OTU 3339) e *Alphaproteobacteria* (OTU 10126) apresentaram correlação negativa com os metais e *Firmicutes* (OTUs 9730 e 4623) apresentou correlação negativa com o conteúdo de água (Tabela 1.7).

Tabela 1.7. Coeficientes de correlação de *Spearman* obtidos para as OTUs mais abundantes, elementos químicos, matéria orgânica (MO) e conteúdo de água (U).

OTU	Cd	Pb	Fe	Mg	Ni	Zn	MO	U
9730								-0,74
11297						0.74		
4623						0.83		-0,74
8630			0.81	0.74	0.83	0.86*		
5304			0.83	0.83	0.86*	0.88*		
3339	-0.83		-0.74	-0.81	-0.76		0.90*	0,76*
4064				-0,83				
10126		-0.86*	-0.74					0,95*
3663						-0.76		0,76

(*) $p < 0,01$.

A OTU 9730 foi associada às amostras de talude contribuindo em média com 16% para a composição da comunidade. Esta OTU foi classificada como *Bacillus*, assim como as OTUs 4623, 8512 e 9116, que também estão associadas aos *Bacillus* e somadas representam, aproximadamente, 26% da composição de bactérias do talude (Tabela 1.6). Por isso, as OTUs desse gênero contribuíram significativamente para a maior dominância de OTUs nas amostras de talude (Tabela 1.6) e, de acordo com a classificação do ambiente, foram as principais responsáveis pela discriminação das amostras. Além disso, a OTU 4623 apresentou correlação positiva com o zinco e correlação negativa com o conteúdo de água (Tabela 1.7). O gênero *Bacillus* compreende uma grande diversidade de espécies, com potencial metabólico adaptado para sobreviver em condições extremas, pois são capazes de formar endosporos (Nicholson, 2002) e, adicionalmente, apresentam resistência a metais pesados (Choudhary *et al.*, 2012), sendo que algumas espécies são capazes de reduzir Fe^{3+} e Mn^{4+} (Boone *et al.*, 1995) outras, como *Bacillus thioparus*, crescem de forma quimioautotrófica e são capazes oxidar o tiosulfato a sulfato (Pérez-Ibarra *et al.*, 2007).

A OTU 8230, classificada como *Sphingomonas* foi encontrada em ambos os tipos de amostras (aproximadamente 6%). Linhagens de *Sphingomonas* foram capazes de metabolizar o composto fenólico clorado triclosan (Kim *et al.*, 2011) e uma série de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, tais como tolueno, xileno, naftaleno, sendo algumas resistentes à radiação ultravioleta (Baraniecki *et al.*, 2002). Com relação à biodegradação de metais pesados, o gênero mais importante responsável pela remoção de cobre em plantas de tratamento de água subterrânea foi *Sphingomonas* (Vílchez *et al.*, 2007) e a linhagem *Sphingomonas* sp BSAR-1 que expressa elevadas concentrações da proteína fosfatase alcalina (Phok) foi capaz de bioprecipitar urânio em soluções básicas e essa propriedade foi intensificada quando a proteína PhoK foi super expressa em *Escherichia coli* (Nilgiriwala *et al.*, 2008). Altimira *et al.* (2012) identificaram em *Sphingomonas* a presença de genes que codificam oxidases múltiplas de cobre, que estão envolvidas com a resistência da bactéria ao cobre. A presença de uma OTU pertencente a este gênero em ambos os tipos de amostras destaca a importância da OTU 8230 para sobreviver na presença de compostos tóxicos em ambiente de mina de cobre, sendo assim uma boa candidata para estudos de biorremediação em ambientes contaminados por metais. Outras *Alphaproteobacteria* abundantes pela análise do SIMPER foram: a OTU 10126 (*Rhizobiales*) presente em amostras do entorno da drenagem e a OTU 7208 (*Caulobacterales*) das amostras de talude. Essas ordens incluem importantes gêneros de bactérias envolvidas com ciclo do nitrogênio (Dubbs & Robert Tabita, 2004) e a abundância dessas OTUs pode estar associada à produção primária de energia.

Outro importante filo observado foi *Actinobacteria*, representadas pelas OTUs 11297 e 3663 (entorno da drenagem) e 10227 (talude). As actinobactérias, dependendo do táxon, podem ser móveis ou sésseis, produzem estruturas complexas miceliais ou corpos de esporulação e são importantes para a biodegradação da matéria orgânica e de compostos inorgânicos tóxicos (Alvarez *et al.*, 2012). Além disso, *Actinobacteria* abrange o grupo dos principais filos presentes em ecossistemas com alto teor de metais (Baker & Banfield, 2003), como as bactérias *Ferrimicrobium acidiphilum* e *Acidimicrobium ferrooxidans*, que são capazes de oxidar Fe^{2+} (Rawlings & Johnson, 2007). A OTU 11297, por exemplo, apresentou correlação positiva com o zinco, enquanto a OTU 3663 exibiu correlação positiva com o conteúdo de água (Tabela 1.7). Os principais fatores ecológicos que influenciam a atividade e a distribuição das actinobactérias no solo são a disponibilidade de nutrientes, pH, salinidade, temperatura e radiação (Trujillo, 2008).

Assim, a maior proporção de *Actinobacteria* em amostras do entorno da drenagem pode estar associada à maior disponibilidade de nutrientes nesses ambientes. No entanto, a significativa presença de *Actinobacteria* em amostras de talude sugere versatilidade metabólica deste tipo de micro-organismo para a obtenção de energia, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos.

As OTUs 8630 e 5304, classificadas como *Betaproteobacteria*, apresentaram similaridade com as sequências do rDNA 16S de *Achromobacter* e *Delftia*, respectivamente (Tabela 1.6). Essas OTUs foram positivamente correlacionadas com a presença de ferro, magnésio, níquel e zinco (Tabela 1.7). Bactérias do gênero *Achromobacter* isoladas de ambiente contaminado com chumbo foram tolerantes a diversos tipos de metais, tais como cobre, zinco e cádmio (Trajanovska *et al.*, 1997). Resistência a metais também foi relatada em *Delftia*, sendo algumas espécies capazes de tolerar elevadas concentrações de cromo e chumbo (Ubalde *et al.*, 2012). Em ambientes de mineração, alguns gêneros como *Gallionella* (neutrófilo) e *Thiomonas* (acidófilo moderado) apresentam a capacidade de oxidar Fe^{2+} e, no caso de *Thiomonas*, além do Fe^{2+} , os compostos tiosulfato e arsenito (Halberg, 2010). Além disso, membros da família *Comamonadaceae* são capazes de crescer em baixa disponibilidade de nutrientes e podem realizar a desnitrificação (Wen *et al.*, 1999), processo pelo qual o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso. Alguns micro-organismos do gênero *Acidovorax* também são capazes de oxidar Fe^{2+} na presença de ácidos orgânicos (Muehe *et al.*, 2009). A classe *Betaproteobacteria* foi mais abundante nas amostras de talude (10,0%), mas também foi representativa nas amostras do entorno da drenagem (6,5%), sugerindo que elas possam estar envolvidas no ciclo do nitrogênio e do ferro.

A classe *Gammaproteobacteria* foi importante para composição da comunidade de bactérias das amostras de talude, com um total de 11,2%. A OTU 2377 representou 2,55% de contribuição para as amostras de talude e suas sequências apresentaram similaridade com o gênero *Stenotrophomonas*. Bactérias deste gênero foram isoladas a partir de solos contendo alto teor de metais (Caliz *et al.*, 2012), de ambientes de mineração (Islam & Sar, 2012), sugerindo que *Stenotrophomonas* seja tolerante a metais. Ainda, algumas linhagens de *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas* são capazes de produzir sideróforos (Ryan *et al.*, 2009; Cleto *et al.*, 2012) e, portanto, são capazes de assimilar o íon Fe^{3+} e produzir Fe^{2+} , permitindo que outras bactérias possam utilizar o ferro para o metabolismo celular. As amostras de talude apresentaram uma considerável proporção de *Gammaproteobacteria* (11,2%), mas não foi encontrado nenhum

representante associado à *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Os valores de pH próximos da neutralidade das amostras podem ter contribuído para tal resultado, já que *A. ferrooxidans* é acidófila.

O filo *Acidobacteria* foi representado principalmente pelas OTUs do entorno da drenagem 3339 e 4064, representando para esse filo 13,8% de contribuição de OTUs. Segundo Barns *et al.* (2007), apesar de existir 26 subdivisões de *Acidobacteria*, a grande maioria ainda não possui representantes de bactérias cultiváveis. No entanto, pela sequência do rDNA 16S foram encontrados representantes desse filo em diversos tipos de ambiente: solo e sedimentos, ambientes ácidos e contaminados por metais (Barns *et al.*, 1999). As acidobactérias são integrantes das drenagens ácidas de minas e alguns isolados da família *Acidobacteriaceae* são capazes de reduzir o íon férrico (Halberg, 2010). Pela análise comparativa do genoma de três linhagens de *Acidobacteria* (*A. capsulatum*, Ellin345 e Ellin6076) foi observado que elas codificam genes capazes de degradar matéria orgânica complexa, reduzir nitrato, nitrito, não produzem sideróforos, mas possuem receptores para a sua captação (Ward *et al.*, 2009). A OTU 3339 apresentou, por exemplo, correlação positiva com a presença de matéria orgânica e conteúdo de água (Tabela 1.7). A presença de OTUs desse filo nas amostras do entorno da drenagem e talude sugere que as acidobactérias podem contribuir para os ciclos biogeoquímicos, tais como o ciclo do ferro e do nitrogênio.

1.3.3.4 OTUs habitat-específicas

As OTUs encontradas apenas em um tipo de amostra foram consideradas OTUs específicas. Essas OTUs representaram cerca de 48,5% das OTUs nas amostras do entorno da drenagem e 15,5% das OTUs de talude, indicando uma maior diversidade de bactérias em amostras do entorno da drenagem. Abaixo estão listadas as OTUs específicas mais abundantes de cada tipo de amostra (Tabela 1.8).

Tabela 1.8. Relação das OTUs específicas e porcentagem de contribuição para a comunidade de bactérias de acordo com a classificação do ambiente.

OTU	Classificação		Classificação do ambiente (% de contribuição)
	RDP [bootstrap value]	Blastn (identidade)	
9116	<i>Bacillus</i> [72%]	KC236438.1 (100%)	Talude (2,62)
10084	<i>Microbulbifer</i> [99%]	JN615478.1 (100%)	Talude (0,81)
8985	<i>Alphaproteobacteria</i> [100%]	KC534330.1 (99%)	Talude (0,71)
3578	<i>Achromobacter</i> [90%]	AB773113.1 (97%)	Talude (0,34)
1545	<i>Actinobacteria</i> [81%]	GU167988.1 (99%)	Entorno da drenagem (0,15)
8268	<i>Gemmatimonas</i> [58%]	AM935492.1 (95%)	Entorno da drenagem (0,12)
9027	<i>Acidobacteria</i> [99%]	EF457341.1 (98%)	Entorno da drenagem (0,10)
3631	<i>Deinococcus-Thermus</i> [100%]	DQ128141.1 (95%)	Entorno da drenagem (0,02)

Em geral, observou-se que a composição dos filos/classe das OTUs específicas foi similar aos filos/classe das OTUs mais abundantes, com a predominância de *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* para as amostras de talude, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* e *Gemmatimonadetes* para as amostras do entorno da drenagem. No entanto, é interessante destacar algumas OTUS: a OTU 9116, além de contribuir para a maior abundância de OTUs para as amostras de talude, é específica dessa amostra. A OTU 10084, classificada como *Microbulbifer* foi específica para amostras talude. Além disso, a ordem *Alteromonadales*, cujo *Microbulbifer* é membro, também foi específica para as amostras de talude. Este gênero compreende bactérias que podem degradar os carboidratos complexos, tais como a celulose, a quitina e xilano (Gonzalez *et al.*, 1997). A OTU 8985 apresentou similaridade com a sequência do rDNA 16S do gênero *Sulfitobacter* (Sorokin, 1995), uma bactéria heterotrófica capaz de oxidar sulfito. A OTU 8268, específica das amostras do entorno da drenagem apresentou similaridade com *Gemmatimonadetes*. O primeiro isolado deste filo foi obtido a partir de sistema de tratamento de esgoto, sendo Gram negativo, com capacidade de utilizar diversos substratos orgânicos e acumular polifosfato (Zhang *et al.*, 2003).

A OTU 3631, específica para a amostra do entorno da drenagem ED-SE2, foi classificada em *Deinococcus-Thermus*, representando 0,02% das sequências. Este filo é composto pelas famílias *Deinococcaceae* e *Thermaceae*. *Deinococcaceae* agrupa bactérias mesófilas e termófilas que têm sido extensivamente estudadas pelo fato de muitas linhagens serem resistentes à radiação ionizante (Cox & Battista, 2005; Brooks & Murray, 1981). A família *Thermaceae* possui bactérias aeróbias termófilas halotolerantes e organotróficas, que podem utilizar o hidrogênio

molecular como doador de elétrons e nitrato, nitrito ou enxofre elementar como aceptores de elétrons (Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 2006). Além disso, bactérias do filo *Deinococcus-thermus* podem sobreviver sob condições ambientais extremas (da Costa *et al.*, 2006; Tian & Hua, 2010), o que pode explicar a sua presença nos ambientes de mina analisados.

Epsilonproteobacteria foi específica para a amostra do entorno da drenagem ED-SO₂ (0,3% das sequências) e foram obtidas sequências representadas pelas famílias *Helicobacteraceae* e principalmente *Campylobacteraceae*. Estas famílias são metabolicamente e ecologicamente diversas, cujas suas sequências foram recuperadas de ambientes marinhos, como as fontes hidrotermais profundas e ambientes terrestres, tais como cavernas com elevada concentração de sulfetos e drenagem ácida de minas (Campbell *et al.*, 2006). Segundo Rossmassler *et al.* (2012), os fatores relacionados com a abundância de *Epsilonproteobacteria* em minas subterrâneas e em fontes hidrotermais são a temperatura, pH e a salinidade. No entanto, quando as temperaturas são similares, a concentração de oxigênio dissolvido é um fator determinante (Rossmassler *et al.*, 2012). As bactérias desta classe podem ser quimiolitotróficas ou mixotróficas e participam de importantes funções para os ciclos biogeoquímicos, pois podem oxidar fontes de enxofre, reduzir nitrogênio e fixar carbono inorgânico (Campbell *et al.*, 2006). A presença de bactérias desta classe de *Proteobacteria* na amostra do entorno da drenagem ED-SO₂ sugere que elas possam estar relacionadas com a transformação de compostos contendo enxofre.

1.4 CONCLUSÃO

A análise da diversidade de bactérias de ambientes de mina por pirosequenciamento mostrou que a biodiversidade de bactérias foi complexa. Além disso, foi apresentado o impacto que a mineração ocasiona na comunidade de bactérias e mostrou que comunidades distintas foram estabelecidas de acordo com os ambientes de mina analisados: talude e entorno da drenagem. As amostras de talude, mais oligotróficas, apresentaram comunidades de micro-organismos com OTUs mais dominantes, como *Bacillus*, porém, menos diversa. Em relação às amostras entorno da drenagem, a maior disponibilidade de água e maior conteúdo de matéria-orgânica influenciaram a comunidade de micro-organismos, as quais apresentaram maior composição taxonômica. A descrição da comunidade de bactérias na mina do Sossego pode ser de

fundamental importância para acessar e selecionar bactérias ou genes correlacionados à biorremediação, biolixiviação, bioprospecção de enzimas e compostos, dentre outros.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altimira, F.; Yáñez, C.; Bravo, G.; González, M.; Rojas, L. A.; Seeger M. (2012) Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol* doi: 10.1186/1471-2180-12-193.
- Alvarez, A.; Benimeli, C. S.; Saez, J. M.; Fuentes, M. S.; Cuozzo, S. A.; Polti, M. A.; Amoroso, M. J. (2012) Bacterial bio-resources for remediation of hexachlorocyclohexane. *Int J Mol Sci* 13 (11): 15086-11506.
- Baker, B. J.; Banfield, J. F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 44:139-152.
- Baraniecki, C. A.; Aislabie, J.; Foght, J. M. (2002) Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbiol Ecol* 43 (1):44-54.
- Barns, S. M.; Cain, E. C.; Sommerville, L.; Kuske, C. R. (2007) Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl Environ Microbiol* 73:3113-3116.
- Barns, S. M.; Takala, S. L.; Kuske, C. R. (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl Environ Microbiol* 65(4):1731-1737.
- Berry, D.; Mahfoudh, K. B.; Wagner, M.; Loy, A. (2011) Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl Environ Microbiol* 77(21):7846-78-49.
- Boone, D. R.; Liu, Y.; Zhao, Z. J.; Balkwill, D. L.; Drake, G. R.; Stevens, T. O.; Aldrich, H. C. (1995) *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int J Syst Bacteriol* 45(3):441-448.
- Brooks, B. W.; Murray, R. G. E. (1981) Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int J Syst Bacteriol* 31:353-360
- Caliz, J.; Montserrat, G.; Martí, E.; Sierra, J.; Cruañas, R.; Garau, M. A.; Triadó-Margarit, X.; Vila, X. (2012) The exposition of a calcareous Mediterranean soil to toxic concentrations of Cr, Cd and Pb produces changes in the microbiota mainly related to differential metal bioavailability. *Chemosphere* 89(5):494-504.

- Camargo, A. O.; Moniz, A. C.; Jorge, J. A.; Valadares, J. M. A. S. (2009) Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, São Paulo
- Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L., Takai, K. (2006) The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* 4(6):458-468.
- Caporaso, J. G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F. D.; Costello, E. K.; Fierer, N.; Pena, A. G.; Goodrich, J. K.; Gordon, J. I.; Huttley, G. A.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koenig, J. E.; Ley, R.E.; Lozupone, C. A.; McDonald, D.; Muegge, B. D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J. R.; Tumbaugh, P. J.; Walters, W. A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R.(2006) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010, 7:335-336
- Chen, L. X.; Li, J. T.; Chen, Y. T.; Huang, L. N.; Hua, Z. S.; Hu, M.; Shu, W. S. (2013) Shifts in microbial community composition and function in the acidification of a lead/zinc mine tailings. *Environ Microbiol* doi: 10.1111/1462-2920.12114.
- Choudhary, S.; Islam, E.; Kazy, S. K. Sar, P. (2012) Uranium and other heavy metal resistance and accumulation in bacteria isolated from uranium mine wastes. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47(4):622-637.
- Cleto, S.; Matos, S.; Kluskens, L.; Vieira, M. J. (2012) Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PloS ONE* 7(6):e40189.
- Clingenpeel, S.; Macur, R. E.; Kan, J.; Inskeep, W. P.; Lovalvo, D.; Varley, J.; Mathur, E.; Nealson, K.; Gorby, Y.; Jiang, H.; LaFracois T.; McDermott, T. R. (2011) Yellowstone Lake: high-energy geochemistry and rich bacterial diversity. *Environ Microbiol* 13(8): 2172-2185.
- Cole, J. R.; Chai, B.; Farris, R. J.; Wang, Q.; Kulam, S. A.; McGarrell, D. M.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M. (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33:D294-D296.
- Cox, M. M.; Battista, J.R. (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol* 3(11):882-892.
- da Costa, M. S.; Rainey, F. E.; Nobre, M. F. (2006) The genus *Thermus* and relatives. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. (ed). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer, New York, pp. 797–812.
- de Andrade, J.C.; de Abreu, M.F. *Análise Química de Resíduos Sólidos para Monitoramento e Estudos Agroambientais*, Editora IAC, Campinas, 2006, 178 p.
- Demeke, T.; Jenkins, G. R. (2010) Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 396(6):1977-1990.
- Denef, V. J.; Mueller, R. S.; Banfield, J. F. (2010) AMD biofilms: using model communities to

- study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME J* 4(5):599-610.
- Dubbs, J. M.; Robert Tabita, F. (2004). Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO₂ assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. *FEMS Microbiol Rev* 28(3):353-376.
- Edberg, F.; Andersson, A. F.; Holmström, S. J. (2012) Bacterial community composition in the water column of a lake formed by a former uranium open pit mine. *Microb Ecol* 64: 870-880.
- Falteisek, L.; Cepicka, I. (2012) Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine. *Extremophiles* 16:911-922.
- González, J. M.; Mayer, F.; Moran, M. A.; Hodson, R. E.; Whitman, W. B. (1997) *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov. and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *Int J Syst Bacteriol* 47:369-376.
- Hallberg, K. B. (2010) New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy* 104:448-453.
- Hao, C. B.; Zhang, H. X.; Bai, Z. H.; Hu, Q.; Zhang, B. G. (2007) A novel acidophile community populating waste ore deposits at an acid mine drainage site. *J Environ Sci* 19(4):444-450.
- Huse, S. M.; Welch, D. M.; Morrison, H. G.; Sogin, M. L. (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* 12(7):1889-1898.
- Huse, S. M.; Dethlefsen, L.; Huber, J. A.; Welch, D. M.; Relman, D. A. (2008) Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet* doi: 10.1371/journal.pgen.1000255.
- IDESP, Estatística Municipal, Parauapebas, Pará, 2012, 47p.
- Islam, E.; Sar, P. (2012) Culture-dependent and -independent molecular analysis of the bacterial community within uranium ore. *J Basic Microbiol* 51(4):372-384.
- Johnson, D. B. (2012) Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiol Ecol* 81(1):2-12.
- Kim, Y. M.; Murugesan, K.; Schmidt, S.; Bokare, V.; Jeon, J. R.; Kim, E. J.; Chang, Y. S. (2011) Triclosan susceptibility and co-metabolism - A comparison for three aerobic pollutant-degrading bacteria. *Bioresour Technol* 102(3):2206-2212.
- Kimura, S.; Bryan, C. G.; Hallberg, K. B.; Johnson, D. B. (2011) Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environ Microbiol* 13(8):2092-2104.
- Kuang, J. L.; Huang, L. N.; Chen, L. X.; Hua, Z. S.; Li, S. J.; Hu, M.; Shu, W. S. (2013) Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine

drainage. *ISME J* 7:1038-1050.

- Kunin, V.; Engelbrektson, A.; Ochman, H.; Hugenholtz, P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 12(1):118-123.
- Luo, C.; Xie, S.; Sun, W.; Li, X.; Cupples, A. M. (2009) Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 75(13):4644-4647.
- Matheson, C. D.; Marin, T. E.; Hayter, S.; Esau, N.; Fratpietro, R.; Vernon, K. K. (2009) Technical note: Removal of metal ion inhibition encountered during DNA extraction and amplification of copper-preserved archaeological bone using size exclusion chromatography. *Am J Phys Anthropol* 140:384-391.
- Miroshnichenko, M. L.; Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2006) Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Extremophiles* 10(2):85-96.
- Muehe, E. M.; Gerhardt, S.; Schink, B.; Kappler, A. (2009) Ecophysiology and the energetic benefit of mixotrophic Fe (II) oxidation by various strains of nitrate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 70 (3):335-343.
- Nicholson, W. L. (2002) Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci* 59(3):410-416.
- Nie, M.; Zhang, X. D.; Wang, J. Q.; Jiang, L. F.; Yang, J.; Quan, Z. X.; Cui, X.; Fang, C.; Li, B. (2009) Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biol Biochem* 41:2535-2542.
- Nilgiriwala, K. S.; Alahari, A.; Rao, A. S.; Apte, S. K. (2008) Cloning and overexpression of alkaline phosphatase PhoK from *Sphingomonas* sp. strain BSAR-1 for bioprecipitation of uranium from alkaline solutions. *Appl Environ Microbiol* 74(17):5516-5523.
- Pasternak, Z.; Al-Ashhab, A.; Gatica, J.; Gafny, R.; Avraham, S.; Minz, D.; Gillor, O.; Jurkevitch, E. (2013) Spatial and Temporal Biogeography of Soil Microbial Communities in Arid and Semiarid Regions. *PLoS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0069705.
- Pereira, L. B.; Vicentini, R.; Ottoboni, L. M. M. (2014) Changes in the Bacterial Community of Soil from a Neutral Mine Drainage Channel. *PLoS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0096605.
- Pérez-Ibarra, B. M.; Flores, M. E.; García-Varela, M. (2007) Isolation and characterization of *Bacillus thioparus* sp. nov., chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium *FEMS Microbiol Lett* 271(2):289-296.
- Pizarro, J.; Jedlicki, E.; Orellana, O.; Romero, J.; Espejo, R.T. (1996) Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl Environ Microbiol* 62:1323-1328.

- Pointing, S. B.; Warren-Rhodes, K. A.; Lacap, D. C.; Rhodes, K. L.; McKay, C. P. (2007) Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts. *Environ Microbiol* 9:414-424.
- Rastogi, G.; Stetler, L. D.; Peyton, B. M.; Sani, R. K. (2009) Molecular analysis of prokaryotic diversity in the deep subsurface of the former Homestake gold mine, South Dakota, USA. *J Microbiol* 47(4):371-384.
- Rawlings, D. E.; Johnson, D. B. (2007) The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153:315-324.
- Rossmassler, K.; Engel, A. S.; Twing, K. I.; Hanson, T. E.; Campbell, B. J. (2012) Drivers of epsilonproteobacterial community composition in sulfidic caves and springs. *FEMS Microbiol Ecol* 70:421-432.
- Ryan, R. P.; Monchy, S.; Cardinale, M.; Taghavi, S.; Crossman, L.; Avison, M. B.; Dow, J. M. (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7(7):514-525.
- Salomons, W. (1995) Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *J Geochem Explor* 52 (1):5-23.
- Sánchez-Andrea, I.; Rodríguez, N.; Amils, R.; Sanz, J L. (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol* 77:6085-6093.
- Sheoran, A. S.; Sheoran, V. (2006) Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. *Miner Eng* 19(2):105-116.
- Sorokin, D. Y. (1995) *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. - a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxidation. *Mikrobiologiya* 64:354-365.
- Stach, J. E.; Maldonado, L. A.; Masson, D. G.; Ward, A. C.; Goodfellow, M.; Bull, A. T. (2003) Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 69:6189-6200.
- Stearns, J. C.; Lynch, M. D.; Senadheera, D. B.; Tenenbaum, H. C.; Goldberg, M. B.; Cvitkovitch, D. G.; Neufeld, J. D. (2011) Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep* 1:170.
- Tan, G. L.; Shu, W. S.; Zhou, W. H.; Li, X. L.; Lan, C. Y.; Huang, L. N. (2009) Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiol Ecol* 70(2):277-285.
- Tian, B.; Hua, Y. (2010) Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends Microbiol* 18:512-520.
- Trajanovska, S.; Britz, M. L.; Bhave, M. (1997) Detection of heavy metal ion resistance genes in

Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation* 8(2):113-124.

Trujillo, M. E (2008) Actinobacteria. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester doi: 10.1002/9780470015902.a0020366.

Ubalde, M. C.; Braña, V.; Sueiro, F.; Morel, M. A.; Martínez-Rosales, C. Marquez, C.; Castro-Sowinski, S. (2012) The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. *Curr Microbiol* 64(6):597-603.

Vilchez, R.; Pozo, C.; Gómez, M. A.; Rodelas, B.; González-López, J. (2007) Dominance of sphingomonads in a copper-exposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology* 153:325-337.

Ward, N. L.; Challacombe, J. F.; Janssen, P. H.; Henrissat, B.; Coutinho, P. M.; Wu, M.; Kuske, C. R. (2009) Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied Environ Microbiol* 75(7):2046-2056.

Wen, A.; Fegan, M.; Hayward, C.; Chakraborty, S. Sly, L. I. (1999) Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:567-576.

Zeng, L.; Huang, J.; Zhang, Y.; Qiu, G.; Tong, J.; Chen, D.; Zhou, J.; Luo, X. (2008) An effective method of DNA extraction for bioleaching bacteria from acid mine drainage. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:881-888.

Zhang, H.; Sekiguchi, Y.; Hanada, S.; Hugenholtz, P.; Kim, H.; Kamagata, Y.; Nakamura, K. (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov.". *Int J Syst Evol Microbiol* 53(4):1155-1163.

Zhou, J.; Bruns, M. A.; Tiedje, J. M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62:316-322.

Zhou, J.; Xia, B.; Treves, D. S.; Wu, L. Y.; Marsh, T. L.; O'Neill, R. V.; Palumbo, A. V.; Tiedje, J. M. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* 68:326-334.

CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE FUNCIONAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS ISOLADAS DE AMBIENTES DE MINA DE COBRE

2.1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos representam um importante grupo para a produção de compostos biologicamente ativos, com aplicações na agricultura, na indústria e em fármacos (Demain & Adrio, 2008; Sanchez & Demain, 2010). Na biolixiviação, os micro-organismos são utilizados para a extração de metais (Rawlings & Johnson, 2007, Johnson, 2014). Os ambientes extremos como, por exemplo, mina de cobre, são fontes para o isolamento de micro-organismos e prospecção de compostos de interesse biotecnológico e farmacológico (Rothschild & Mancinelli, 2001; Morozkina *et al.*, 2010; Nigam, 2013). Com relação aos antibióticos, a classe dos compostos betalactâmicos que inclui as penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems, é amplamente utilizada no tratamento de inúmeras doenças infecciosas (Poole, 2004). No entanto, devido à utilização indiscriminada dos antibióticos, a resistência aos antimicrobianos tem se tornado um problema de saúde pública global. Por isso, a busca por novos compostos antimicrobianos contra patógenos resistentes se faz cada vez mais necessária.

Os micro-organismos presentes em ambientes de mina geralmente são capazes de tolerar maiores concentrações de metais, como o zinco, cobre, níquel e ferro (Dopson *et al.*, 2003). O ferro é o metal de transição mais abundante no mundo (Andrews *et al.*, 2003), mas a sua solubilidade em meio neutro é baixa, pois em ambientes aeróbicos está sob a forma oxidada (Fe^{3+}), no qual forma complexos oxi-hidróxidos insolúveis (Wandersman & Delepelaire, 2004). Assim, em sistemas biológicos, a utilização do ferro sob a forma de Fe^{3+} torna-se bastante limitada. Alguns micro-organismos desenvolveram um sistema de transporte, constituído por moléculas de baixo peso molecular, chamados de sideróforos, que possuem elevada afinidade pelo ferro oxidado (Neilands, 1995; Ahmed & Holmstrom, 2014). Sob condições de privação de ferro, os sideróforos produzidos por bactérias podem formar complexos de transporte específicos para a quelação de ferro, no qual após ser reduzido a Fe^{2+} é passível de ser absorvido pelas células (Miethke & Marahiel, 2007). De acordo com a natureza química do sítio de ligação ao ferro, os sideróforos podem ser classificados em três classes principais: hidroxamato, catecolato

ou carboxilato (Winkelmann, 2002). A busca por micro-organismos capazes de produzir sideróforos pode ser promissora devido à possibilidade de serem utilizados em diversas áreas da biotecnologia. Os sideróforos podem, por exemplo, agir como moléculas sinalizadoras em *quorum sensing* (Schertzer *et al.*, 2009), utilizados como antibióticos (Ballouche *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2013), na biorremediação (Braud *et al.*, 2006; Gaonkar & Bhosle, 2013) e fitorremediação (Rajkumar *et al.*, 2010).

Ambientes de mina apresentam altas concentrações de metais, que podem ser de difícil remoção e/ou degradação, devido à capacidade dos íons metálicos se adsorverem às partículas do solo (Bradl, 2004; Sprynskyy *et al.*, 2006). Os biossurfactantes, compostos produzidos por micro-organismos com características hidrofílicas e hidrofóbicas, são capazes de aumentar a solubilidade em água, de modo a facilitar a remoção dessas partículas hidrofóbicas do meio ambiente (Mulligan, 2005; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Estes compostos de baixo peso molecular são classificados em glicolipídeos ou lipopeptídeos e possuem diversas aplicações como recuperação e processamento de óleos, emulsificação de hidrocarbonetos, agentes antimicrobianos, dessorção de contaminantes e sequestro de metais do solo (Singh *et al.*, 2007; Banat *et al.*, 2010; Geys *et al.*, 2014).

Enzimas isoladas de micro-organismos extremófilos têm apresentado características interessantes para a bioprospecção, como a termoestabilidade, resistência a desnaturantes químicos, solventes orgânicos e pH extremos (Lorenz & Eck, 2005; Uratani *et al.*, 2014). Várias enzimas isoladas de micro-organismos extremófilos vêm sendo utilizadas na produção de detergentes, cosméticos, processamento de alimentos e outros (Van Den Burg, 2003; de Carvalho, 2011). Entretanto, até o momento existem poucas enzimas isoladas a partir de micro-organismos presentes em minas que foram exploradas em nível de utilização industrial, tais como α -glucosidase (Ferrer *et al.*, 2005), esterase (Golyshina *et al.*, 2005) e enxofre oxigenase redutase (Chen *et al.*, 2007). Além disso, o estudo de bactérias isoladas a partir de mina de cobre e os compostos produzidos poderão fornecer maior entendimento da comunidade microbiana e dos processos metabólicos deste nicho, com possibilidade de aplicação em diversos segmentos da biotecnologia, inclusive para a biolixiviação. Assim sendo, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de enzimas (hidrolases, betalactamase, monoxigenase e sulfoxidase) e compostos (sideróforos, antimicrobianos e biossurfactantes) por bactérias isoladas de ambientes de mina de cobre.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas em agosto de 2009 na Mina do Sossego (6°26'S – 50°04'W). Esta mina é composta por cinco depósitos: Pista, Baiano, Curral, Sequeirinho e Sossego, sendo os dois últimos os mais importantes (Monteiro *et al.*, 2008). As amostras denominadas SO5, SO6 e SO7 foram coletadas no depósito de Sossego e são amostras de drenagem. No depósito de Sequeirinho foi coletada a amostra de minério sulfetado de cobre parcialmente oxidado denominada SO9. As amostras foram armazenadas a 4 °C até o momento do isolamento das bactérias e realização das análises químicas. O pH foi determinado para cada amostra. A quantidade (mg/Kg) dos elementos químicos (Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, S, Fe, P, Mg, Mn, Ni, K, Na e Zn) foi determinada por ICP-AES, segundo Andrade & de Abreu (2006). Para avaliar as características químicas das amostras, buscando verificar quais parâmetros podem ser usados para indicar similaridades (agrupamentos) ou diferenças de acordo com o tipo de amostra, foi realizada a análise de componentes principais (ACP), utilizando-se o *software* estatístico R, versão 2.15.2.

2.2.2 Isolamento de bactérias heterotróficas das amostras de mina SO5, SO6, SO7 e SO9

Um grama de cada amostra de mina foi diluído em 9 mL de água destilada estéril e homogeneizadas adequadamente. Foram preparadas diluições decimais, as quais foram submetidas à técnica de inoculação de profundidade (*pour plate*). O isolamento das bactérias heterotróficas foi realizado por plaqueamento das amostras em meio *Plate Counting Agar* (PCA), contagem das colônias, inóculo das colônias em meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB), isolamento de uma colônia viável em meio sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA) e, quando necessário, replaqueamento em meio sólido contendo ciclohexamida para exclusão de possíveis contaminantes (Eaton & Frason, 2005).

2.2.2.1 Plaqueamento das amostras em meio PCA

Em cada placa de Petri foi inoculado 1 mL de cada uma das diluições e foram acrescentados 12 mL de meio PCA (triptona 5,0 g, extrato de levedura 2,5 g, glicose 1,0 g, ágar 15,0 g, água destilada q.s.p. 1000 mL) previamente fundido e estabilizado. A amostra e o meio de cultura foram homogeneizados por movimentos circulares, utilizando a técnica de inoculação em profundidade. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a 35 °C por 48 h.

2.2.2.2 Inóculo das colônias isoladas em meio TSB

Após incubação por 48 h, colônias isoladas foram selecionadas. A seleção foi baseada na morfologia e coloração das colônias: colônias com diferentes aspectos foram selecionadas. A morfologia destas colônias foi observada e, a seguir, foram inoculadas em 5 mL de meio TSB (triptona 17,0 g, peptona de soja 3,0 g, dextrose 2,5 g, NaCl 5,0 g, K₂HPO₄ 2,5 g, água destilada q.s.p. 1000 mL) e incubadas a 35 °C durante 24-48 h.

2.2.2.3 Isolamento das colônias em meio TSA

As culturas obtidas foram semeadas em placas contendo meio TSA (triptona 17,0 g, peptona de soja 3,0 g, dextrose 2,5 g, NaCl 5,0 g, K₂HPO₄ 2,5 g, ágar 15,0 g, água destilada q.s.p. 1000 mL) e incubadas a 35 °C por 24-48 h. Após o período de incubação, cada reisolado foi semeado em caldo LB, incubados pernoite a 35°C e 750 µL da cultura de bactérias foi misturada a 250 µL de glicerol estéril para obtenção das culturas -70 °C.

2.2.2.4 Exclusão de possíveis contaminações com fungos

As colônias isoladas em meio ágar-TSA que apresentaram características morfológicas de fungos foram inoculadas em 5 mL de meio TSB e incubadas por 48 h a 35 °C. Após o crescimento, a cultura foi estriada em placa ágar-TSA contendo 100 µg/mL de ciclohexamida. As placas foram incubadas por 48 h a 35°C. O não aparecimento de colônias na placa indicou que o

isolado foi um fungo e não uma bactéria heterotrófica.

2.2.3 Caracterização e identificação de bactérias isoladas

2.2.3.1 Coloração de Gram

Foram isoladas 64 bactérias heterotróficas a partir das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9. As bactérias foram classificadas em Gram positivas ou Gram negativas, com base na coloração de Gram, que tem como princípio a discriminação da composição química e integridade da parede celular (Coico, 2005). Assim sendo, bactérias Gram positivas apresentaram uma coloração roxa e as Gram negativas apresentaram uma coloração vermelha.

2.2.3.2 Identificação das bactérias heterotróficas isoladas

Para a extração do DNA genômico foram utilizados 2 mL de cultura de cada bactéria. O DNA foi isolado com o auxílio do kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências parciais do rDNA 16S de cada isolado foram amplificadas utilizando 30 a 80 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada *primer* 10F (5'-TTTAATGAAGTAGTTGCAATCTGG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3') (Lane, 1991), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1 × tampão PCR (Fermentas) e 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 95 °C por 2 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min – 56 °C por 1 min s – 72 °C por 3 min e extensão final de 72 °C por 20 min. A purificação dos produtos da PCR foi realizada com o auxílio do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado a partir de 150-200 ng de DNA, com o kit *DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), conforme descrito por Paulino *et al.* (2001) e Miqueletto *et al.* (2011).

Para discriminar as sequências de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* foi realizada a análise da amplificação do gene que codifica a subunidade B da DNA girase (*gyrB*). Foram utilizados os *primers* BC1/BC2r (BC1 5'-ATTGGTGACACCGATCAAACA-3' e BC2r 5'-

TCATACGTATGGATGTTATTC-3') e BT1/BT2r (BT1 5'-ATCGGTGATACAGATAAGACT-3' e BT2r 5'-CCTTCATACGTA TGAATATTATTT-3') (Yamamoto & Harayama, 1995) para a amplificação de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, respectivamente. Para isso, foram utilizados 50 ng de DNA genômico, 2,5 U de Taq polymerase (Invitrogen), 1 × tampão PCR (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato e 0,4 μM de cada *primer*. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min – 55 °C por 1,5 min – 72 °C por 2,5 min e extensão final de 72 °C por 7 min. A amplificação de *Bacillus* spp foi específica: *B. cereus*, apresentou produto de amplificação de 365 bp e *B. thuringiensis* de 368 bp. Foram empregadas como controle positivo as linhagens de referência: *B. thuringiensis* ATCC 33679 e *B. cereus* ATCC 11778.

As sequências dos *contigs* obtidas foram submetidas à comparação com as sequências disponíveis nos bancos de dados *Genbank* e *Ribosomal Database Project II* (Cole *et al.*, 2005). Uma vez identificadas, as sequências foram depositadas na base de dados do *GenBank*, sob os seguintes números de acesso KC867292 a KC867341 e KC859435 a KC859448.

2.2.4 Caracterização funcional das bactérias heterotróficas

2.2.4.1 Produção de protease

As bactérias foram inoculadas em 2 mL de meio LB líquido (Sambrook *et al.*, 1989), mantidas sob agitação a 200 rpm, 37 °C por 16 h. Para a verificação da produção de enzimas proteolíticas foi adicionado ao meio LB sólido 5% de leite em pó desnatado e em seguida, foram inoculados 2 μL de cada bactéria (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. As bactérias com atividade proteolítica formaram halos transparentes no meio.

2.2.4.2 Detecção de sideróforos

Antes dos testes, todas as vidrarias foram tratadas com HCl 6 M para que todo resíduo de ferro pudesse ser removido. As bactérias foram inoculadas em 2 mL de meio LB líquido,

cultivadas sob privação de ferro e mantidas sob agitação a 200 rpm, 37 °C por 16 h. Para a detecção da produção de sideróforos, 10 µL da cultura de bactérias foram aplicados em 25 mL de meio ágar nutriente e as placas foram mantidas a 37 °C por 16 h. Posteriormente, foi aplicado sobre as placas o meio *overlay* CAS (Schwyn & Neilands, 1987), modificado segundo Pérez-Miranda *et al.* (2007), como descrito a seguir: 60,5 mg/L de cromo azurol S, 72,9 mg/L de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), 30,24 g/L de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES) e 1 mM de FeCl₃.6H₂O, diluído em 10 mL de HCl 10 mM. Agarose 0,9% (p/v) foi utilizada como agente gelificante. As placas foram mantidas no escuro a 25 °C. A detecção do sideróforo foi revelada após um período que variou de três a sete dias. De acordo com a coloração apresentada, os sideróforos foram classificados em três tipos: catecolato (azul → rosa), hidroxamato (azul → laranja) e carboxilato (azul → amarelo claro). Em placas sem o inóculo da bactéria, não houve alteração da cor do meio contendo o ágar nutriente e o meio *overlay* CAS. Como controle negativo, foram usadas bactérias cultivadas na presença de íon férrico.

2.2.4.3 Produção de betalactamase

Antes dos experimentos as bactérias foram inoculadas em 2 mL de meio LB líquido, cultivadas por 16 h a 37 °C. Posteriormente, as bactérias foram estriadas em placas de Petri contendo 20 mL do meio LB sólido e mantidas a 37 °C. A detecção de betalactamase foi realizada a partir de discos de cefinase (BD Diagnostic Systems) umedecidos com água estéril. Foram retiradas colônias das placas com o meio sólido e, em seguida, realizado um esfregaço. A detecção da atividade de betalactamase se baseou na mudança da coloração de amarelo para vermelho dos discos de cefinase. De acordo com a intensidade da coloração vermelha nos discos de cefinase foram atribuídos níveis, sendo que os números 0, 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, não produção, produção mínima, parcial ou máxima da enzima (Figura 2.1).

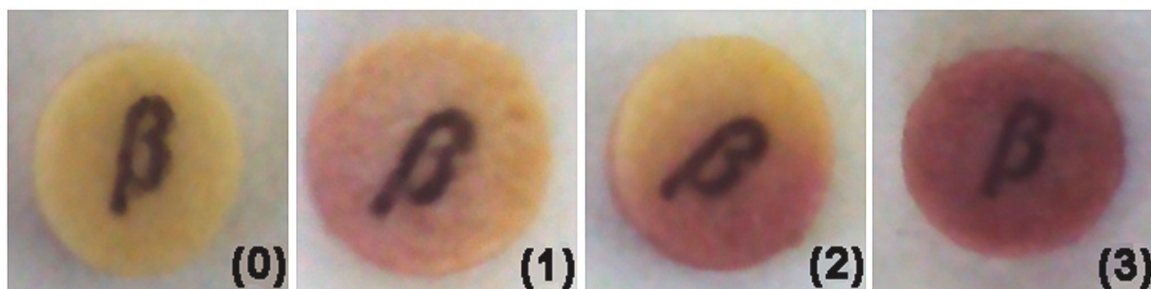


Figura 2.1. Teste para a detecção da betalactamase das bactérias isoladas a partir das amostras de mina de cobre. Foram atribuídos símbolos (0), (1), (2) e (3), de acordo com a variação da intensidade da coloração dos discos de cefinase utilizados no teste da betalactamase.

2.2.4.4 Detecção de antimicrobianos

Previamente aos testes antimicrobianos foi realizado o antibiograma de cinco linhagens de referência: *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*. Sete antibióticos foram testados no antibiograma: Sulfonamida, Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Gentamicina e Tetraciclina. A Tabela 2.1 mostra a relação entre as linhagens de referência testadas com a resistência ao tipo de antibiótico. Para os testes antimicrobianos (Geis *et al.*, 1983), as bactérias foram cultivadas em 3 mL de meio LB líquido e mantidas a 250 rpm, 35 °C. Em seguida, as bactérias foram estriadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB sólido e incubadas a 35 °C. As linhagens de bactérias referência (Tabela 2.1) foram cultivadas em 3 mL de meio LB líquido a 250 rpm, 30 °C. Dois microlitros da cultura das linhagens referência foram misturados com 2 mL de meio *overlay* (meio LB contendo 0,6% de Bacto ágar) e este meio foi colocado na superfície das placas contendo as bactérias heterotróficas. As placas foram incubadas por 24 h a 30 °C e, a atividade antimicrobiana foi considerada positiva quando a bactéria heterotrófica foi capaz de inibir o crescimento da linhagem de referência. Os graus de inibição considerados foram: 1 – pouca inibição, 2 – inibição intermediária e 3 – inibição máxima.

Tabela 2.1. Linhagens de referência utilizadas nos testes de produção de compostos antimicrobianos pelas bactérias heterotróficas de ambientes de mina.

Linhagem de referência	Colaração de Gram	Doenças geradas	Antibiograma (Resistência)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	Diarréia, vômito, náusea.	Ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	–	Gastroenterites, infecção do trato urinário, peritonite, meningite e outras.	Sulfonamida, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	–	Infecções no trato respiratório, trato urinário, sangue, feridas cirúrgicas e outras.	Ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	+	Pneumonia, endocardite, síndrome do choque tóxico, gastroenterite, e outras	Sulfonamida, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol Gentamicina, tetraciclina
<i>Vivrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	–	Gastroenterite, dor de cabeça, febre e outras.	Sulfonamida, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina

2.2.4.5 Produção de biossurfactante

O método descrito por Bodour & Miller-Maier (1998) foi usado para detectar a produção de bissurfactantes das bactérias isoladas. Para isto, as bactérias foram cultivadas em placas contendo meio R₂A a 30 °C. As colônias obtidas foram inoculadas em 5 mL de meio contendo sais minerais (p/v 0,4% Na₂HPO₄, 0,15% KH₂PO₄, 0,1% NH₄Cl, 0,02% MgSO₄.7H₂O, 0,0005% citrato de ferro amoniacal, 0,001% CaCl, pH 7,2) suplementado com 2% (p/v) de glicose e mantidas por sete dias a 30 °C, 250 rpm. Em seguida, as culturas foram testadas para a presença de surfactante pelo método qualitativo do colapso da gota (Bodour & Miller-Maier, 1998) e pelo método do espalhamento da gota (Youssef *et al.*, 2004; Morikawa *et al.*, 1993). Para o teste do colapso da gota, 20 µL de 10W-40 Pennzoil foram adicionados em cada um dos 96 poços de uma placa de poliestireno. Depois de 24 h, 50 µL de cada cultura de bactéria foram pipetados no

centro dos poços da placa e, após 1 min, as gotas foram examinadas em um microscópio estereoscópio. A produção de biossurfactante foi considerada positiva quando o colapso da gota de óleo foi observado. Água Milli-Q foi usada como controle negativo e SDS 1% foi usado como controle positivo. No teste do espalhamento da gota, 20 µL de 10W-40 Pennzoil foram colocados em placas de Petri contendo 50 mL de água destilada. A seguir, 10 µL da cultura da bactéria foram adicionados à superfície do óleo e o diâmetro do halo na superfície do óleo foi medido após 30 a 60 s.

Outro teste realizado foi o da emulsificação do querosene. Neste teste, a capacidade de emulsificação do querosene foi avaliada conforme Cooper & Goldenberg (1987), com modificações. Dois mililitros da suspensão de bactérias foram adicionados a 2 mL de querosene. A mistura foi agitada em vortex por 2 min e, após, repousada por 2 min. Posteriormente, foi medida a altura da emulsão formada. Os tubos foram mantidos a 25 °C por 24 h e a altura da emulsão foi novamente medida. A estabilidade da emulsificação foi determinada após 24 h e o índice de emulsificação (EI-24) foi calculado dividindo-se a altura da emulsão formada pela altura total e multiplicada por 100. A emulsão foi definida estável quando o EI-24 foi igual ou maior que 50%.

2.2.4.6 Triagem de alto desempenho (High-Throughput Screening – HTS)

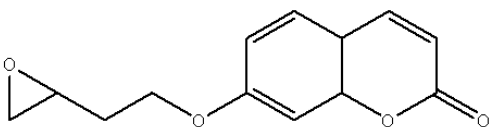
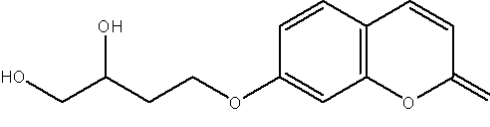
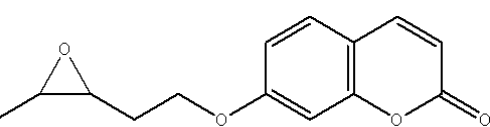
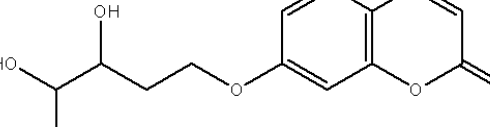
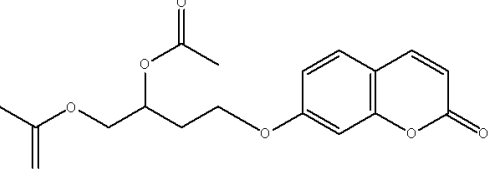
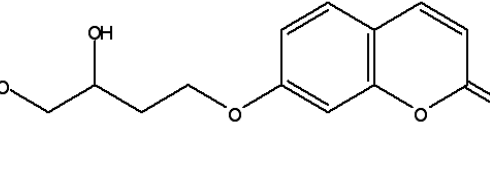
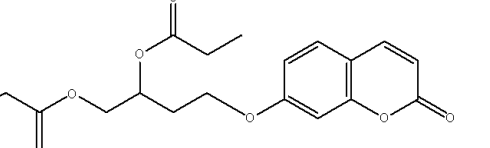
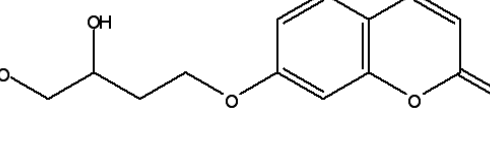
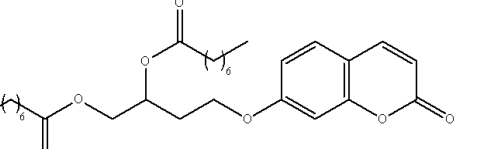
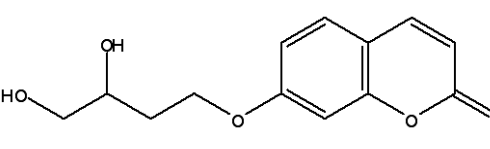
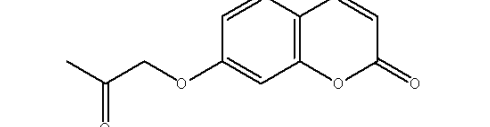
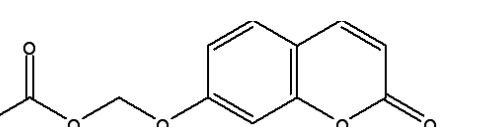
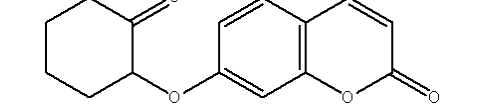
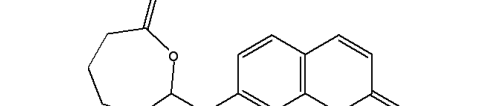
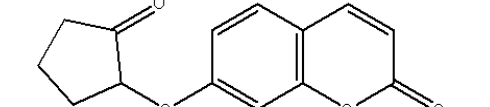
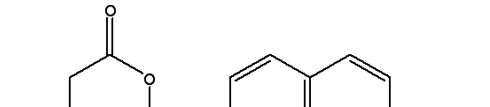
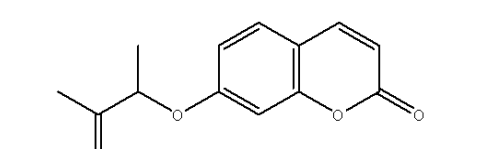
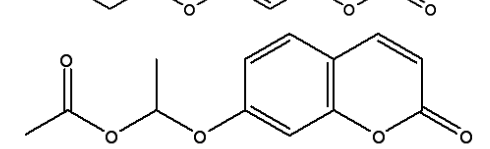
O estudo do arsenal enzimático das bactérias heterotróficas isoladas das amostras de drenagem foi realizado por meio da triagem de alto desempenho, com a colaboração da Profa. Dra. Anita Marsaioli (Instituto de Química, Unicamp) e da sua aluna Bruna Zucoloto da Costa. Nos ensaios foram utilizadas sondas fluorogênicas (Tabela 2.2) derivadas do ânion umbeliferila para a detecção de epóxido hidrolases (**1** ou **3**), esterases (**5**, **7** ou **9**) e monoxigenases (**11**, **13**, **15** ou **17**).

Para a realização dos ensaios as bactérias foram cultivadas em meio LB líquido (Sambrook *et al.*, 1989) por 16 h, a 37 °C e, em seguida, plaqueadas em meio LB sólido, e mantidas a 37°C por 16 h. Com o auxílio de uma alça estéril, as colônias foram retiradas e as células ressuspensas em tampão borato (20 mmol/L, pH 7,4). A determinação das atividades enzimáticas foi realizada em microplacas de polipropileno de 96 poços, mantidas sob agitação a 200 rpm a 28 °C. A intensidade da fluorescência foi medida em um espectrofotômetro (FlashScan 530 Analytic Jena),

sendo o comprimento de onda de excitação de 390 nm e as leituras realizadas a 460 nm. As hidrolases foram triadas utilizando sondas fluorogênicas (**1**, **3**, **5**, **7** ou **9**, Tabela 2.2 – 100 µmol/L), BSA (2 mg/L), NaIO₄ (2 mmol/L) e uma suspensão de células intactas diluídas em tampão borato (0,1 mg/mL) e as reações foram monitoradas em até 24 h. A detecção de monoxigenases foi avaliada utilizando as sondas (**11**, **13**, **15** ou **17**, Tabela 2.2 – 100 µmol/L), BSA (2 mg/L), células intactas diluídas em tampão borato (0,1 mg/mL) e monitoradas em até 72 h.

Os controles negativos simularam os ensaios na ausência da bactéria e os controles microbianos na ausência da sonda fluorogênica. Os controles positivos foram realizados substituindo-se as sondas pelos respectivos produtos da reação na presença das células microbianas. Para a análise dos resultados de atividade enzimática, os valores obtidos de emissão de fluorescência do controle negativo e do controle microbiano foram descontados dos obtidos para os ensaios, e considerada como 100% a reação da fluorescência obtida no controle positivo. As reações foram consideradas positivas quando as porcentagens de conversão do substrato avaliado no produto de interesse foram superiores a 5%.

Tabela 2.2. Sondas utilizadas e/ou desenvolvidas pelo grupo da Profa. Dra. Anita Marsaioli para a triagem de alto desempenho e os produtos primários que são esperados após a atuação da bactéria.

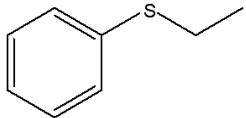
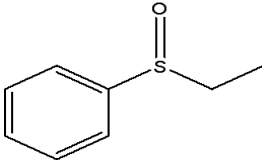
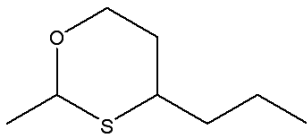
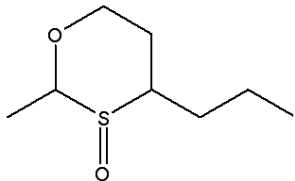
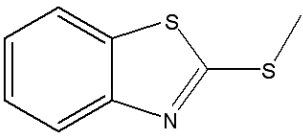
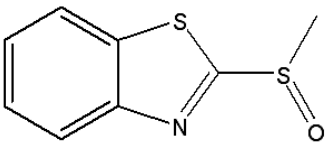
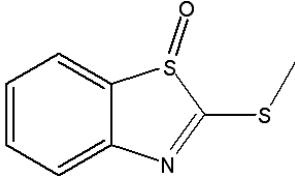
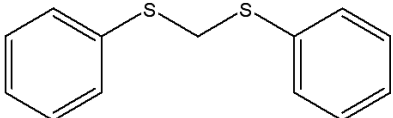
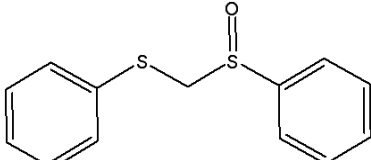
Sonda	Produto primário esperado
1 	2 
3 	4 
5 	6 
7 	8 
9 	10 
11 	12 
13 	14 
15 	16 
17 	18 

(1) 7-2(oxirano-2-il)etoxi)-2H-cromen-2-ona; (2, 6, 8 e 10) 7-(3,4-dihidroxibutoxi)-2H-cromen-2-ona; (3) 7-(2-(3-metiloxiran-2-il)etoxi)-2H-cromen-2-ona; (4) 7-(3,4-dihydroxypentiloxi)-2H-cromen-2-ona; (5) 4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butano-1,2-dil diacetato; (7) 4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butano-1,2-dil dipropionato; (9) 4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butano-1,2-dil dioctanoato; (11) 7-(2-oxopropoxi)-2H-cromen-2-ona; (12) (2-oxo-2H-cromen-7-iloxi) metil acetato; (13) 7-(2-oxociclohexiloxi)-2H-cromen-2-ona; (14) 7-(7-oxooxepan-2-iloxi)-2H-cromen-2-ona; (15) 7-(2-oxociclopentiloxi)-2H-cromen-2-ona; (16) 7-(6-oxotetrahidro-2H-pirano-2-iloxi)-2H-cromen-2-ona; (17) 7-(3-oxobutan-2-iloxi))-2H-cromen-2-ona; (18) 1-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)etil acetato.

2.2.4.7 *Ensaios de multibiorreação*

Os isolados que apresentaram os melhores resultados na atividade de monoxigenases, detectadas por triagem de alto desempenho, foram utilizados para a detecção de sulfoxidases (enzimas que oxidam sulfetos orgânicos) pela técnica de multibiorreações. As bactérias selecionadas foram cultivadas em meio LB líquido por 16 h a 37 °C, 200 rpm. As células obtidas foram centrifugadas a 5000 rpm, por 15 min. Posteriormente, 0,25 g de células bacterianas foram ressuspensas em 5 mL de tampão Sørensen (Sørensen, 1909) (0,1 mol/L, pH 7,0), contendo 1,5 µL de cada substrato (19, 21, 23 ou 26, Tabela 2.3). Para a triagem de sulfoxidases (Tabela 2.3) foram utilizados os seguintes substratos: etiltiobenzeno (19), 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (21), 2-(metiltio)benzotiazol (23) e bis-(feniltio)metano (26). A solução resultante foi mantida sob agitação, a 200 rpm, 37°C, sendo interrompidas em 72 e 120 h. Os ensaios foram saturados com NaCl e extraídos com acetato de etila. O extrato orgânico obtido foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Para cada ensaio de biotransformação foram utilizados dois controles: um contendo somente os substratos avaliados em tampão Sørensen pH 7,0 (controle dos substratos) e outro contendo apenas as células bacterianas em tampão Sørensen pH 7,0 (controle microbiano). As conversões enzimáticas foram calculadas comparando as áreas dos picos cromatográficos dos reagentes, produtos e padrões internos. Para o estudo da enantiosseletividade, todas as amostras analisadas por CG/EM foram analisadas por cromatografia gasosa em coluna quiral acoplada a detector de ionização de chama (CG/DIC).

Tabela 2.3. Substratos utilizados para a triagem de sulfoxidases e produtos esperados após as multibiorreações.

Substrato	Possível(is) produto(s) esperado(s)
19 	20 
21 	22 
23 	24 
	25 
26 	27 

(**19**) etiltiobenzeno, (**20**) etilfenilsulfóxido, (**21**) 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano, (**22**) 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxitiano, (**23**) 2-(metiltio)benzotiazol, (**24** e **25**) 2-(metilsulfinil)benzotiazol, e (**26**) bis-(feniltio)metano (**27**) bis-(feniltiosulfinil)metano.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização das amostras

Foram coletadas quatro amostras na Mina do Sossego, distribuídas entre os depósitos de Sossego e Sequeirinho (Figura 2.2). No depósito de Sossego foram obtidas as amostras de drenagem SO5, SO6 e SO7, cujos valores de pH foram, respectivamente, 6,7, 7,8 e 6,8. No depósito de Sequeirinho foi coletada a amostra SO9, composta de minério sulfetado de cobre parcialmente oxidado, sendo a maior parte constituída por calcopirita e apresentou pH 5,1.

A análise dos elementos químicos das amostras foi realizada por ICP-AES (de Andrade & de Abreu, 2006). Por meio desta análise a quantidade (mg/Kg) dos seguintes elementos químicos pode ser avaliada: Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, S, Fe, P, Mg, Mn, Ni, K, Na, Zn. Na Tabela 2.4 são mostrados os resultados dessa análise.

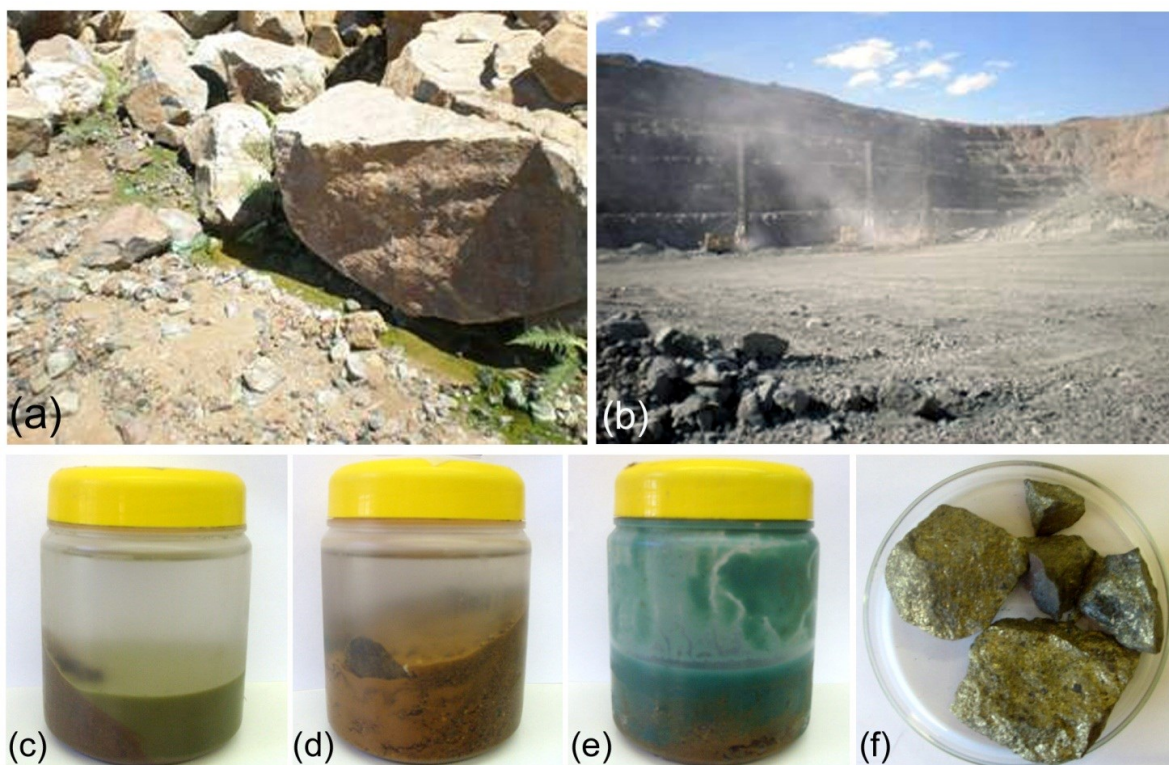


Figura 2.2. Amostras de pontos diferentes da mina do Sossego. Mina de cobre da Companhia Vale localizada em Canaã dos Carajás, Pará. (a) Amostra de solo úmido, colhida na base de pilhas de deposição de rejeitos da Cava do Sossego; (b) Amostra de minério sulfetado de cobre coletada na cava do Sequeirinho; (c) Amostra SO5; (d) Amostra SO6; (e) Amostra SO7; (f) Amostra SO9.

Tabela 2.4. Caracterização físico-química das amostras de drenagem (SO5, SO6 e SO7) e de mineral sulfetado de cobre (SO9) coletadas na mina do Sossego. Valores dos elementos químicos expressos em mg/kg.

Descrição	SO5	SO6	SO7	SO9
Cd	0,9	0,5	0,7	5,4
Ca	1000	1000	2200	63200
Pb	3,2	<3,0	3	20,4
Cu	22186	5699	46761	112700
Cr	6,3	6,1	7,3	0,5
S	900	130	60	268000
Fe	16516	12398	10458	241275
P	1900	640	20	44500
Mg	6200	290	330	18300
Mn	250	258	161	123
Ni	145	165	66,4	7630
K	1443	910	707	4,2
Na	169	42	679	1,3
Zn	110	89	52,3	97
pH	6.7	7.8	6.8	5.1

A fim de avaliar se os elementos químicos mensurados de cada amostra foram suficientes para diferenciar e separar as amostras foi feita a análise de componentes principais (ACP) (Figura 2.3). Tendo como base os elementos químicos avaliados, a ACP mostrou que as amostras SO5 e SO6 foram agrupadas pela presença de Mn, a amostra SO7 pela presença de Na e a amostra SO9 pela presença de Cd, Ca, Pb, S, Fe, P e Ni.

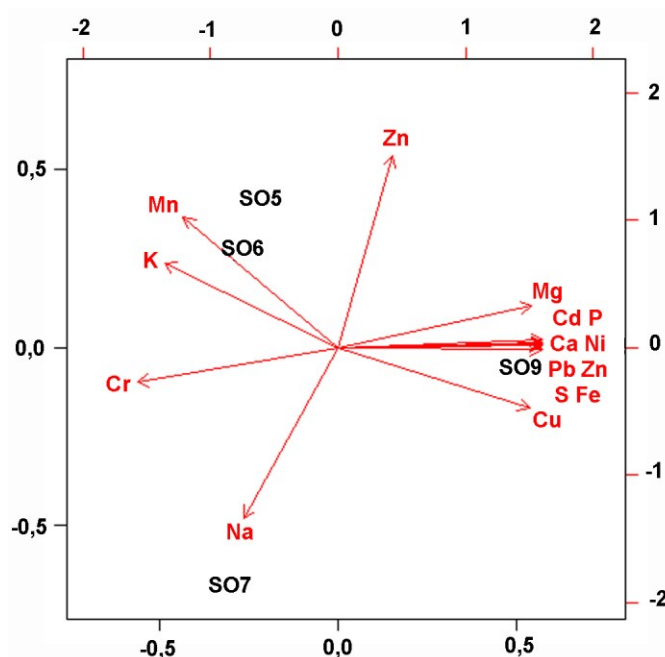


Figura 2.3. Análise de componentes principais baseada na concentração dos elementos químicos das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9.

2.3.2 Isolamento e identificação das bactérias isoladas das amostras de mina

Os meios de cultivo e as condições de crescimento utilizadas permitiram isolar 64 bactérias heterotróficas a partir das amostras ambientais, a saber: 18 da SO5, 24 da SO6, 15 da SO7 e 7 da SO9. Estes isolados representam uma fração da comunidade de bactérias presentes em ambientes de minas acessadas por métodos dependentes de cultivo, já que muitas bactérias apresentaram-se recalcitrantes ao cultivo e à manipulação em laboratório e, conseqüentemente, não foram capazes de crescer em um segundo subcultivo. Com relação às bactérias isoladas, foi feita a diferenciação macroscópica: cor, forma e tamanho da colônia e microscópica: morfologia da célula e coloração de Gram (Tabela 2.5 a Tabela 2.8).

Todos os isolados foram identificados por comparação das sequências do gene de rRNA 16S obtidas com as sequências dos bancos de dados do NCBI e RDP (Tabela 2.9) e apresentaram identidade $\geq 96\%$ (100% de cobertura). Foram observados 12 gêneros (Figura 2.4), distribuídos em três filos, sendo dois gêneros afiliados a *Firmicutes*, oito a *Proteobacteria* e dois a *Actinobacteria*.

Tabela 2.5. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO5.

Isolado	Morfologia das colônias em meio PCA/ágar TSA (cor, forma e tamanho)	Características microscópicas	
		Morfologia	Coloração de Gram
SO5.1	Creme escura, circular, 2 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO5.2	Creme escuro, circular, 2 mm / Esbranquiçada com halo transparente, circular, 2 mm	Bacilo	-
SO5.3	Creme escura, circular, 3 mm / Esbranquiçada, irregular, 3 mm	Bacilo	+
SO5.4	Creme clara, irregular, 8 mm / Esbranquiçada, arredondada, bordas regulares, mucóide, 5 mm	Bacilo	-
SO5.5	Creme clara, irregular, 5 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO5.6	Creme clara, irregular, 4 mm / Esbranquiçada, irregular, 3 mm	Bacilo	+
SO5.7	Creme clara, circular, 3 mm / Esbranquiçada com halo transparente, circular, mucóide, 2 mm	Bacilo	+
SO5.8	Creme com núcleo escuro, irregular, 7 mm / Esbranquiçada, irregular, 3 mm	Bacilo	+
SO5.9	Transparente escura, irregular, 7 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO5.10	Transparente escura, irregular, 7 mm	Bacilo	-
SO5.13	Branca, circular, 5 mm	Bacilo	+
SO5.14	Castanha, circular, 5 mm	Bacilo	+
SO5.16	Branca, circular, 4 mm	Bacilo	+
SO5.17	Branca, plana, 5 mm	Bacilo	+
SO5.18	Branca, irregular, 17 mm	Bacilo	+
SO5.19	Castanha, circular, 12 mm	Bacilo	+
SO5.20	Branca, rizóide, 10 mm	Bacilo	+
SO5.21	Branca, circular, 2 mm	Bacilo	+

Tabela 2.6. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO6.

Isolado	Morfologia das colônias em meio PCA/ágar TSA (cor, forma e tamanho)	Características microscópicas	
		Morfologia	Coloração de Gram
SO6.1	Creme nucleada com halo tipo “bolor”, 7 mm / Esbranquiçada, irregular, 7 mm	Bacilo	+
SO6.2	Creme escura, irregular, 5 mm / Amarelada, circular, 4 mm	Bacilo	+
SO6.3	Transparente clara, irregular, 4 mm / Esbranquiçada, irregular, 7 mm	Bacilo	+
SO6.4	Creme nucleada com halo tipo “bolor”, 5 mm / Esbranquiçada, circular, 2 mm	Bacilo	+
SO6.5	Branca, circular, 2 mm / Esbranquiçada, irregular, 3 mm	Bacilo	+
SO6.6	Branca, irregular, 7 mm / Esbranquiçada, irregular, 3 mm	Bacilo	+
SO6.7	Branca, irregular, 10 mm / Esbranquiçada, irregular, 3 mm	Bacilo	+
SO6.8	Branca, irregular, 8 mm / Esbranquiçada, irregular, 7 mm	Bacilo	+
SO6.9	Transparente clara, irregular, 2 mm / Esbranquiçada, irregular, 2 mm	Bacilo	+
SO6.10	Creme clara, circular, 2 mm / Esbranquiçada, circular, 4 mm	Bacilo	+
SO6.11	Branca, circular, 1,5 mm	Bacilo	-
SO6.12	Branca, circular, 3,5 mm	Bacilo	+
SO6.13	Branca, circular, 4 mm	Bacilo	+
SO6.14	Creme, circular, 4 mm	Bacilo	+
SO6.15	Branca, circular, 4 mm	Bacilo	+
SO6.16	Branca, circular, 10 mm	Bacilo	+
SO6.17	Branca, rizóide, 49 mm	Bacilo	+
SO6.18	Branca, circular, 49 mm	Bacilo	+
SO6.19	Branca, circular, 8 mm	Bacilo	+
SO6.20	Branca, circular, 12 mm	Bacilo	+
SO6.21	Creme, irregular, 8 mm	Bacilo	-
SO6.22	Branca, irregular, 2,5 mm	Bacilo	+
SO6.23	Branca, rizóide, indefinido	Bacilo	+
SO6.24	Branca, circular, 3 mm	Bacilo	+

Tabela 2.7. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO7.

Isolado	Morfologia das colônias em meio PCA/ágar TSA (cor, forma e tamanho)	Características microscópicas	
		Morfologia	Coloração de Gram
SO7.1	Cinza clara, circular, 1,5 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.2	Cinza clara, circular, 1,5 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.3	Cinza clara, circular, 1 mm / Esbranquiçada, circular, 2 mm	Cocobacilo	-
SO7.4	Cinza clara, circular, 1 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.5	Cinza clara, circular, 1 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.6	Cinza clara, circular, 1 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.7	Cinza clara, circular, 1 mm / Esbranquiçada, irregular, 7 mm	Cocos	+
SO7.8	Cinza clara, circular, 1 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.9	Cinza clara, circular, 1,5 mm / Transparente, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.10	Cinza clara, circular, 1,5 mm / Esbranquiçada, irregular, 4 mm	Bacilo	+
SO7.11	Branca, irregular, 13 mm	Bacilo	+
SO7.12	Branca, irregular, 5 mm	Bacilo	+
SO7.13	Branca, circular, 1 mm	Bacilo	-
SO7.14	Branca, circular, 6 mm	Bacilo	+
SO7.15	Branca, irregular, 10 mm	Bacilo	+

Tabela 2.8. Descrição das características macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas da amostra SO9.

Isolado	Morfologia das colônias em meio PCA/ágar TSA (cor, forma e tamanho)	Características microscópicas	
		Morfologia	Coloração de Gram
SO9.1	Bacilo - Esbranquiçada, irregular, 5 mm	Bacilo	+
SO9.2	Bacilo - Esbranquiçada, circular, 3 mm	Bacilo	+
SO9.3	Cocos - Esbranquiçada, circular, 4 mm	Cocobacilo	+
SO9.4	Cocobacilo - Rosa, irregular, 7 mm	Bacilo	+
SO9.5	Bacilo - Esbranquiçada, circular, 2 mm	Bacilo	+
SO9.6	Cocos - Alaranjada, circular, 3 mm	Bacilo	+
SO9.8	Bacilo - Esbranquiçada, circular, 4 mm	Cocos	+

Tabela 2.9. Identificação das bactérias heterotróficas isoladas das amostras de mina de cobre (SO5, SO6, SO7 e SO9).

Isolado	Número de acesso	Amostra	Identificação
SO5.1; SO7.1; SO7.5	KC859435; KC867323; KC867327	SO5, SO7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SO5.2; SO5.5; SO5.9; SO5.10	KC859436; KC859438; KC859441; KC859442	SO5	<i>Pseudomonas sp</i>
SO5.3; SO5.6; SO5.13; SO5.14; SO5.16; SO5.21; SO6.8; SO6.9; SO6.18; SO7.7	KC867292; KC859439; KC859443; KC867294; KC867295; KC867300; KC867307; KC867308; KC867316; KC859446	SO5, SO6	<i>Bacillus thuringiensis</i>
SO5.4; SO5.19; SO6.2; SO6.3; SO6.12; SO6.14; SO6.19	KC859437; KC867298; KC859444; KC867302; KC859445; KC867312; KC867317	SO5, SO6	<i>Bacillus megaterium</i>
SO5.8; SO5.17; SO5.18; SO6.5; SO6.6; SO6.7; SO6.15; SO6.17; SO6.20; SO6.22; SO6.23; SO7.10; SO7.11; SO7.15	KC867293; KC867296 KC867297; KC867304; KC867305; KC867306; KC867313; KC867315; KC867318; KC867320; KC867321; KC859447; KC867331; KC859448	SO5, SO6, SO7	<i>Bacillus cereus</i>
SO6.1; SO6.4; SO6.16	KC867301; KC867303; KC867314	SO6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
SO6.10	KC867309	SO6	<i>Bacillus simplex</i>
SO9.1	KC867335	SO9	<i>Bacillus barbaricus</i>
SO5.7; SO5.20; SO6.13; SO6.24; SO7.12; SO7.14; SO9.8	KC859440; KC867299; KC867311; KC867322; KC867332; KC867334; KC867341	SO5, SO6, SO7, SO9	<i>Bacillus sp</i>
SO6.21	KC867319	SO6	<i>Lysinibacillus sp</i>
SO6.11	KC867310	SO6	<i>Brevundimonas diminuta</i>
SO7.2; SO7.4; SO7.9	KC867324; KC867326; KC867330	SO7	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
SO7.3	KC867325	SO7	<i>Acinetobacter sp</i>
SO7.6	KC867328	SO7	<i>Ralstonia sp</i>
SO7.8	KC867329	SO7	<i>Ralstonia pickettii</i>
SO7.13	KC867333	SO7	<i>Acidovorax delafieldii</i>
SO9.2; SO9.5	KC867336; KC867339	SO9	<i>Curtobacterium sp</i>
SO9.3; SO9.6	KC867337; KC867340	SO9	<i>Kocuria marina</i>
SO9.4	KC867338	SO9	<i>Roseomonas gilardii</i>

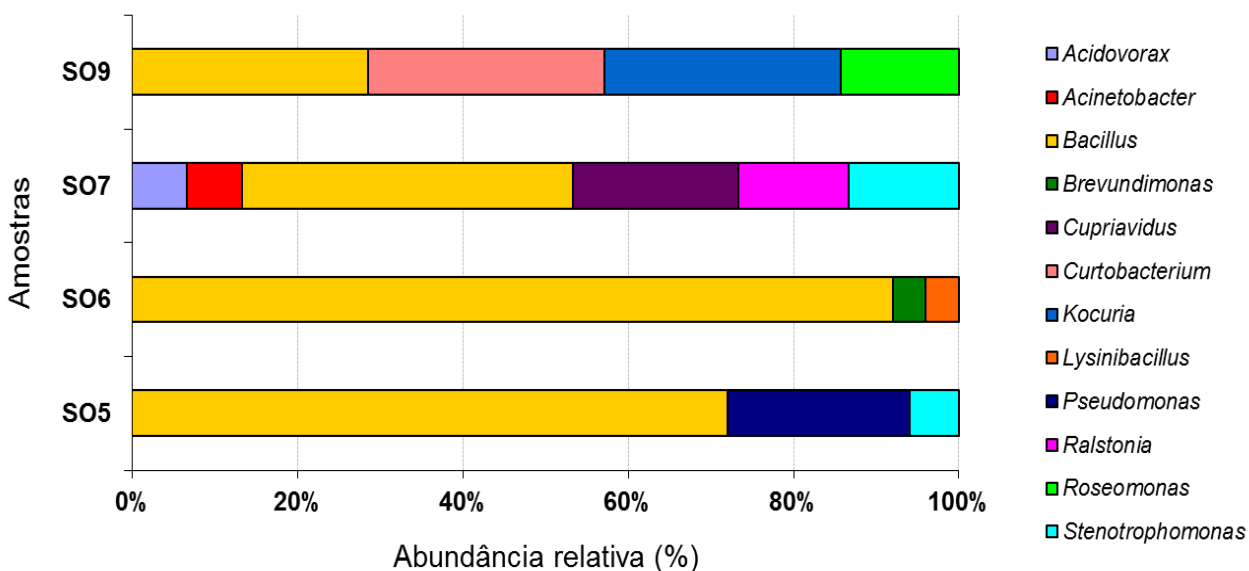


Figura 2.4. Distribuição dos diferentes gêneros das bactérias isoladas das amostras SO5, SO6 SO7 e SO9.

Os isolados dominantes observados no filo *Firmicutes* foram classificados em *Bacillus* spp. (98 a 100% de identidade), com 43 bactérias, o que corresponde aproximadamente 67% do número total de isolados. Outro isolado pertencente a este filo foi *Lysinibacillus sphaericus* (96% de identidade). Pelo menos sete diferentes espécies de *Bacillus* foram identificadas: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. simplex*, *B. barbaricus* e *Bacillus* sp. que apresentaram, respectivamente 14, 10, 7, 3, 1, 1 e 7 isolados. Estas bactérias formadoras de endosporos são amplamente distribuídas no ambiente e muitos *Bacillus* spp. são importantes degradadores de substratos orgânicos (Ravel & Fraser, 2005), de compostos xenobióticos aromáticos (Doddamani & Ninnekar, 2000; Chen *et al.*, 2012) e apresentam tolerância a metais pesados (Yilmaz, 2003). Em algumas linhagens de *Bacillus*, a resistência a metais como U, Ni, Co, Cu, Cd e a sua capacidade de acumulação foi relacionada aos genes que codificam ATPases do tipo P_{1B} e *nki* ABC transportadores, responsáveis por manter a homeostase dos metais das células (Choudhary *et al.*, 2012). Além disso, abundância de espécies do gênero *Bacillus* nas amostras de ambientes de mina pode ser atribuída à sua capacidade de formar endosporos. Essas estruturas são mais resistentes do que as células vegetativas (Nicholson *et al.*, 2000) e, por isso, possibilitam que a bactéria seja capaz de persistir no ambiente e tolerar condições adversas como a presença de substâncias que podem ser nocivas e/ou tóxicas, tais como íons de ferro, cobre e outros metais.

Considerando o filo *Proteobacteria*, foram encontrados representantes das subdivisões α , β e γ , sendo que alguns gêneros identificados neste trabalho já foram detectados em outros ambientes de mineração (Schippers *et al.*, 2010) e certas linhagens podem apresentar a capacidade de bioacumular metais (Choudhary & Sar, 2009; Nangia *et al.* 2009; Bhattacharya & Gupta 2013). Foi identificado um isolado de *Brevundimonas diminuta* (99% de identidade) e *Roseomonas gilardii* (98% de identidade), ambas *Alphaproteobacteria* resistentes a metais. Para *Betaproteobacteria* foi identificado um isolado de *Acidovorax delafieldii* (98% de identidade) e dois isolados de *Ralstonia* spp (*Ralstonia* sp e *R.pickettii* com 99 e 100% de identidade, respectivamente). Ademais, foram identificados três isolados de *Cupriavidus metallidurans* (97 a 99% de identidade), bactéria resistente a metais (Mergeay *et al.*, 2003; Fairbrother *et al.*, 2013) e capaz de biomineralizar ouro (Reith *et al.*, 2009). Na subdivisão *Gammaproteobacteria* foram identificados quatro isolados de *Pseudomonas* (98 a 99% de identidade); três isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* (98 a 99% de identidade) e um isolado de *Acinetobacter* sp. (99% de identidade). Bactérias destes gêneros também apresentaram elevada capacidade de bioacumular metais (Nangia *et al.*, 2009; Bhattacharya & Gupta, 2013). Os demais isolados foram do filo *Actinobacteria*, sendo dois classificados em *Kocuria marina* (98% de identidade) e dois em *Curtobacterium* sp (98 a 99% de identidade). A bactéria acidófila moderada *Curtobacterium ammoniigenes* isolada de rejeitos de mina de pirita foi capaz de dissolver hidróxido de ferro (Nancucheo & Johnson, 2011) e assim como as bactérias quimiorganotróficas *Acidocella*, *Acidiphilium* e *Acidobacterium* spp., *Curtobacterium* sp. podem ser indicadores biológicos do impacto ocasionado pela drenagem de mina.

Selenska-Pobell *et al.* (2002) analisaram a diversidade microbiana presente em resíduos de usinas de urânio no qual foi composta por bactérias pertencentes principalmente pelos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, dentre outros, sendo que em uma das amostras analisadas 35% das espécies eram da classe *Bacilli*. As bactérias heterotróficas utilizam os compostos orgânicos, como os exudatos e lisados de células derivados de outros micro-organismos autotróficos (Johnson, 1998; Johnson, 2001). Consequentemente, muitas bactérias heterotróficas isoladas dos ambientes de mina podem apresentar relação com outras espécies de bactérias e desempenhar funções essenciais, por exemplo, para as bactérias quimiolitototróficas, cuja matéria orgânica inibe o seu crescimento. Existem poucos estudos sobre bactérias heterotróficas isoladas de ambientes de mina e questões biológicas importantes

ainda não foram respondidas. São elas: qual a importância destas bactérias nesse ambiente? Estas bactérias produzem compostos de interesse biotecnológico? Neste sentido, foi empregada a triagem funcional para verificar se as bactérias isoladas das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9 são capazes de produzir enzimas e compostos e/ou possíveis interações entre as bactérias.

2.3.3 Caracterização funcional das bactérias heterotróficas: capacidade de produção de enzimas e compostos

2.3.3.1 Detecção de protease

A atividade proteolítica foi determinada pela formação de um halo transparente no meio, resultado da hidrólise da caseína do leite – Figura 2.5a (p). A Figura 2.5a (n) mostra o caso negativo para a atividade proteolítica. Trinta e dois isolados produziram protease e os isolados positivos que mais produziram a enzima estão afiliados aos gêneros *Bacillus* e *Stenotrophomonas* (Tabela 2.10). Considerando os isolados positivos 11 (34%) pertencem à amostra SO5, 16 (50%) a amostra SO6 e cinco (16%) a amostra SO7 – Figura 2.5b. Nenhuma bactéria isolada da amostra SO9 apresentou atividade proteolítica, provavelmente porque esta amostra era composta de minério sulfetado de cobre, sem a presença de água, e que pode ter afetado a capacidade metabólica das bactérias para a degradação de proteínas.

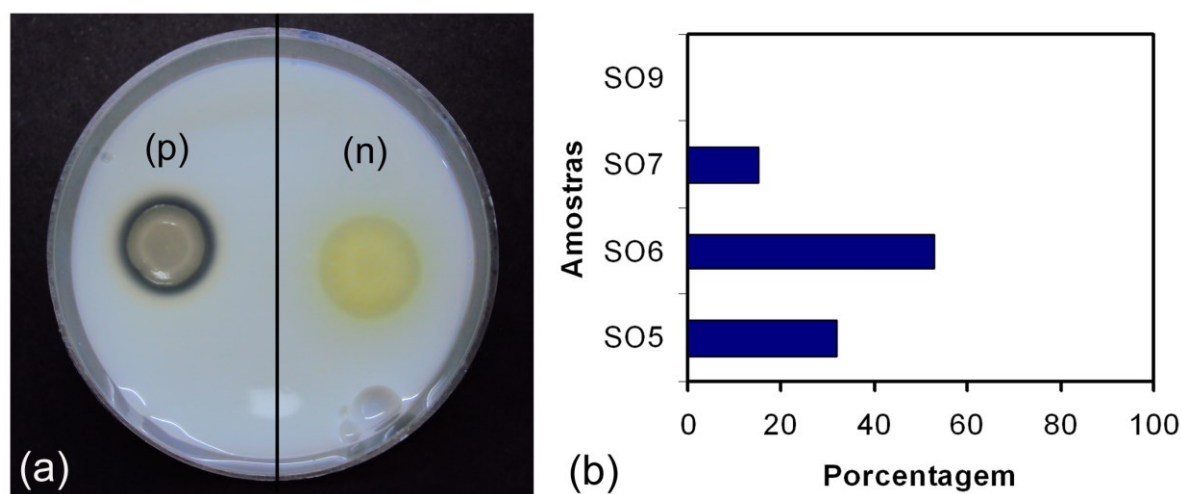


Figura 2.5. (a) teste para a protease, mostrando o caso positivo (p) e o negativo (n). Em (b) é representada a porcentagem das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9 em relação ao total do número de isolados positivos.

Tabela 2.10. Bactérias positivas para a produção de protease

Identificação	Isolados positivos para protease
<i>Bacillus sp</i>	SO6.13
<i>B. amyloliquefaciens</i>	SO6.1; SO4.4; SO6.16
<i>B. cereus</i>	SO5.8; SO5.17; SO7.18; SO6.5; SO6.6; SO6.7; SO6.15; SO6.20; SO6.22; SO7.10; SO7.11; SO7.15
<i>B. thuringiensis</i>	SO5.3; SO5.6; SO5.13; SO5.14; SO5.16; SO5.21; SO6.12; SO6.14; SO6.19 SO7.1
<i>B. megaterium</i>	SO6.2; SO6.12; SO6.14; SO6.19
<i>S. maltophilia</i>	SO5.1; SO7.1

A maior aplicação das proteases está associada à produção de detergentes e apesar das proteases serem produzidas por uma vasta gama de micro-organismos, as proteases produzidas pelos *Bacillus spp* dominam o mercado industrial de enzimas (Schallmeyer *et al.*, 2004, Taylor *et al.*, 2012). Nesta análise, 30 isolados do gênero *Bacillus* foram capazes de produzir protease. As outras duas bactérias capazes de produzir a enzima foram *S. maltophilia* (SO5.1 e SO7.1). Bactérias dessa espécie podem crescer em altas concentrações de metais pesados (Pages *et al.*, 2008) e, para algumas linhagens, a produção de protease tem sido reportada como determinante na virulência (Crossman *et al.*, 2008). Em ambientes de mina, as bactérias heterotróficas utilizam os compostos orgânicos gerados pelos micro-organismos autotróficos e quimiolitotróficos (Johnson, 2010; Schippers *et al.*, 2013). Assim, o elevado número de isolados com atividade proteolítica pode estar relacionado ao processo da ciclagem de nutrientes em ambientes de mina.

2.3.3.2 Detecção de sideróforos

O potencial de produção de sideróforos pelas bactérias heterotróficas isoladas foi avaliado de acordo com a alteração da coloração do meio de cultura. Sessenta bactérias foram capazes de produzir sideróforos. A Tabela 2.6 mostra alguns tipos de sideróforo produzidos pelas bactérias. O meio *overlay* CAS sem o inóculo é apresentado na Tabela 2.6 (a). Algumas bactérias produziram apenas um tipo de sideróforo (hidroxamato, catecolato ou carboxilato: Tabela 2.6 (b), (c) e (d) respectivamente), enquanto que outras apresentaram mais de um tipo – Tabela 2.6 (e).

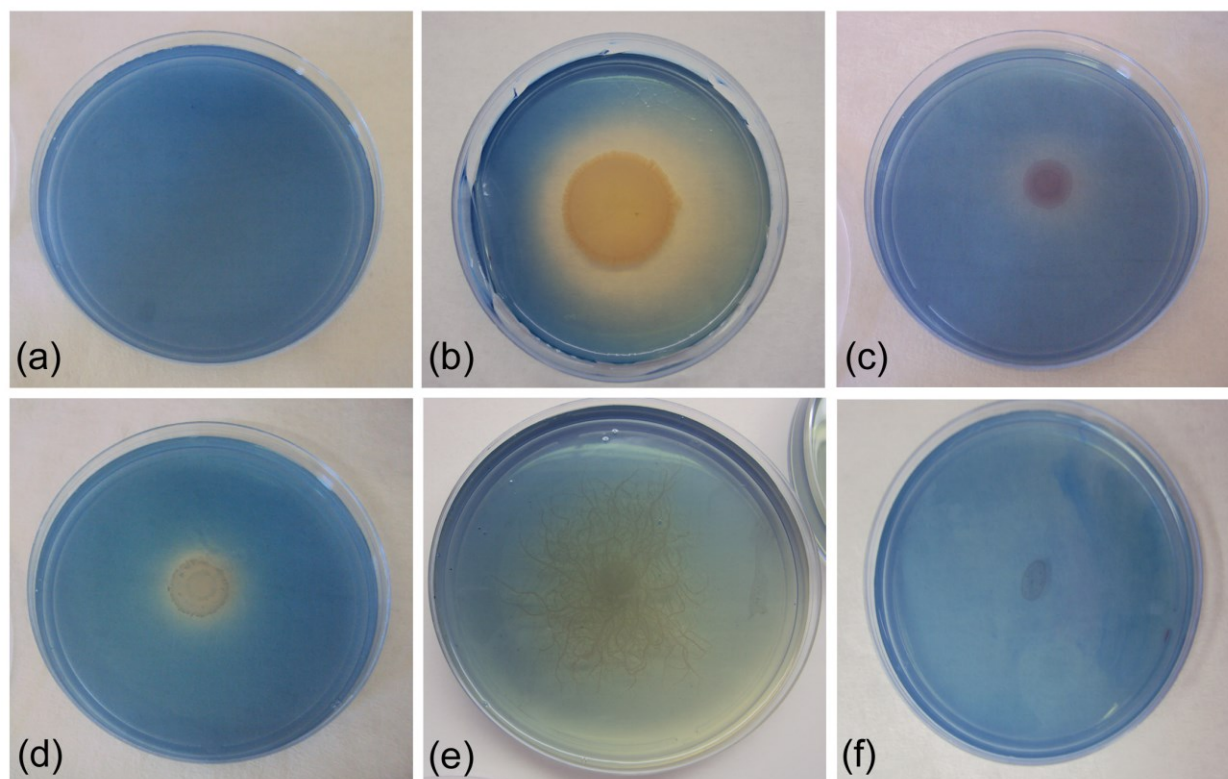


Figura 2.6. Tipos de sideróforos produzidos pelas bactérias heterotróficas (a) meio *overlay* CAS sem inóculo, (b) hidroxamato, (c) catecolato (d) carboxilato (e) mistura de carboxilato e hidroxamato, (f) ausência da produção de sideróforo.

O sideróforo classificado em catecolato foi produzido por um maior número de bactérias, com 17 isolados, seguido pelo hidroxamato, com 11 isolados e apenas quatro isolados produziram o sideróforo carboxilato (Tabela 2.11). Vinte e oito bactérias produziram mais de um tipo de sideróforo, sendo observadas as misturas de carboxilato-hidroxamato (17 isolados), hidroxamato-catecolato (7 isolados), catecolato-carboxilato (1 isolado) e catecolato-carboxilato-hidroxamato (3 isolados). Em quatro isolados (SO6.11, SO7.3, SO7.14 e SO9.6 classificados respectivamente em *B. diminuta*, *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp e *K. marina*) não foi observada a produção de sideróforo (Figura 2.6f).

Tabela 2.11. Tipos de sideróforos produzidos pelas bactérias heterotróficas isoladas das amostras de mina de cobre SO5, SO6, SO7 e SO9.

Tipo de sideróforo	Isolados positivos
Hidroxamato	SO5.2, SO5.7, SO5.10, SO5.18, SO5.21, SO6.1, SO6.19, SO7.5, SO7.7, SO7.9, SO7.15
Catecolato	SO5.3; SO5.4, SO5.8, SO6.2, SO6.3, SO6.4, SO6.10, SO6.14, SO6.21, SO6.24, SO7.2, SO7.12, SO7.13, SO9.3, SO9.4, SO9.5, SO9.8
Carboxilato	SO6.13, SO6.15, SO6.18, SO6.20
Catecolato-carboxilato	SO5.6
Carboxilato-hidroxamato	SO5.1, SO5.5, SO5.9, SO5.14, SO5.16, SO5.17, SO5.20, SO6.5, SO6.6, SO6.16, SO6.22, SO6.23, SO7.1, SO7.6, SO7.8, SO7.11, SO9.2
Catecolato-hidroxamato	SO5.13, SO6.8, SO6.9, SO6.12, SO6.17, SO7.4, SO7.10
Catecolato-carboxilato-hidroxamato	SO5.19, SO6.7, SO9.1

A produção dos sideróforos (substâncias quelantes do íon férrico – Fe^{3+}) ocorre quando a disponibilidade de ferro no meio é baixa. A maioria das bactérias analisadas apresentou produção de sideróforo, sugerindo que essas bactérias podem ser capazes de desempenhar um papel fundamental na ciclagem do ferro para a microbiota local. Além disso, as bactérias produtoras de sideróforos teriam vantagem sobre outras, uma vez que a pequena quantidade de ferro disponível em um ambiente seria delas (Wandersman & Delepelaire, 2004).

Outro fator que pode ter influenciado o elevado número de bactérias produtoras de sideróforos foi o pH das amostras de mina, no qual foi em torno de 6,5. O pH pode afetar o tipo de sideróforo a ser produzido: micro-organismos que vivem em ambientes ácidos produzem carboxilato enquanto catecolato e hidroxamato são produzidos em ambientes com pH próximo do neutro (Miethke & Marahiel, 2007). Considerando as três principais classes de sideróforos detectados no meio *CAS-overlay*, catecolato e hidroxamato foram produzidos por um maior número de bactérias, enquanto o carboxilato foi produzido em menores proporções. Somente quatro isolados (SO6.15, SO6.16, SO6.18 e SO6.23), todos do gênero *Bacillus* foram capazes de produzir carboxilato e, de acordo com Pérez-Miranda *et al.* (2007), é o mais raro. A presença de micro-organismos produtores do sideróforo hidroxamato em solos com grandes quantidades de vegetais em decomposição é vantajosa (Hider & Kong, 2010). No entanto, as amostras de mina possuem a camada de vegetação escassa ou ausente e isto provavelmente explica a predominância do catecolato e a elevada produção de hidroxamato, principalmente, quando estava combinado com os sideróforos carboxilato ou catecolato.

Em ambientes onde o pH está próximo da neutralidade o ferro é geralmente encontrado em sua forma oxidada, por isso a abundância e os diferentes tipos de sideróforo podem aumentar a biodisponibilidade do ferro, principalmente para as bactérias acidófilas oxidantes de ferro do gênero *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*, que não possuem genes para a síntese de sideróforos (Osorio *et al.*, 2008). No entanto, esses micro-organismos possuem receptores para a captação do ferro e são capazes de utilizar os sideróforos produzidos por outras bactérias (Bonney & Holmes, 2012), e isto poderia aumentar a competição por ferro, consequentemente, influenciar a comunidade microbiana. Além disso, alguns *Bacillus* spp. são capazes de produzir e secretar ferrioxaminas, que auxiliam no metabolismo dessas ou de bactérias que são capazes de utilizar sideróforos exógenos (Hider & Kong, 2010). Esta propriedade mostra que existe potencial de aplicação dos sideróforos produzidos pelas bactérias heterotróficas isoladas de mina de cobre para aumentar a captação de ferro de bactérias quimiolitotróficas em pH próximo do neutro.

2.3.3.3 Triagem de betalactamase e compostos antimicrobianos

Quarenta e quatro bactérias foram capazes hidrolisar a ligação amido no anel betalactâmico, das quais 10 são bactérias Gram negativas (três isolados de *C. metaliduras* e *S. maltophilia*, um isolado de *B. diminuta*, *R. pickettii* e *Pseudomonas* sp e *R. gillardii*) e 34 são bactérias Gram positivas (*Bacillus* spp.) (Tabela 2.12), sugerindo resistência aos antibióticos betalactâmicos. Estas bactérias correspondem, respectivamente, a 34, 39, 25 e 2% dos isolados obtidos das amostras SO5, SO6, SO7 e SO9. De acordo com a intensidade da cor dos discos foram atribuídos níveis: (0), (1), (2) ou (3); no primeiro a bactéria não foi capaz de produzir betalactamase, enquanto os outros estão correlacionados com o aumento da produção da enzima, sendo maior no último (Figura 2.1).

A produção de betalactamase pelas bactérias é atribuída a um dos mais importantes mecanismos de resistência aos antibióticos betalactâmicos, que incluem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams (Babic *et al.*, 2006). Essa resistência ocorre devido à quebra da ligação amida do anel betalactâmico pelas betalactamases e, consequentemente, os antibióticos perdem a capacidade de inibir a síntese da parede celular das bactérias (Williams, 1999; Drawz & Bonomo, 2010). Em bactérias Gram positivas, as betalactamases podem ser encontradas na parte extracelular, enquanto que nas bactérias Gram negativas estão localizadas no espaço periplasmático (Livermore, 1995). Todas as bactérias Gram positivas isoladas

produtoras de betalactamase são *Bacillus* spp., portanto, a enzima provavelmente foi secretada para o meio extracelular. Além disso, a maioria desses isolados apresentou coloração vermelha intensa dos discos de cefinase (nível 3). Os demais isolados positivos para betalactamase foram bactérias Gram negativas cuja maioria apresentou intensidade da coloração dos discos de cefinase intermediária (nível 2) ou baixa (nível 1). Todavia, alguns isolados Gram negativos como *S. maltophilia*, *R. gillardii*, *C. metalidurans* e *R. pickettii* apresentaram alta intensidade de coloração dos discos de cefinase, o que corrobora o fato destas bactérias serem patógenos que apresentam resistência elevada a antibióticos betalactâmicos (Lecso-Bornet & Bergogne-Bérézin, 1997; Rafii *et al.*, 2009; Mijndonckx *et al.*, 2013).

Com relação à triagem de compostos antimicrobianos, 35 isolados foram positivos, sendo 12 *B. cereus*, 10 *B. thuringiensis*, cinco *Bacillus* sp., três *B. amyloliquefaciens*, quatro *Pseudomonas* sp e um *S. maltophilia* (Tabela 2.12). Trinta e dois isolados (*Bacillus* spp, *Pseudomonas* sp e *S. maltophilia*) foram capazes de inibir o crescimento de *S. marcescens* (duas apresentaram nível de inibição 1, 11 apresentaram nível de inibição 2 e 19 apresentaram nível de inibição 3). Os isolados que não foram capazes de inibir o crescimento de *S. marcescens* apresentaram placas com coloração avermelhada, provavelmente devido à produção de prodigiosinas, um metabólito secundário de cor avermelhada (Williams, 1973). As bactérias positivas, por outro lado, inibiram o crescimento total (nível de inibição 3) ou parcial (níveis de inibição 1 ou 2) de *S. marcescens* e produziram, respectivamente, placas não avermelhadas ou parcialmente avermelhadas (Figura 2.7). Dois isolados (SO5.13 - *B. thuringiensis* e SO6.20 - *B. cereus*) inibiram o crescimento de *S. aureus* (nível 1 de inibição) e dois isolados (SO5.8 - *B. cereus* e SO6.4 *B. amyloliquefaciens*) inibiram o crescimento de *V. parahaemolyticus* (nível de inibição 1 e 2, respectivamente). As bactérias SO5.8, SO6.4 e SO6.20 foram as que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento das linhagens de referência. SO5.8 e SO6.4 inibiram o crescimento de *B. cereus*, *S. marcescens* e *V. parahaemolyticus*, enquanto SO6.20 inibiu o crescimento de *B. cereus*, *S. marcescens* e *S. aureus*. Nenhum isolado foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli*.

Tabela 2.12. Triagem de betalactamase e detecção de antimicrobianos produzidos pelas bactérias heterotróficas isoladas de mina de cobre (SO5, SO6, SO7 e SO9).

Isolado	betalactamase	Antimicrobianos				Identificação
		BC ¹	SM ²	SA ³	VP ⁴	
SO6.1	0	0	3	0	0	<i>B. amyloliquefaciens</i>
SO6.4	0	1	1	0	2	
SO6.16	0	0	3	0	0	
SO5.8	2	1	3	0	1	<i>B. cereus</i>
SO5.17	3	1	3	0	0	
SO5.18	3	0	3	0	0	
SO6.5	2	0	3	0	0	
SO6.6	2	0	3	0	0	
SO6.7	3	1	3	0	0	
SO6.15	3	0	2	0	0	
SO6.17	2	0	0	0	0	
SO6.20	3	1	2	1	0	
SO7.10	3	0	3	0	0	
SO7.11	3	0	2	0	0	
SO7.15	3	1	3	0	0	
SO6.22	3	0	3	0	0	<i>B. megaterium</i>
SO5.4	3	0	0	0	0	
SO5.19	3	0	0	0	0	
SO6.2	3	0	0	0	0	
SO6.3	3	0	0	0	0	
SO6.12	3	0	0	0	0	
SO6.14	3	0	0	0	0	
SO6.19	3	0	0	0	0	<i>B. thuringiensis</i>
SO6.8	2	1	0	0	0	
SO6.9	3	1	2	0	0	
SO6.18	3	0	3	0	0	
SO5.3	3	1	3	0	0	
SO5.6	3	1	2	0	0	
SO5.13	2	0	0	1	0	
SO5.14	3	1	3	0	0	
SO5.16	3	1	2	0	0	
SO5.21	3	0	2	0	0	
SO7.7	0	1	0	0	0	
SO6.10	3	0	0	0	0	
SO5.7	2	0	2	0	0	
SO5.20	3	0	3	0	0	
SO6.13	0	0	3	0	0	<i>B. simplex</i>
SO7.12	3	0	3	0	0	
SO7.14	3	0	3	0	0	
SO6.11	2	0	0	0	0	<i>B. diminuta</i>
SO7.1	3	0	0	0	0	
SO7.4	3	0	0	0	0	
SO7.9	2	0	0	0	0	<i>C. metallidurans</i>
SO5.2	0	0	2	0	0	
SO5.5	0	0	2	0	0	
SO5.9	1	0	1	0	0	
SO5.10	0	0	2	0	0	<i>Pseudomonas sp</i>
SO7.8	3	0	0	0	0	
SO9.4	3	0	0	0	0	
SO5.1	2	0	3	0	0	<i>R. pickettii</i>
SO7.2	2	0	0	0	0	
SO7.5	3	0	0	0	0	
						<i>R. gillardii</i>
						<i>S. maltophilia</i>

¹BC corresponde a *Bacillus cereus*, ²SM corresponde a *Serratia marcescens*, ³SA corresponde a *Staphylococcus aureus* e ⁴VP corresponde a *Vibrio parahaemolyticus*.

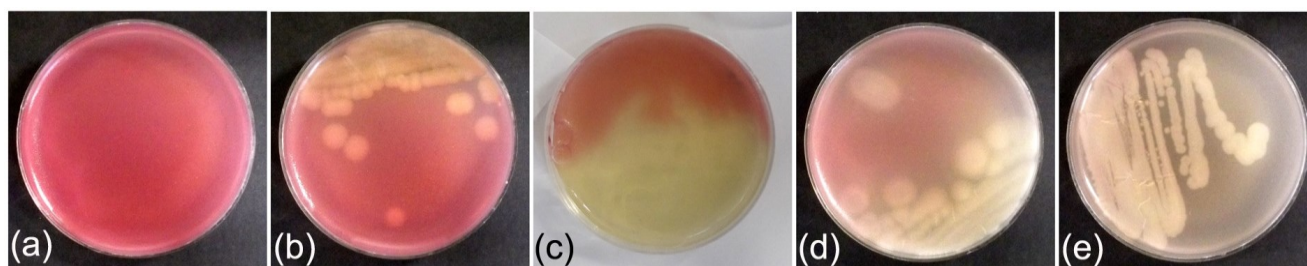


Figura 2.7. Teste antimicrobiano envolvendo a linhagem referência *S. marcescens* (a) *Serratia marcescens*; (b) Ausência de inibição de *S. marcescens* (c) Nível de inibição 1; (d) Nível de inibição 2; (e) Nível de inibição 3.

Na triagem de antimicrobianos, os isolados positivos para a produção de compostos foram afiliados aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo que o último apresentou uma significativa produção. *Pseudomonas* sp e *S. maltophilia* foram capazes de inibir somente o crescimento de *S. marcescens*. Uma considerável sensibilidade a antimicrobianos, incluindo os antibióticos betalactâmicos foi observada em *Serratia* sp. (Rodriguez *et al.*, 2007). Curiosamente, todos isolados positivos capazes de produzir betalactamase nível 3 e compostos antimicrobianos também foram capazes de inibir o crescimento de *S. marcescens*, sugerindo uma possível relação positiva entre a produção de betalactamase e inibição do crescimento dessa linhagem de referência.

Com relação ao gênero *Bacillus*, a atividade antimicrobiana foi observada para 30 isolados. Os isolados *B. cereus* representaram o maior número de isolados positivos e foram capazes de inibir quatro linhagens de referência (Tabela 2.12). Os outros isolados como *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens* foram capazes de inibir três linhagens de referência. Existe uma grande variedade de compostos antimicrobianos produzidos por espécies do gênero *Bacillus*, tais como bacteriocina (Abriouel *et al.*, 2011) lipopeptídeos (surfactina, iturina e fengicina) (Ongena & Jacques, 2008), peptídeos (tirodicina e gramicidina), sendo que a expressão dos genes relacionados com a biossíntese desses metabólitos secundários é maior durante a transição das fases logarítmica e estacionária de crescimento (Marahiel *et al.*, 1993). Além da capacidade de esporulação dos *Bacillus* spp., a produção de antimicrobianos por essas bactérias parece ser uma característica vantajosa para a sobrevivência e permanência das bactérias em ambientes de mina.

A maioria desses isolados foi capaz de produzir betalactamase e compostos antimicrobianos e, nesse sentido, a busca por novos metabólitos secundários e antibióticos a partir de mina de cobre é atrativa.

2.3.3.4 Detecção da produção de biossurfactante

A produção de biossurfactantes foi analisada por três diferentes métodos: espalhamento da gota, colapso da gota (Figura 2.8) e emulsificação do querosene (Figura 2.9). Apesar das fontes de carbono influenciarem a síntese de biossurfactantes (Cameotra & Makkar, 1998), a utilização da glicose pode resultar em diferentes classes de biossurfactantes, que podem variar de acordo com os gêneros das bactérias: ramnolipídeos por *Pseudomonas* spp e surfactina, iturina e fengicina por *Bacillus* spp. (Bodour *et al.*, 2003). Neste trabalho, 37 isolados foram positivos para o teste do espalhamento da gota. Os isolados positivos foram afiliados aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Koccuria*, *Curtobacterium* e *Cupriavidus*, e isto sugere que mais de um tipo de biossurfactante esteja sendo produzido (Tabela 2.13). Estes biossurfactantes podem desempenhar funções importantes para o ambiente de mina, como facilitar a mobilidade das bactérias, permitir o acesso aos nutrientes e a biodegradação de compostos.

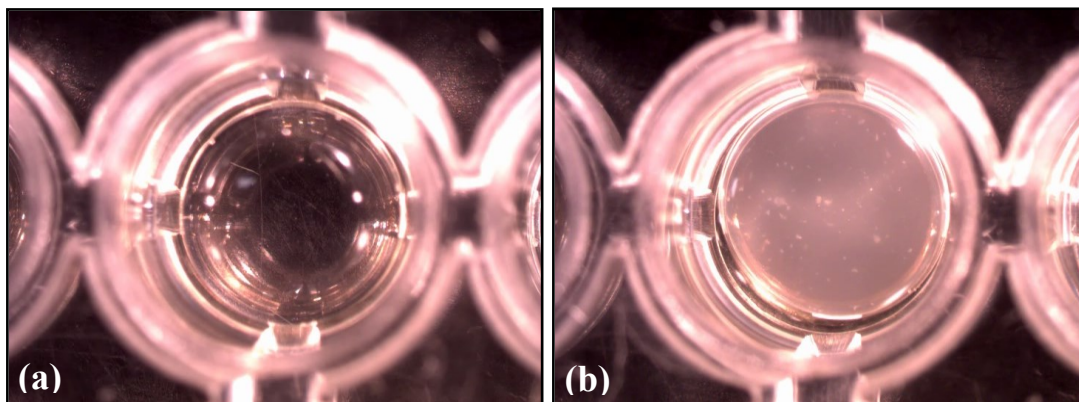


Figura 2.8. Teste do colapso da gota. (a) Colapso positivo; (b) Colapso negativo.

Tabela 2.13. Bactérias positivas para a produção de biossurfactantes.

Isolado	EG*	CG	EQ	E24	Classificação
SO6.1	+	+	+	16,7	<i>B. amyloliquefaciens</i>
SO6.4	+	-	+	85,7	
SO6.16	++	+	+	79,2	
SO5.8	++	+	+	82,9	<i>B. cereus</i>
SO5.18	+	+	+	22,2	
SO6.5	++	+	+	77,8	
SO6.6	+	-	+	79,5	
SO6.7	+	-	-	-	
SO6.15	++	+	+	73,3	
SO6.20	+++	+	+	40	
SO6.22	++	+	+	0	
SO6.23	++	-	+	100	
SO7.10	++	+	+	77,8	
SO7.11	++	+	+	100	
SO7.15	+++	+	+	88,9	
SO5.4	++	+	+	0	<i>B. megaterium</i>
SO5.19	+++	-	+	88,9	
SO6.12	++	+	+	52	
SO6.14	++	+	+	89,7	
SO6.19	++	+	+	77,3	
SO6.10	+	+	+	0	<i>B. simplex</i>
SO5.3	++	+	+	40	<i>B. thuringiensis</i>
SO5.6	++	+	+	0	
SO5.14	++	-	+	10,5	
SO6.9	++	+	+	75	
SO6.18	++	-	+	36,4	
SO7.7	+	+	+	50	
SO5.20	++	-	+	84,2	<i>Bacillus sp</i>
SO6.13	+++	+	+	68,8	
SO7.12	+	+	+	57,9	
SO7.14	++	+	+	25	
SO7.4	++	-	-	-	<i>C. metallidurans</i>
SO9.2	++	+	+	100	<i>Curtobacterium sp</i>
SO9.6	++	+	+	5,9	<i>K. marina</i>
SO5.9	+++	-	+	94,6	<i>Pseudomonas sp</i>
SO5.1	++	+	-	-	<i>S. maltophilia</i>
SO7.5	++	+	-	-	

EG: espalhamento da gota; CG: colapso da gota; EQ: emulsificação do querosene; E24 índice de emulsificação após 24 h. * Para o teste do espalhamento da gota: ‘+’ indica um diâmetro entre 0,7 e ≤ 1,0 cm, ‘++’ indica um diâmetro >1,0 e ≤ 1,2 cm, ‘+++’ indica um diâmetro > 1.2 cm.

Com relação ao teste do colapso da gota (Figura 2.8), 27 isolados foram capazes de produzir biossurfactante e estes isolados também foram positivos para o teste do espalhamento da gota (Tabela 2.13). De fato, alguns isolados não detectados pelo teste do colapso da gota produziram biossurfactantes no teste do espalhamento da gota, como SO5.9 (*Pseudomonas* sp.) SO7.4 (*C. metallidurans*), SO5.14 SO5.9, SO5.20 SO6.4, SO6.6, SO6.7 SO6.18, e SO6.23 (*Bacillus* spp.). O teste do espalhamento da gota é mais sensível para a triagem de biossurfactantes e o diâmetro da área clara está associado à produção de surfactante (Youssef *et al.*, 2004). Isso explica o maior número de bactérias positivas para a produção de biossurfactante por meio deste teste (27% superior ao teste do colapso da gota).

Muitas espécies de *Bacillus* isoladas das amostras de mina de cobre foram capazes de produzir protease, sideróforos, betalatacase e compostos antimicrobianos, sugerindo versatilidade metabólica e biológica. Isto não foi diferente quando considerada a produção de biossurfactantes, já que o maior número de bactérias positivas é representado por *Bacillus*, o que reforça a capacidade metabólica desses isolados para sobreviverem e competirem com as demais bactérias no ambiente de mina. Além da propriedade de emulsificação, alguns biossurfactantes da classe lipopeptídica produzidos por *Bacillus* spp. possuem atividade antimicrobiana (Sansinea & Ortiz, 2011; Kumar *et al.*, 2013) e, conseqüentemente, interações entre as bactérias como *quorum-sensing*, formação e manutenção de biofilmes poderiam ser afetadas.

Ambientes de mina possuem elevada concentração de metais e a solubilidade e adsorção destas partículas no solo pode ser lenta, tornando-os contaminados, logo acarreta sérios prejuízos ambientais. Os biossurfactantes, devido as suas propriedades anfipáticas, aumentam a solubilidade da água e podem contribuir para a remoção de poluentes do meio ambiente e/ou auxiliarem outras bactérias envolvidas em biorremediação e/ou biolixiviação. A adição do biossurfactante lipopeptídico composto por uma mistura de fengicina e surfactina proveniente de *Bacillus subtilis* em amostras de solo contaminado contribuiu para a remoção de poluentes, como cádmio, cobalto, zinco, cobre, chumbo, níquel e hidrocarbonetos derivados do petróleo (Singh & Cameotra, 2013). Em amostras de rejeitos oxidados de mina, a adição de 0,1% de ramnolipídeo à solução de extração foi capaz de aumentar significativamente a remoção de arsênio e metais pesados (Cu, Pb e Zn) do meio (Wang & Mulligan, 2009).

As bactérias que produziram biossurfactante pelos testes do colapso da gota ou espalhamento da gota foram avaliadas quanto à emulsificação do querosene (Figura 2.9). Trinta e três isolados

foram positivos e os índices de emulsificação variaram de 0 a 100%, sendo que 21 deles apresentaram emulsão estável após 24 h (Tabela 2.11, Figura 2.9).

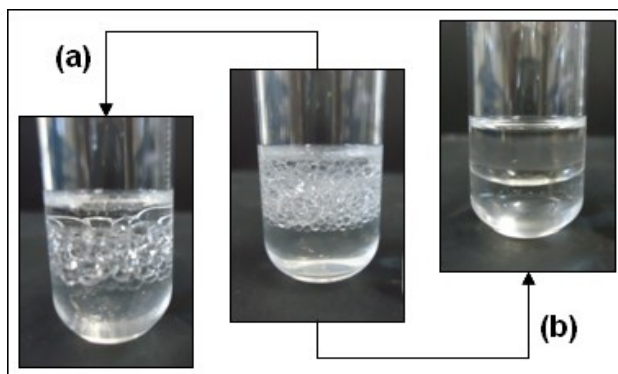


Figura 2.9. Teste da emulsificação do querosene. (a) Emulsão estável após 24 h; (b) Emulsão não estável após 24 h.

Os isolados capazes de produzir biossurfactantes pelos três métodos utilizados estão afiliados aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Curtobacterium*. Os dois primeiros gêneros são conhecidos na literatura pela capacidade de produzirem biossurfactantes, porém foi encontrado um novo isolado de *Curtobacterium* capaz de produzir biossurfactante. Os isolados SO9.2 (*Curtobacterium* sp.), SO7.11 e SO6.23 (*B. cereus*) apresentaram o índice de emulsificação estável em 100% em 24 h e seus compostos podem ser promissores para a biorremediação de solos e efluentes contaminados com metais ou auxiliar outras bactérias envolvidas em biolixiviação.

2.3.3.5 Triagem de alto desempenho

Cinquenta e seis bactérias, das quais 18 pertenciam à amostra SO5, 23 à amostra SO6 e 15 à amostra SO7 foram avaliadas para a detecção de hidrolases e monoxigenases sendo positivas, 75% e 20%, respectivamente (Tabela 2.14). Foram consideradas bactérias com atividades hidrolíticas ou oxidativas excepcionais aquelas que apresentaram capacidade de conversão acima de 99% ou 10%, respectivamente. As hidrolases tiveram as atividades enzimáticas consideradas em 24 h, as quais foram utilizadas as sondas para a detecção de epóxido hidrolases (**1** ou **3**), esterases (**5**, **7** ou **9**) (Tabela 2.2). Em relação às monoxigenases, foram utilizadas as sondas **11**, **13**, **15** ou **17** (Tabela 2.2) e as atividades enzimáticas foram consideradas até 72 h.

Tabela 2.14. Produção de esterase e monoxigenase por bactérias heterotróficas isoladas de drenagens determinadas por fluorimetria.

Isolado	Conversão enzimática (%)						
	5	7	9	11	15	17	19
SO5.1	--	29	--	3	1	--	--
SO5.2	--	--	--	9	--	12	--
SO5.3	45	--	--	--	--	--	--
SO5.4	--	--	--	--	16	--	--
SO5.5	--	--	--	--	14	7	--
SO5.6	>99	21	--	--	--	--	--
SO5.7	--	10	5	--	--	30	--
SO5.8	63	--	--	--	--	--	--
SO5.9	--	--	--	--	5	21	--
SO5.10	--	17	--	--	--	29	--
SO5.13	>99	11	--	--	--	--	--
SO5.14	76	10	--	--	--	--	--
SO5.16	64	--	--	--	--	--	--
SO5.17	70	--	--	--	--	--	--
SO5.18	90	8	--	8	--	--	--
SO5.19	--	18	--	--	--	--	--
SO5.21	76	--	--	--	--	--	--
SO6.2	--	56	--	--	29	--	--
SO6.3	--	19	--	--	--	--	--
SO6.4	--	15	--	--	--	--	--
SO6.5	84	6	--	--	--	--	--
SO6.6	33	--	--	--	--	--	--
SO6.7	89	--	--	--	--	--	--
SO6.8	69	--	--	--	--	--	--
SO6.9	57	--	--	--	--	--	--
SO6.12	14	>99	--	6	--	--	--
SO6.14	--	17	--	--	--	--	--
SO6.15	88	18	--	--	--	--	--
SO6.16	--	15	--	--	--	--	--
SO6.18	--	33	--	--	--	--	--
SO6.19	--	9	--	--	--	--	--
SO6.20	82	--	--	--	--	--	--
SO6.22	75	--	--	--	--	--	--
SO7.1	--	13	--	--	--	--	--
SO7.2	--	27	11	14	--	--	--
SO7.3	91	46	--	--	--	--	--
SO7.6	25	12	--	--	--	--	--
SO7.7	>99	--	--	--	--	--	--
SO7.8	19	11	--	--	--	--	--
SO7.9	--	13	--	--	--	--	--
SO7.10	>99	--	--	--	--	--	--
SO7.11	80	--	--	--	--	--	--
SO7.12	10	11	--	--	--	--	--
SO7.13	--	31	--	--	--	--	--
SO7.14	21	11	--	--	--	--	--
SO7.15	>99	--	--	--	--	--	--

Em 24 horas, nenhum micro-organismo apresentou a capacidade de hidrolisar as sondas **1** ou **3** específicas para a triagem de epóxido-hidrolases a seus respectivos produtos (**2** ou **4**, Tabela 2.2). A atividade frente a esses substratos foi observada apenas após 72 h (resultados não apresentados). Entretanto, dentre os isolados positivos as conversões foram inferiores a 10%, isso torna pouco atrativa a utilização direta desses biocatalisadores. Para a detecção de esterases, 27 bactérias (9 isolados de cada amostra analisada) foram capazes de hidrolisar o composto **5** em **6** (Tabela 2.2), sendo que cinco delas (três *B. thuringiensis* SO5.6, SO5.13, SO7.7 e dois *B. cereus* SO7.10 e SO7.15) converteram mais do que 99% do substrato (Tabela 2.14). Isso sugere a presença de enzimas específicas para a hidrólise de acetatos. A sonda **7** foi hidrolisada ao composto **8** (Tabela 2.2) por 26 bactérias (Tabela 2.14), (oito da amostra SO5, dez da amostra SO6 e oito da amostra SO7), com destaque para SO6.12 (*B. megaterium*), cuja performance de conversão foi superior a 99% indicando potencialmente a presença de esterases específicas para propionatos.

Os resultados obtidos para as sondas **5** e **7** permitiram classificar as bactérias em quatro grupos distintos: a) 15 bactérias que catalisaram seletivamente a hidrólise de ésteres de acetato (**5**), b) 15 bactérias que hidrolisaram seletivamente ésteres de propionato (**7**), c) 12 bactérias que não discriminaram os substratos **2** e **3** e d) 14 bactérias que não apresentaram atividade de esterase. As bactérias heterotróficas foram seletivas por ésteres de cadeia curta e somente dois isolados (SO5.7 e SO7.2, respectivamente, *Bacillus* sp e *C. metallidurans*) foram capazes de hidrolisar ésteres de cadeia média (sonda **9**) (Tabela 2.14).

Em relação a capacidade oxidativa para as sondas fluorogênicas utilizadas (sondas **11**, **13**, **15** e **17**) somente 11 isolados foram positivos. Cinco isolados: SO5.2, SO5.5, SO5.9 e SO5.10 (*Pseudomonas* sp) e SO5.7 (*Bacillus* sp) foram capazes de converter o composto **11** em **12** (Tabela 2.2), o que mostra a atividade de monoxigenases que oxidam cetonas alifáticas. Cinco isolados: SO5.4 e SO6.2 (*B. megaterium*), SO5.5, SO5.9 (*Pseudomonas* sp.) e SO5.1 (*S. maltophilia*) foram capazes de converter o composto **13** em **14** (Tabela 2.2), indicando a presença de monoxigenases que oxidam cetonas cíclicas. Cinco isolados: SO5.1 (*S. maltophilia*), SO5.2 (*Pseudomonas* sp.), SO5.18 (*B. cereus*), SO6.12 (*B. megaterium*) e SO7.2 (*C. metallidurans*) foram capazes de converter o composto **15** em **16** (Tabela 2.2), sugerindo a presença de monoxigenases capazes de oxidar cetonas cíclicas. Nenhuma bactéria apresentou atividade em relação à sonda **17**.

A maioria das bactérias que apresentou atividade enzimática excepcional pertencem ao gênero *Bacillus*, que é representada pela ampla distribuição das espécies *Bacillus* spp., incluindo ambientes de mina (Freitas *et al.*, 2008a; Dhanjal & Cameotra, 2010), além da habilidade de degradar compostos orgânicos (Stulke & Hillen, 2000) ou xenobióticos, incluindo o adido 3-fenoxibenzóico (Chen *et al.*, 2012).

Os outros importantes gêneros foram *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*, cujas espécies foram previamente isoladas de solos contaminados com metais pesados e outras amostras de ambientes de mineração (Freitas *et al.*, 2008b; Morel *et al.*, 2009, Choudhary & Sar, 2011). As esterases estão presentes nos animais, plantas, micro-organismos e atuam como catalisadores nas reações de clivagem e na formação de ligações éster (Jaeger & Reetz, 1998). Já as monoxigenases promovem a catalisação das reações de oxidação de grupos cetonas, enxofre, selênio, nitrogênio e fósforo (Willettts, 1997). Estas enzimas apresentam tolerância a uma grande variedade de substratos e possuem elevada régio e esteroespecificidade e, por isso, estes biocatalisadores são bastante empregados em processos industriais e na química fina (Jaeger *et al.*, 1999; Hasan *et al.*, 2006). Um provável motivo para existência destes biocatalisadores em ambientes de mina pode estar associado com o processo da decomposição de nutrientes. Assim sendo, uma importante função desempenhada pelas bactérias heterotróficas pode estar associada à assimilação de compostos orgânicos (enzimas hidrolíticas). Em geral, as maiores atividades de oxidação foram observadas para as bactérias isoladas da amostra SO5 (Tabela 2.14) e isso sugere que estes micro-organismos auxiliem na oxidação de compostos orgânicos presentes no ambiente. Hidrolases e monoxigenases são frequentemente empregadas em processos de biocatálise industriais (Kirk *et al.*, 2002) e a busca por outras fontes dessas enzimas é essencial para o desenvolvimento de novos processos. Por isso, as bactérias que apresentaram melhor produção de enzimas oxidativas foram avaliadas por multibiorreações quanto à capacidade biooxidação de sulfetos orgânicos.

2.3.3.6 Ensaios de multibiorreação

Os ensaios de multibiorreação mostraram que bactérias isoladas de drenagem neutra de mina são capazes de oxidar sulfetos orgânicos a seus respectivos sulfóxidos (Tabela 2.3). Compostos orgânicos de enxofre reduzido, como os sulfetos, foram testados por estarem presentes em

rejeitos industriais. Além disso, esses sulfetos orgânicos geralmente provocam odor desagradável e danos ambientais e como são agentes causadores de poluição, a oxidação/biorremediação de sulfetos apresenta importância ecológica (Habibi & Vosooghian, 2005; Muyzer & Stams, 2008). Foram avaliados oito isolados: SO5.1 (*S. maltophilia*), SO5.2, SO5.5, SO5.9 e SO5.10 (*Pseudomonas* sp.); SO5.4 e SO6.2 (*B. megaterium*), SO5.7 (*Bacillus* sp.) e todos foram capazes de catalisar a oxidação de pelo menos um dos substratos, sendo o substrato **19** (Tabela 2.15) preferencial em todos os casos. Devido à natureza dos compostos utilizados nem todas as bactérias analisadas foram capazes transformar todos os substratos nas multibiorreações. O composto **26** não foi oxidado por nenhuma bactéria (Tabela 2.15).

Tabela 2.15. Conversão cromatográfica dos ensaios de multibiorreação para a oxidação de sulfetos catalisados por bactérias isoladas de drenagem de mina.

Isolado	Conversão enzimática			
	19	21	23	26
SO5.1	3	1	--	--
SO5.2	1	--	--	--
SO5.4	20	7	11	--
SO5.5	7	--	1	--
SO5.7	10	--	1	--
SO5.9	22	7	30	--
SO5.10	4	--	--	--
SO6.2	12	5	9	--

As enantiosseletividades para a biooxidação de sulfetos catalisadas por SO5.4, SO5.9 e SO6.2 foram analisadas por CG-DIC e mostraram excesso enantiomérico baixo (de 5 a 15%, resultados não apresentados). Entretanto, a oxidação de *cis*-**21** foi predominantemente diasterosseletiva (mais de 99%), fornecendo apenas a mistura racêmica *trans-trans*-**22** (Figura 2.10). A oxidação do átomo de enxofre é a primeira etapa da biorremediação, levando a formação de sulfóxidos (monoxigenação) ou sulfonas (dioxigenação), que são menos voláteis e tem um odor menos desagradável. Adicionalmente, os sulfóxidos são compostos industriais relevantes e geralmente são utilizados como precursores de aromas e sabores, fármacos e em síntese orgânica (Bentley 2005, Fernández & Khiar, 2003). A produção do composto racêmico pelos isolados SO5.4, SO5.9 e SO6.2 indica que a biooxidação de sulfetos orgânicos pode ser promissora.

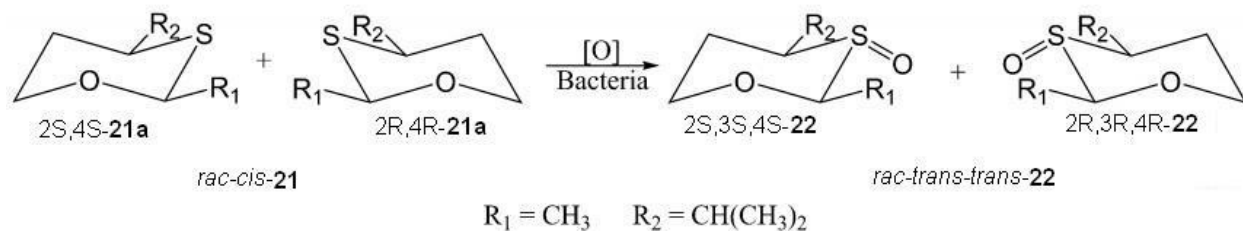


Figura 2.10. Biooxidação diasterosseletiva do sulfeto rac-cis-21 catalisado pelas bactérias SO5.4, SO5.9 e SO6.2.

Dentre as bactérias avaliadas, SO5.9 (*Pseudomonas* sp.) foi a que apresentou melhor desempenho para a oxidação de sulfetos, seguida por SO5.4 e SO6.2 (*B. megaterium*), pois oxidaram os substratos **19**, **21** e **23** a seus respectivos sulfóxidos (Tabela 2.15) em bons rendimentos. Mahmood *et al.* 2009 identificaram *Pseudomonas stutzeri* QZ1 em um reator de lodo anóxico operado em condições de redução de nitrito e esta bactéria apresentou capacidade de oxidação de sulfetos e redução de nitrito. Em reatores de lodo foi identificada *Pseudomonas* sp C27, que foi capaz de converter eficientemente o sulfeto a enxofre elementar com geração de energia mostrando, deste modo, que a oxidação de sulfetos pode ser aplicada a geração de eletricidade a partir de efluentes industriais (Lee *et al.*, 2012). Neste sentido, as bactérias isoladas de mina possuem potencial de aplicação como biocatalisadores em sínteses orgânicas e biorremediação, corroborando com os dados da literatura que mostram o uso de *Pseudomonas* e *Bacillus* em aplicações biotecnológicas.

2.4 CONCLUSÃO

Esta análise representa o primeiro estudo que identificou bactérias heterotróficas capazes de produzir enzimas e compostos obtidos de ambientes de mineração no Brasil. A comunidade de bactérias heterotróficas de ambientes de mina de cobre ativa foi caracterizada por métodos dependentes de cultivo e os isolados estão afiliados em 12 gêneros. Com base no sequenciamento do gene de rRNA 16S, *Bacillus* foi o grupo mais abundante e diverso, porém pouco relacionado a ambientes de mineração. Todas as bactérias foram capazes de produzir pelo menos um tipo de composto triado e mostra que na comunidade de bactérias heterotróficas também existem padrões

de diversidade estrutural e funcional.

As bactérias heterotróficas isoladas de mina de cobre apresentaram potencial de produção de protease, esterase, monoxigenase, sulfoxidase, sideróforo, betalactamase, antimicrobianos e biosurfactantes, e por estarem associados ao metabolismo de compostos orgânicos e inorgânicos podem desempenhar funções importantes para a microbiota do local. Algumas destas funções são aumentar a biodisponibilidade do ferro, permitir o acesso aos nutrientes, facilitar a mobilidade de bactérias, dentre outras.

Desta maneira, as enzimas e compostos obtidos a partir destas bactérias podem ser promissoras em processos biotecnológicos e industriais, tais como biorremediação ou biolixiviação.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H.; Franz, C. M.; Omar, N. B.; Gálvez, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35(1):201-232.
- Ahmed, E.; Holmstrom, S. J. M. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnol* 7(3):196-208.
- Andrews, S. C.; Robinson, A. K.; Rodríguez-Quñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215-237.
- Babic, M.; Hujer, A. M.; Bonomo, R. A. (2006) What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* 9(3):142-156.
- Ballouche, M.; Cornelis, P.; Baysse, C. (2009) Iron metabolism: a promising target for antibacterial strategies. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 4(3):190-205.
- Banat, I. M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M. G.; Fracchia, L.; Smyth, T. J.; Marchant, R. (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):427-444.
- Bentley, R. (2005) Role of sulfur chirality in the chemical processes of biology. *Chem Soc Rev* 34:609-624.
- Bertrand, S.; Helesbeux, J. J.; Larcher, G.; Duval, O. (2013) Hydroxamate, a key pharmacophore exhibiting a wide range of biological activities. *Mini Rev Med Chem* 13(9):1311-1326
- Bhattacharya, A, Gupta (2013) Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and

- detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environ Sci Pollut Res* doi: 10.1007/s11356-013-1728-4.
- Bodour, A. A.; Miller-Maier, R. M. (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 32:273-280.
- Bodour, A. A.; Drees, K.P.; Maier, R. M. (2003) Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* 69(6):3280-3287.
- Bonnefoy, V.; Holmes, D. S. (2012) Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ Microbiol* 14(7):1597-1611.
- Bradl, H. B (2004) Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *J Colloid Interface Sci*, 277(1):1-18.
- Braud, A.; Jézéquel, K.; Vieille, E.; Tritter, A.; Lebeau, T. (2006) Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. *Water Air Soil Pollut* 6:261-279.
- Cameotra, S. S.; Makkar, R. S. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:520-529.
- Chen, Z.W.; Liu Y.Y.; Wu J. F.; She Q.; Jiang C. Y.; Liu S. J. (2007) Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:688-698.
- Chen, S.; Hu, W.; Xiao, Y.; Deng, Y.; Jia, J.; Hu, M. (2012) Degradation of 3-Phenoxybenzoic Acid by a *Bacillus* sp. *PLoS ONE* 7(11):e50456.
- Choudhary, S.; Sar, P. (2009) Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+}) sequestration. *Bioresour Technol* 100 (9):2482-2492.
- Choudhary, S.; Sar, P. (2011) Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. *J Hazard Mater* 186:336-343.
- Choudhary, S.; Islam, E.; Kazy, S. K.; Sar, P. (2012) Uranium and other heavy metal resistance and accumulation in bacteria isolated from uranium mine wastes. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47(4):622-637.
- Coico, R. (2005) Gram Staining. *Curr Protoc Microbiol*. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs00.
- Cole, J. R.; Chai, B.; Farris, R. J.; Wang, Q.; Kulam, S. A.; McGarrell, D. M.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M. (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33:D294-D296.

- Cooper, D. G.; Goldenberg, B. G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53(2):224-229.
- Crossman, L. C.; Gould, V. C.; Dow, J.M.; Vernikos, G. S.; Okazaki, A.; Sebahia, M.; Avison M. B (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* doi: 10.1186/gb-2008-9-4-r74.
- de Andrade, J. C.; de Abreu, M. F. Análise Química de Resíduos Sólidos para Monitoramento e Estudos Agroambientais, Editora IAC, Campinas, 2006, 178 p.
- de Carvalho C. C. (2011) Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotech Adv* 29(1):75-83.
- Demain, A. L.; Adrio, J. L. (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol* 38:41-55.
- Dhanjal, S.; Cameotra, S. S. (2010) Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb Cell Fact* 9:52-62.
- Doddamani, H. P.; Ninnekar H. Z. (2000) Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species. *Curr Microbiol* 41(1):11-14.
- Dopson, M.; Baker-Austin, C.; Koppineedi, P. R.; Bond, P. L. (2003) Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149:1959-1970.
- Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. (2010) Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23(1):160-201.
- Eaton, A. D.; Franson, M. H. (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- Fairbrother, L.; Etschmann, B.; Brugger, J.; Shapter, J.; Southam, G.; Reith, F. (2013) Biomineralization of gold in biofilms of *Cupriavidus metallidurans*. *Environ Sci Technol* 47(6):2628-2635.
- Fernández, I.; Khier, N. (2003) Recent developments in the synthesis and utilization of chiral sulfoxides. *Chem Rev* 103(9):3651-3706.
- Ferrer, M.; Golyshina, O. V.; Plou, F. J.; Timmis, K. N.; Golyshin, P. N. (2005) A novel α -glucosidase from the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* strain Y with high transglycosylation activity and an unusual catalytic nucleophile. *Biochem J* 391:269-276.
- Freitas, D. B.; Reis, M.; Lima-Bittencourt, C. I.; Costa, P. S.; Assis, P. S.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A. M. A. (2008a) Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. *BMC Res Notes* 1:92.

- Freitas, D. B.; Lima-Bittencourt, C. I.; Reis, M. P.; Costa, P. S.; Assis, P. S.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A. M. A. (2008b) Molecular characterization of early colonizer bacteria from wastes in a steel plant. *Lett Appl Microbiol* 47:241-249.
- Gaonkar, T.; Bhosle, S. (2013) Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. *Chemosphere* doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.036.
- Geis, A.; Singh, J.; Teuber, M. (1983) Potential of lactic *streptococci* to produce bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* 45:205-211.
- Geys, R.; Soetaert, W.; Van Bogaert, I. (2014) Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Curr Opin Biotechnol* 30:66-72.
- Golyshina, O. V.; Golyshin, P. N.; Timmis, K. N.; Ferrer, M. (2005) The 'pH optimum anomaly' of intracellular enzymes of *Ferroplasma acidiphilum*. *Environ Microbiol* 8:416-425.
- Habibi, M. H.; Vosooghian, H. (2005) Photocatalytic degradation of some organic sulfides as environmental pollutants using titanium dioxide suspension. *J Photochem Photobiol A: Chem* 174:45-52.
- Hantsis-Zacharov, E.; Halpern, M. (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol* 73 (22):7162-7168.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech* 39(2):235-251.
- Hider, R. C.; Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27(5):637-657.
- Jaeger, K. E.; Reetz, M. T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16:396-403.
- Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53(1):315-351.
- Johnson, D. B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 27(4):307-317.
- Johnson, D. B. (2001) Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. *Hydrometallurgy* 59:147-157.
- Johnson, D. B. The biogeochemistry of biomining. In *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective* Springer Netherlands, 2010, pp. 401-426.
- Johnson, D. B. (2014) Biomining - biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr Opin Biotechnol* 30:24-31.

- Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 13:345-351.
- Kumar, P.; Patel, S. K.; Lee, J. K.; Kalia, V. C. (2013) Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 31(8):1543-1561.
- Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (ed) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Willey & Sons, Chinchester, 1991, pp 115-175.
- Lecso-Bornet, M.; Bergogne Berezin, E. (1997) Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three β -lactams and five β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother* 40(5):717-720.
- Lee, C. Y.; Ho, K. L.; Lee, D. J.; Su, A.; Chang, J. S. (2012) Electricity harvest from nitrate/sulfide containing wastewaters using microbial fuel cell with autotrophic denitrifier, *Pseudomonas* sp. C27. *Int J Hydrogen Energ* 37:15827-15832.
- Livermore, D. M. (1995) β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8(4):557-584.
- Lorenz, P.; Eck, J. (2005) Metagenomics and industrial applications. *Nature Rev Microbiol* 3:510-516.
- Mahmood, Q.; Zheng, P.; Hu, B.; Jilani, G.; Azim, M. R.; Wu D, Liu, D. (2009) Isolation and characterization of *Pseudomonas stutzeri* QZ1 from an anoxic sulfide-oxidizing bioreactor. *Anaerobe* 15:108-115.
- Marahiel, M. A.; Nakano, M. M.; Zuber, P. (1993) Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol Microbiol* 7(5):631-636.
- Mergeay, M.; Monchy, S.; Vallaey, T.; Auquier, V.; Benotmane, A.; Bertin, P.; Taghavi, S.; Dunn, J.; van der Lelie, D.; Wattiez, R. (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* 27:385-410.
- Miethke, M.; Marahiel, M. A. (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3):413-451.
- Mijnendonckx, K.; Provoost, A.; Ott, C. M.; Venkateswaran, K.; Mahillon, J.; Leys, N.; Van Houdt, R. (2013) Characterization of the survival ability of *Cupriavidus metallidurans* and *Ralstonia pickettii* from space-related environments. *Microb Ecol* 65(2):347-360.
- Miqueletto, P. B.; Andreote, F. D.; Dias, A. C. F.; Ferreira, J. C.; Dos Santos Neto, E. V.; Oliveira, V. M. (2011) Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil. *AMB Express* 1:1-16.
- Monteiro, L.V.; Xavier, R.P.; de Carvalho, E.R; Hitzman, M.W.; Johnson, C.A.; de Souza Filho, C.R.; Torresi, I. (2008) Spatial and temporal zoning of hydrothermal alteration and

- mineralization in the Sossego iron oxide–copper–gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil: Paragenesis and stable isotope constraints. *Miner Deposita* 43:129-159.
- Morel, M. A.; Ubalde, M. C.; Olivera-Bravo, S.; Callejas, C.; Gill, P. R.; Castro-Sowinski, S. (2009) Cellular and biochemical response to Cr (VI) in *Stenotrophomonas* sp. *FEMS Microbiol Lett* 291(2):162-168.
- Morikawa, M.; Daido, H.; Takao, T.; Murata, S.; Shimonishi, Y.; Imanaka, T. (1993) A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J Bacteriol* 175:6459-6466.
- Morozkina, E. V.; Slutsкая, E. S.; Fedorova, T. V.; Tugay, T. I.; Golubeva, L. I.; Koroleva, O. V. (2010) Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Appl Biochem Microbiol* 46(1):1-14.
- Mulligan, C. N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 133(2):183-198.
- Muyzer, G.; Stams, A. J. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6(6):441-454.
- Nancucheo, I.; Johnson, D. B. (2011) Significance of microbial communities and interactions in safeguarding reactive mine tailings by ecological engineering. *Appl Environ Microbiol* 77(23):8201-8208.
- Nangia, Y.; Wangoo, N.; Goyal, N.; Shekhawat, G.; Suri, C. R. (2009) A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microb Cell Fact* doi:10.1186/1475-2859-8-39.
- Neilands, J. B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270(45):26723-26726.
- Nicholson, W. L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H. J.; Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol R* 64 (3):548-572.
- Nigam, P. S. (2013) Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* 3(3):597-611.
- Ongena, M.; Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115-125.
- Osorio, H.; Martínez, V.; Nieto, P. A.; Holmes, D. S.; Quatrini, R. (2008) Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *BMC Microbiol* 8(1):203.
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* 3(3):597-611.

- Pacwa-Płociniczak, M.; Płaza, G.A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S.S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci* 12:633-654.
- Pages, D.; Rose, J.; Conrod, S.; Cuine, S.; Carrier, P.; Heulin, T.; Achouak, W. (2008) Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS ONE* 3(2):e1539.
- Paulino, L. C; Bergamo, R. F, de Mello, M. P.; Garcia Jr, O.; Manfio, G. P.; Ottoboni, L. M. (2001) Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil. *A Van Leeuw J Microb* 80(1):65-75.
- Pérez-Miranda, S, Cabirol N, George-Téllez, R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Meth* 70(1):127-131.
- Poole, K. (2004) Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 61:2200-2223.
- Rafii, F.; Williams, A. J.; Park, M.; Sims L. M.; Heinze, T. M.; Cerniglia, C. E.; Sutherland, J. B. (2009) Isolation of bacterial strains from bovine fecal microflora capable of degradation of ceftiofur. *Vet Microbiol* 139(1-2): 89-96.
- Rajkumar, M.; Ae, N.; Prasad, M.N.V.; Freitas, H. (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* 28:142-149.
- Ravel, J.; Fraser, C. M. (2005) Genomic at genus scale. *Trends Microbiol* 13(3): 95-97.
- Rawlings, D. E.; Johnson, D. B. (2007) The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153:315-324.
- Reith, F.; Etschmann, B.; Grosse, C.; Moors, H.; Benotmane, M. A.; Monsieurs, P.; Grass, G.; Doonan, C.; Vogt, S.; Lai ,B.; Martinez-Criado, G.; George, G. N.; Nies, D. H.; Mergeay, M.; Pring, A.; Southam, G.; Brugger, J. (2009) Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (42):17757-17762.
- Rodríguez, C.; Wachlin, A.; Altendorf, K.; García, F.; Lipski, A. (2007) Diversity and antimicrobial susceptibility of oxytetracycline-resistant isolates of *Stenotrophomonas* sp. and *Serratia* sp. associated with Costa Rican crops. *J Appl Microbiol* 103(6):2550-2560.
- Rothschild, L.J.; Mancinelli, R. L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409:1092-1101.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, S.; Demain, A. L. (2010) Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Org Process Res Dev* 15(1):224-230.
- Sansinenea, E.; Ortiz, A. (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 33(8):1523-1538.
- Schallmeyer, M.; Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50(1):1-17.

- Schertzer, J. W.; Boulette, M. L.; Whiteley, M. (2009) More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol* 17(5):189-195.
- Schippers, A.; Breuker, A.; Blazejak, A.; Bosecker, K.; Kock, D.; Wright, T. L. (2010) The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe (II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 104:342-350.
- Schippers, A.; Hedrich, S.; Vasters, J.; Drobe, M.; Sand, W.; Willscher, S. (2013) Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* doi:10.1007/10_2013_216.
- Schwyn, B.; Neilands, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160(1):47-56.
- Selenska-Pobell, S.; Flemming, K.; Tzvetkova, T.; Raff, J.; Schnorpfeil, M.; Geißler, A. Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interaction with heavy metals. In *Uranium in the Aquatic Environment* (eds Merkel BJ, Planer-Friedrich B, Wolkersdorfer C). Springer, Berlin, Germany, 2002, pp. 455-464.
- Singh, A.; Van, Hamme, J. D.; Ward, O. P. (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotech Adv* 25(1):99-121.
- Singh, A. K.; Cameotra, S. S. (2013) Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res* doi:10.1007/s11356-013-1752-4.
- Sørensen, S. P. L. (1909) Enzymstudien: II. Mitteilung. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. *Biochem Z* 21:131-304.
- Sprynskyy, M.; Buszewski, B.; Terzyk, A. P.; Namieśnik, J. (2006) Study of the selection mechanism of heavy metal (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+}) adsorption on clinoptilolite. *J Colloid Interface Sci* 304(1):21-28.
- Stülke, J.; Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54(1):849-880.
- Taylor, M. P.; Van Zyl, L.; Tuffin, M.; Cowan, DA. (2012) Extremophiles and biotechnology: How far have we come? Ch. 1. In *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*. Anitori, R. P. (ed). Caister Academic Press, Norwich, pp 1-23.
- Uratani, J. M.; Kumaraswamy, R.; Rodríguez, J. (2014) A systematic strain selection approach for halotolerant and halophilic bioprocess development: a review. *Extremophiles* 18(4): 629-639.
- Van Den Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6:213-218.
- Wandersman, C.; Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to

- hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58:611-647.
- Wang, S.; Mulligan, C. N. (2009) Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process Biochem* 44(3):296-301.
- Willetts, A. (1997) Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Trends Biotechnol* 17:55-62.
- Williams, J. D. (1999) Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 12:3-7.
- Williams, R. P. (1973) Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol* 25(3):396-402.
- Winkelmann, G. (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* 30 (4):691-696.
- Yamamoto, S.; Harayama, S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61 (3):1104-1109.
- Yilmaz, E. I. (2003) Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res Microbiol* 154(6):409-415.
- Youssef, N. H.; Duncan, K. E.; Nagle, D. P.; Savage, K. N.; Knapp, R. M.; McInerney, M. J. (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods* 56(3):339-347.

CAPÍTULO 3: OBTENÇÃO DE CONSÓRCIOS DE MICRO-ORGANISMOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE SEDIMENTOS AQUOSOS DE MINA DE COBRE

3.1 INTRODUÇÃO

O emprego de micro-organismos quimiolitotróficos capazes de oxidar ferro e enxofre a partir de minerais em processos de biolixiviação possibilita a solubilização dos sulfetos metálicos e a recuperação de metais, como o cobre, o urânio e o ouro (Rawlings, 2005, Watling *et al.*, 2010). Com relação ao cobre, a maioria dos processos de mineração (piro-hidrometalúrgicos ou biolixiviação) para a sua obtenção ocorrem a partir de sulfetos secundários de cobre, como calcocita, bornita e covelita. Contudo, os maiores reservatórios de cobre estão presentes sob a forma do sulfeto primário, calcopirita, que é o sulfeto de cobre mais refratário aos processos de oxidação (Third *et al.*, 2000; Bevilaqua *et al.*, 2004). Trabalhos focados no estudo da biolixiviação mostraram que a utilização de consórcios de micro-organismos acidofílicos é frequentemente mais eficiente na oxidação de sulfetos metálicos (Norris *et al.*, 1996; Johnson, 1998; Xia *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Grande parte dos consórcios empregados em biolixiviação é predominada por bactérias acidofílicas, autotróficas oxidantes de ferro ou enxofre e os principais micro-organismos pertencem aos gêneros *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* e *Sulfobacillus* (He *et al.*, 2010, Rawlings & Johnson, 2007; Bonnefoy & Holmes, 2011).

A utilização de um consórcio composto por *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *A. thiooxidans* para a biolixiviação da calcopirita resultou em maior produção de ácido sulfúrico por *A. thiooxidans* e, conseqüentemente, em menor formação da jarosita, composto que inibe o processo (Qiu *et al.*, 2005). Okibe & Johnson (2004) utilizaram culturas puras ou mistas de acidófilos termofílicos moderados para comparar as taxas de dissolução da pirita e a cultura composta por *Leptospirillum* MT6, *A. caldus* e *Ferroplasma* MT17 foi a que apresentou maior taxa de dissolução. Um fator fundamental para a eficiência deste consórcio foi a interação de mutualismo entre esses micro-organismos, envolvendo a transferência do carbono orgânico e inorgânico, bem como as transformações do ferro e enxofre. Durante a oxidação da calcopirita enxofre elementar é produzido na superfície do sulfeto, podendo ocasionar a passivação do mineral e,

consequentemente, dificultando a sua dissolução (Hackl *et al.*, 1995). Deste modo, para acelerar a biolixiviação da calcopirita, além de micro-organismos capazes de oxidar ferro, é fundamental a participação de micro-organismos oxidantes de enxofre, tais como *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* (Rohwerder *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2013).

Os avanços da biologia molecular permitiram caracterizar, em conjunto com as técnicas baseadas em cultivo, a composição das populações de micro-organismos em ambientes de biolixiviação. Demergasso *et al.* (2005) analisaram por amplificação do rDNA 16S e eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGGE) a variação temporal da comunidade de micro-organismos presente em uma pilha contendo sulfeto de cobre de baixo teor. No início da biolixiviação predominaram *A. ferrooxidans* e *Sulfurisphaera*; entre 255 a 338 dias predominaram, respectivamente, *Leptospirillum* e *Ferroplasma*; por último, entre 598 a 749 dias predominou *Sulfobacillus*, sendo *Ferroplasma* a única arqueia detectada. Para aperfeiçoar a biolixiviação em pilhas os autores sugerem a utilização de culturas mistas, compostas por micro-organismos mesófilos e termófilos moderados. Remonsellez *et al.* (2009) utilizaram DGGE e PCR em tempo real para avaliar de forma quantitativa a dinâmica populacional de micro-organismos ativos em pilha de biolixiviação, com a predominância de *A. ferrooxidans*, *L. ferriphilum* e *F. acidiphilum*. Além de descrever a sucessão dos micro-organismos na pilha essa análise atribuiu aos fatores físico-químicos (como o pH e concentração de íons ferrosos e férricos), os principais fatores moduladores da dinâmica populacional.

Existem poucos estudos correlacionados ao isolamento e utilização de consórcios naturais para a biolixiviação (Rawlings & Johnson, 2007; Marhual *et al.*, 2008). Apesar de muitos consórcios naturais serem capazes de oxidar ferro em valores de pH e temperatura distintos, existe a possibilidade de que a composição mineralógica das amostras, como alto teor de metais, possa interferir de forma negativa na atividade dessas bactérias (Lavalle *et al.*, 2005; Watling *et al.*, 2014). Para a formação de consórcios pode ser selecionada uma vasta gama de micro-organismos, de diferentes localizações e, por isso, existem muitas possibilidades ainda não exploradas dos efeitos sinérgicos da interação desses consórcios (Brune & Bayer, 2012). No Brasil, até o momento, a biodiversidade de micro-organismos presentes em ambientes de mina foi pouco explorada. Para tanto, a partir de amostras de drenagem de mina de cobre consórcios de micro-organismos oxidantes de ferro foram obtidos, testados quanto à capacidade de biolixiviação da calcopirita e algumas bactérias foram identificadas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas em agosto de 2009 na Mina do Sossego no depósito de Sossego. Neste depósito foram coletadas as amostras de drenagem: SO5, SO6 e SO7. As amostras foram armazenadas a 4 °C até o momento da obtenção dos consórcios.

3.2.2 Obtenção de consórcios

Para a obtenção dos consórcios, as amostras ambientais foram inoculadas em meios seletivos para micro-organismos que oxidam ferro. Para isso, 10 g da amostra ambiental foram colocadas em 90 mL de meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1972) (g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,4), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,4), $(NH_4)_2SO_4$ (0,4), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (33,4), pH 1,8. As culturas foram incubadas em agitador a 200 rpm, 35°C, por um período que variou de 20 a 45 dias, dependendo do grau de atividade dos consórcios. Durante este tempo, o pH foi monitorado. A partir destas culturas iniciais, novos subcultivos foram feitos utilizando 10% de inóculo e 90 mL de meio T&K. Essa etapa foi repetida por pelo menos dez subcultivos (Romo *et al.*, 2013).

3.2.3 Teste da capacidade de biolixiviação dos consórcios

Uma vez obtidos os consórcios de micro-organismos capazes de oxidar ferro a partir das amostras ambientais foi testada a capacidade dos consórcios para a biolixiviação de minérios sulfetados de cobre (calcopirita). Para este fim, 10% das culturas de cada consórcio foram inoculadas em 200 mL de meio T&K contendo 2,5% de calcopirita ($CuFeS_2$) e 0,4 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. A calcopirita foi fornecida pela Companhia Vale e apresenta 23% de Cu, 27,3% de Fe, 22,9% de S, 3,2% de Si e 7,0% de Ca. O mineral foi macerado em um moinho de bolas para a obtenção de grânulos < 0,2 mm e, posteriormente, esterilizado.

Os ensaios foram conduzidos sob agitação em frascos agitados de 500 mL. Como controle, foi utilizado meio T&K e 2,5% de calcopirita (controle abiótico) ou meio T&K, 2,5% de calcopirita e 10% da cultura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR (controle biótico). As amostras foram incubadas em agitador, a 200 rpm, 35°C por 25 dias. As perdas por evaporação foram repostas com água destilada autoclavada. Após este período, foi realizada a quantificação do teor de cobre presente nas amostras por ICP-AES (de Andrade & de Abreu, 2006).

3.2.4 Identificação dos micro-organismos presentes nos consórcios

Os consórcios de micro-organismos oxidantes de ferro foram cultivados em meio T&K, 35°C, 200 rpm. As células foram coletadas por filtração em membrana Millipore (0,45 µm) e obtido um concentrado de células e precipitado. Em seguida, foi realizado o isolamento do DNA. Para isso, as células e o precipitado foram ressuspensos em dois mL de TE (Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 8,0). As amostras foram lavadas com 700 µL de tampão de extração TAS (TE 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 150 mM) e, posteriormente, ressuspensas em 500 µL de tampão TAS, 15 µL de proteinase K (100 mg/mL) e 50 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10%. As amostras foram incubadas a 50 °C por 1 h e após, foi realizada a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v). A precipitação foi realizada com 1/10 de NaCl 5 M e dois volumes de etanol absoluto. As amostras foram incubadas a -70 °C por 12 h e, depois, foram lavadas com etanol 70%. O DNA foi dissolvido em água estéril e, em seguida, foi purificado e concentrado utilizando o kit *DNA Clean & Concentration* (Zymo Research). Foram testados os seguintes *primers* (Tabela 3.1): 341F-GC e 907R (Muyzer *et al.*, 1998) para identificar bactérias presentes no consórcio e ARC344F-GC e 915R (Casamayor *et al.*, 2000) para identificar arqueias presentes no consórcio. O grampo CG adicionado à extremidade 5' de cada *primer* direto possui 40 pb em 341F-GC e 39 pb em ARC344F-GC. As reações de amplificação (volume final de 50 µL) foram compostas por: 0,5 a 10 ng de DNA, 0,2 µM dos *primers*, 200 µM de cada dNTP (Fermentas), 3,75 mM de MgCl₂, tampão Taq 1× concentrado (Fermentas) e 5 U de Taq polimerase (Fermentas). Foram testadas as condições de amplificação descritas na Tabela 3.1, sendo que as melhores condições obtidas para bactéria foram descritas em b (Tabela 3.1). Com relação à arqueias, não houve amplificação. Os *primers* 341F e 907R

(Tabela 3.1) foram utilizados para a reamplificação das bandas relativas às bactérias. As amplificações foram feitas em duplicata em um termociclador (MJ Research, modelo PTC-100). Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1,5%, com fragmentos esperados em torno de 600 pb para bactérias.

Tabela 3.1. *Primers* e condições utilizadas para a padronização da amplificação dos consórcios SO5, SO6 e SO7.

<i>Primers</i>	907R - 5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3' 341F-GC - 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' 341F - 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' 915R - 5' GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3' ARC344F-GC - 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA 3'
<i>Condições</i>	a) Desnaturação inicial 94 °C 4 min; 30 ciclos de 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min; extensão final de 72 °C 10 min b) Desnaturação inicial 94 °C 5 min; 10 ciclos de 94 °C 1 min, 58 °C 30 s (com a diminuição de 0,5 °C por ciclo), 72 °C 2 min; 25 ciclos de 94 °C 1 min, 53 °C 30 s, 72 °C 2 min; extensão final de 72 °C 2 min c) Somente para ARC344F-GC e 915R: Desnaturação inicial 94 °C 5 min; 10 ciclos de 94 °C 45 s, 68,4 °C 45 s (com a diminuição de 1 °C por ciclo), 72 °C 45 s; 30 ciclos de 94 °C 1,5 min, 58,4 °C 1,5 min, 72 °C 1,5 min; extensão final de 72 °C 5 min d) Somente para 341F-GC e 907R Desnaturação inicial 94 °C 5 min; 35 ciclos de 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min; 10 ciclos de 60 °C 30 s, 72 °C 1 min

Uma vez obtidos os produtos de amplificação a partir do *primer* 341F-GC e 907R a qualidade do produto verificada em gel de agarose e, após, as amostras foram submetidas a eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGGE). A análise por DGGE foi realizada no sistema INGENYphorU (Ingeny, Goes, The Netherlands) e 25 µL do produto de amplificação foi aplicado em gel de acrilamida (6%) vertical com gradiente desnaturante de uréia-formamida de 45-65% a 60 °C. A eletroforese foi realizada por 15 h a 100 V em tampão TAE 0,5 × (20 mM de Tris-acetato, 10 mM de acetato de sódio, 0,5 mM de Na₂EDTA, pH 7,4). O gel foi corado com

SYBR Gold diluído 1:10000 em tampão TAE 0,5 ×, mantido por 40 min no escuro e, posteriormente, observado em luz ultravioleta. As principais bandas obtidas nas diferentes amostras foram selecionadas e excisadas do gel e, posteriormente, cada uma foi colocada em microtubo estéril contendo 25 µL de água deionizada esterilizada. As amostras foram armazenadas a 4 °C, por 24 horas para permitir a eluição do DNA retido na matriz do gel. As amostras contendo o DNA eluído foram armazenadas a -20 °C. Um µL das amostras nas diluições 1:10, 1:30 e 1:50 foi utilizado na PCR para a reamplificação da banda com o auxílio dos *primers* 341F-GC e 905R na condição d (Tabela 3.1). Então, foi realizado novamente o DGGE a fim de confirmar que a banda excisada não apresentava bandas inespecíficas. Em seguida, as bandas de interesse foram excisadas e eluídas em 25 µL de água deionizada esterilizada e um µL foi utilizado para a reamplificação da banda, porém, com os *primers* 341F e 907R (Tabela 3.1). Os produtos da PCR foram sequenciados.

Para o sequenciamento, o rDNA 16S foi amplificado com os *primers* 10f (5'-TTTAATGAAGTAGTTGCAATCTGG-3') e 1100r (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'). A purificação dos produtos da PCR foi realizada com o auxílio do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado a partir de 150-200 ng de DNA, com o kit *DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), conforme Miqueletto *et al.* (2011). As sequências foram submetidas a comparação com as sequências disponíveis no banco de dados do *Genbank* (Benson *et al.*, 2006) e *Ribosomal Database Project II* (Cole *et al.*, 2005). Uma vez identificadas, as sequências foram depositadas no banco de dados do *GenBank*, sob os seguintes números de acesso: KM486574 a KM486577.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Obtenção dos consórcios

A partir das amostras SO5, SO6 e SO7 foram feitos meios de cultivo para selecionar micro-organismos com potencial para oxidar ferro. Inicialmente, foi medido o pH das amostras ambientais, o qual foi em torno de 7,0 e ao longo do processo de oxidação de Fe²⁺ houve uma

redução no valor do pH, que ficou em torno de 1,3 - 1,6 (Figura 3.1). Essa redução no valor do pH se deve a produção de ácido em consequência da oxidação do íon ferroso à íon férrico pelos micro-organismos oxidantes do ferro (Kumar *et al.*, 2007).

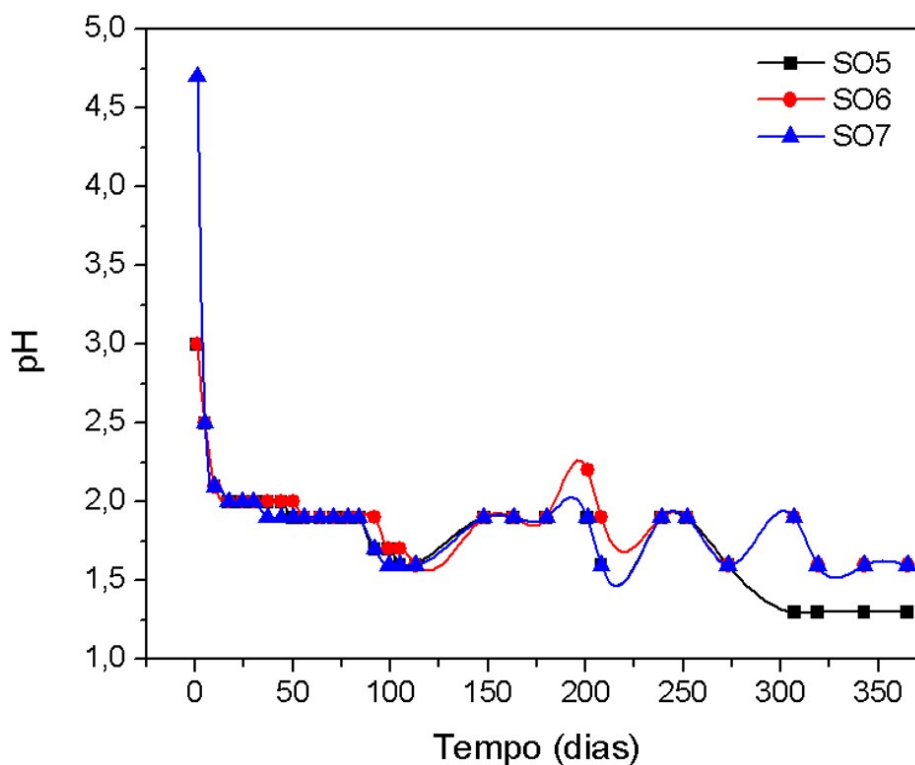


Figura 3.1. Valores de pH dos consórcios obtidos das amostras ambientais SO5, SO6 e SO7 ao longo do tempo de cultivo na presença de ferro.

Em relação ao tempo de incubação dos consórcios em meio contendo ferro até novos subcultivos, observou-se uma variação de 20 a 45 dias. Essas diferenças de tempo de oxidação são corroboradas pelos baixos valores de pH (Figura 3.1), variação da turbidez e/ou coloração da cultura (Figura 3.2). A relação crescente do grau da atividade dos consórcios das culturas mantidas na presença de ferro foi, respectivamente, de $SO6 \approx SO7 < SO5$.

Foi demonstrado por Norris *et al.* (1990) que populações mistas de bactérias que oxidam ferro e enxofre, como *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, estão presentes em sistemas de lixiviação natural a temperatura ambiente e são as principais responsáveis pela solubilização de minerais sulfetados. Na Figura 3.2, pode-se notar que houve variação na tonalidade dos meios para os consórcios de micro-organismos oxidantes de ferro quando comparados com o momento

inicial de cultivo (Figura 3.2a) e após sucessivos subcultivos (Figura 3.2b), resultantes da oxidação de ferro pelos micro-organismos.

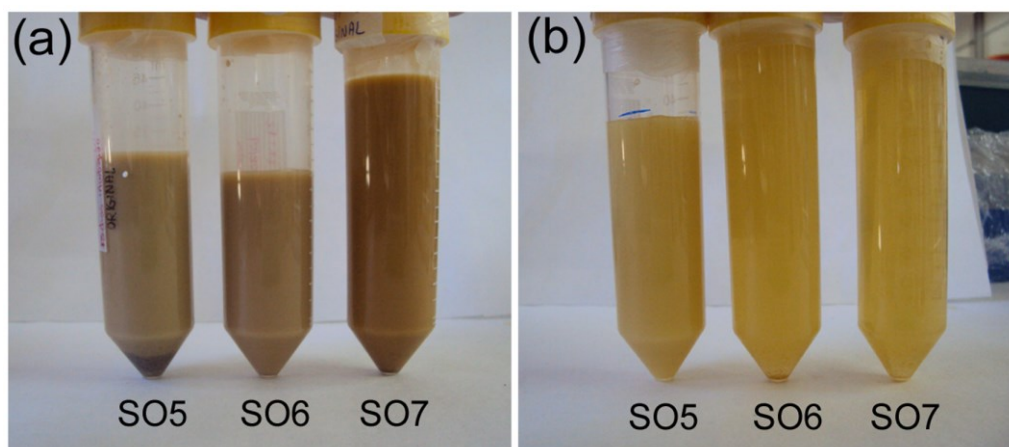


Figura 3.2. Amostras dos consórcios SO5, SO6 e SO7 para a seleção dos micro-organismos oxidantes de ferro inicial (a) e após sucessivos subcultivos (b).

Segundo Spencer (2001), o pH do meio no qual a cultura bacteriana é cultivada pode influenciar a presença de bactérias dominantes e afetar as reações de oxidação. Dessa forma, com o aumento do tempo de cultivo dos consórcios obtidos das amostras SO5, SO6 e SO7 houve a redução do pH e isto, provavelmente, favoreceu a seleção dos micro-organismos associados à oxidação do ferro, sendo que alguns consórcios mostraram-se mais ativos que outros. Além disso, foram observadas pequenas oscilações nos valores de pH das culturas mantidas na presença de ferro. Segundo Daoud & Karamanev (2006), o aumento do valor de pH pode ser em decorrência do processo oxidativo de Fe^{2+} , no qual ocorre o consumo de íons hidrogênio e, assim, o pH do meio aumenta. Entretanto, segundo os mesmos autores, esse aumento de pH é contrabalançado pela hidrólise do Fe^{3+} , que apresenta menor solubilidade e precipita como hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

Algumas características fazem com que um micro-organismo seja atuante na biolixiviação, como a capacidade de atuar em uma faixa expandida de temperatura (30 a 70 °C), de pH ácido e possuir elevada afinidade por Fe^{2+} (Suzuki *et al.*, 2001). Após inúmeros subcultivos, os consórcios de micro-organismos atingiram o pH ideal para a oxidação de ferro (1,3 ~ 1,6) e incluindo as alterações de coloração e turbidez dos meios de cultura, sugerindo que os micro-organismos quimiolitotróficos existentes estejam ativos. A fim de confirmar esta hipótese, esses

consórcios foram analisados quanto à capacidade de oxidação de sulfeto de cobre. Para a identificação dos principais micro-organismos presentes no consórcio subcultivos foram feitos em maiores volumes, com o intuito de obter maior densidade de células de micro-organismos para análise por DGGE.

3.3.2 Teste da capacidade de biolixiviação dos consórcios

A capacidade dos consórcios de micro-organismos oxidantes de ferro obtidos das amostras SO5, SO6, SO7 oxidarem a calcopirita (CuFeS_2) foi avaliada e *A. ferrooxidans* LR foi usada como controle biótico (Figura 3.3). O controle abiótico (meio T&K e calcopirita) foi utilizado porque o T&K sem inóculo em baixos valores de pH pode ocasionar oxidação da calcopirita (Lundgren & Silver, 1980).

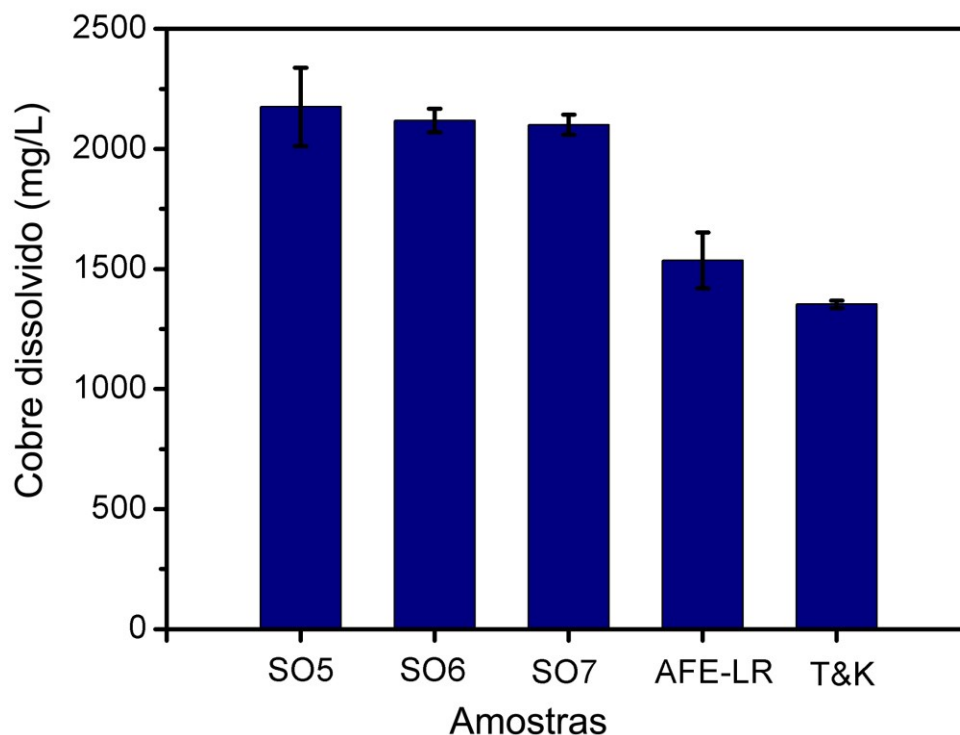


Figura 3.3. Teste da capacidade de oxidação da calcopirita pelos consórcios obtidos das amostras SO5, SO6, SO7, AFE-LR (*A. ferrooxidans* LR, controle biótico) e T&K (controle abiótico). Teor de cobre (mg/L) dissolvido em cada uma das amostras.

De acordo com a Figura 3.3, percebe-se que uma maior concentração de cobre foi liberada no meio pelos consórcios obtidos das amostras SO5, SO6 e SO7 do que em relação à *A. ferrooxidans* LR. A análise de variância (ANOVA) a 95% de significância levou em consideração os dados da concentração de cobre presente no meio das amostras após 25 dias de biolixiviação da calcopirita. Esta análise mostrou que as concentrações de cobre liberadas pelos consórcios SO5, SO6 e SO7 são estatisticamente diferentes da *A. ferrooxidans* LR e T&K, com $p < 5\%$ (p teste 0,001) (Figura 3.4). Estes resultados corroboram com a literatura existente, as quais mostram que consórcios de micro-organismos isolados de amostra de ambiente de minas podem apresentar potencial de utilização para a biolixiviação de sulfetos metálicos (Patel *et al.*, 2012).

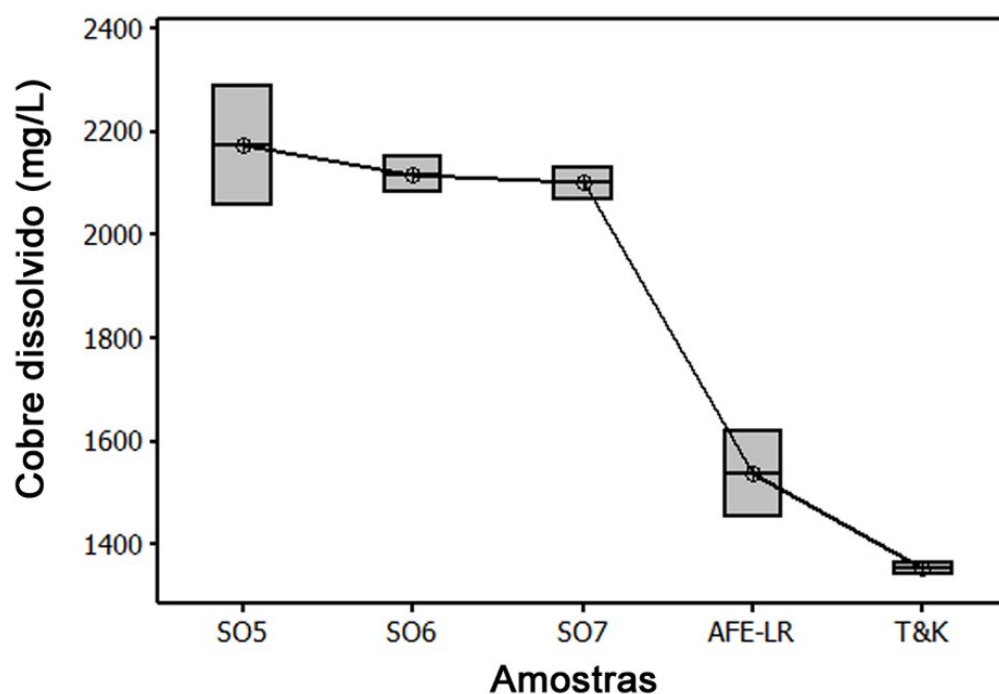


Figura 3.4. Análise de variância das médias da concentração de cobre dissolvido para as amostras SO5, SO6, SO7, AFE-LR (*A. ferrooxidans* LR, controle biótico) e T&K (controle abiótico).

Outro fator que sugere a maior eficiência dos consórcios SO5, SO6 e SO7 para a biolixiviação da calcopirita foi a coloração do meio de cultivo, que em 25 dias apresentaram tonalidade verde-azulada e foram diferentes quando comparada à coloração do meio com *A. ferrooxidans* LR, mais acinzentada (Figura 3.5). A coloração verde-azulada dos meios pode ser uma indicação da maior concentração de cobre, corroborando as análises de variância.

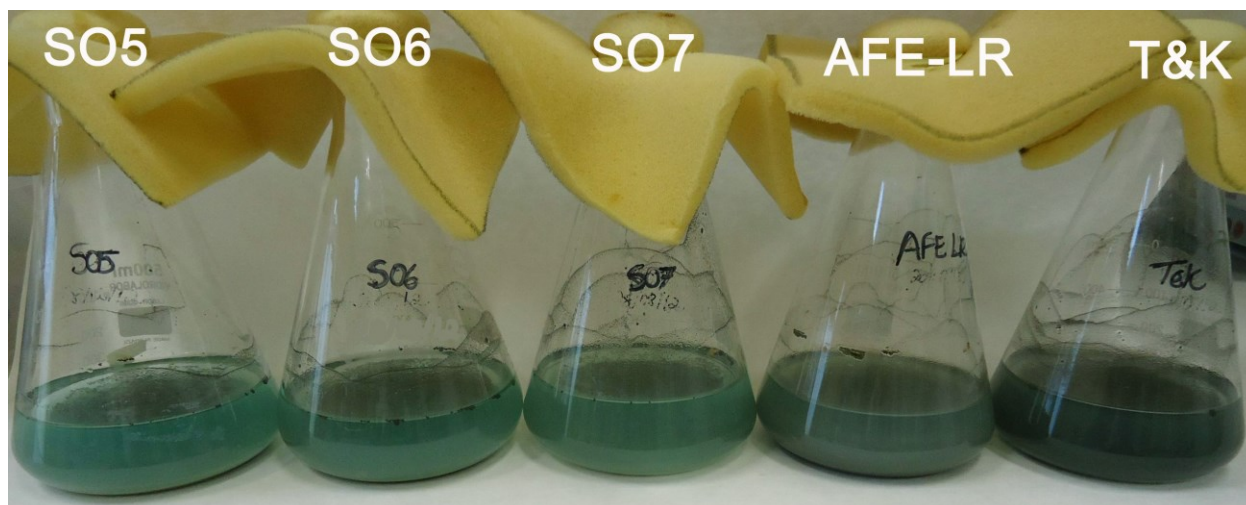


Figura 3.5. Teste da capacidade de biolixiviação da calcopirita pelos consórcios obtidos a partir das amostras SO5, SO6 e SO7, *A. ferrooxidans* LR e meio T&K. Observam-se diferentes tonalidades de verde-azulado nos consórcios e coloração acinzentada em *A. ferrooxidans* LR.

Segundo Petersen e Dixon (2006), os micro-organismos facilitam a oxidação dos íons ferrosos em solução, que por sua vez reagem com os sulfetos minerais e, de forma similar, as espécies de enxofre são oxidadas. Os consórcios de micro-organismos obtidos das amostras SO5, SO6 e SO7 foram capazes de promover a oxidação da calcopirita de forma mais eficaz que *A. ferrooxidans* LR. O consórcio SO5, por exemplo, apresentou uma taxa de dissolução de cobre no meio em torno de 38%. Essa taxa é 45% maior que a observada para *A. ferrooxidans* LR, cuja taxa de dissolução foi em torno de 26%. Estes resultados sugerem que a utilização dos consórcios para a biolixiviação da calcopirita é promissora, uma vez que não foi realizado qualquer tipo de pré-adaptação destes consórcios ao sulfeto metálico.

3.3.3 Identificação dos micro-organismos presentes nos consórcios isolados

Visto que os consórcios obtidos foram mais eficientes na biolixiviação da calcopirita é interessante conhecer quais são os principais micro-organismos presentes em cada consórcio. Para isso, foi feito o isolamento do DNA de cada consórcio e, posteriormente, foram realizados testes para amplificação do rDNA 16S por PCR. Foram utilizados *primers* específicos para a amplificação de bactérias (341F-GC e 907R) e arqueias (ARC344-GC e ARC915). Foram

testadas também diversas condições de amplificação. Nenhuma amplificação para arqueias foi observada para consórcios. Cinco microlitros de cada produto de amplificação obtido com os *primers* 341F-GC e 907R foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 3.6).

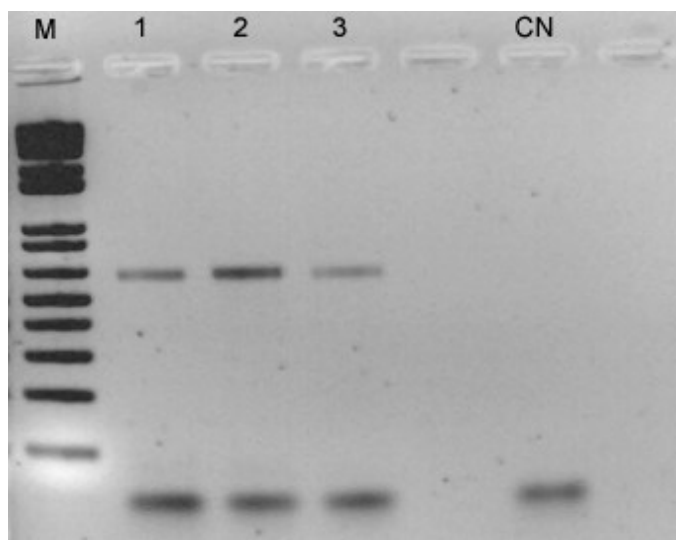


Figura 3.6. Exemplo de *fingerprinting* obtido por eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação do rDNA 16S para a detecção de bactérias presentes nos consórcios obtidos a partir das amostras SO5, SO6 e SO7. M (marcador – 1 Kb *plus*, Invitrogen); amostras 1 a 3 (produto de amplificação das amostras SO5, SO6 e SO7, respectivamente); CN (controle negativo).

Uma vez obtidos os produtos da PCR em boa concentração e qualidade foi realizado o DGGE. O perfil de *fingerprinting* gerado pelo DGGE para os consórcios SO5, SO6 e SO7 foi similar (Figura 3.7). Os fragmentos do rDNA 16S amplificados dos consórcios possivelmente apresentaram a mesma mobilidade eletroforética, já que as regiões analisadas dos três consórcios foram semelhantes. Foram excisadas do gel as quatro bandas mais evidentes. Essas bandas estiveram presentes nos três consórcios e são indicadas pelas setas vermelhas na Figura 3.7.

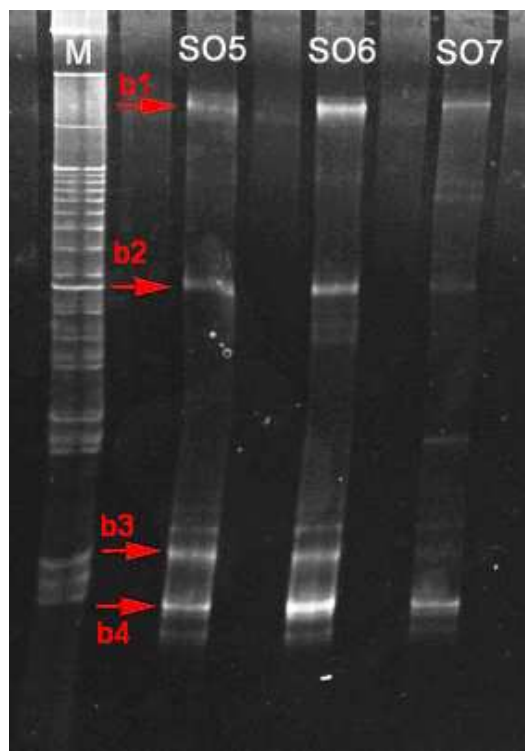


Figura 3.7. Exemplo de *fingerprinting* obtido por DGGE das amostras dos consórcios obtidos das amostras SO5, SO6, SO7. M (marcador 100 pb, Invitrogen); Bandas identificadas b1, b2, b3 e b4, respectivamente, bandas 1, 2, 3 e 4.

A fim de confirmar a pureza das bandas excisadas o DNA foi eluído, diluído em concentrações 1:10, 1:30, 1:50 e reamplificado. Os produtos da amplificação são mostrados na Figura 3.8.

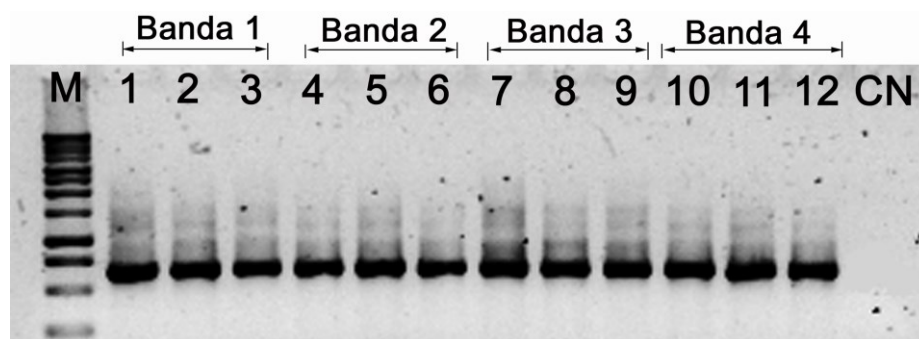


Figura 3.8. Exemplo de *fingerprinting* obtido por eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação das bandas excisadas e amplificadas com o *primer* 341F e 907R em diferentes diluições. M (marcador 1 Kb, Invitrogen); Amostras 1, 2 e 3 (banda excisada 1 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); amostras 4, 5 e 6 (banda excisada 2 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); amostras 7, 8 e 9 (banda excisada 3 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); amostras 10, 11 e 12 (banda excisada 4 diluição 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente); CN (controle negativo).

Após a obtenção dos produtos de amplificação foi realizado novamente o DGGE. Pela Figura 3.9, nota-se que para cada banda excisada anteriormente este DGGE apresentou uma banda evidente indicada por setas vermelhas. Assim, essas bandas foram excisadas, eluídas, amplificadas por PCR com o auxílio dos *primers* 341F e 907R e sequenciadas. A análise das sequências obtidas das quatro bandas excisadas possibilitou identificar quatro micro-organismos nos consórcios: *Bacillus* sp., *Delftia* sp., *Phenylobacterium* sp., *Methylobarium* sp., bandas 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Tabela 3.2).

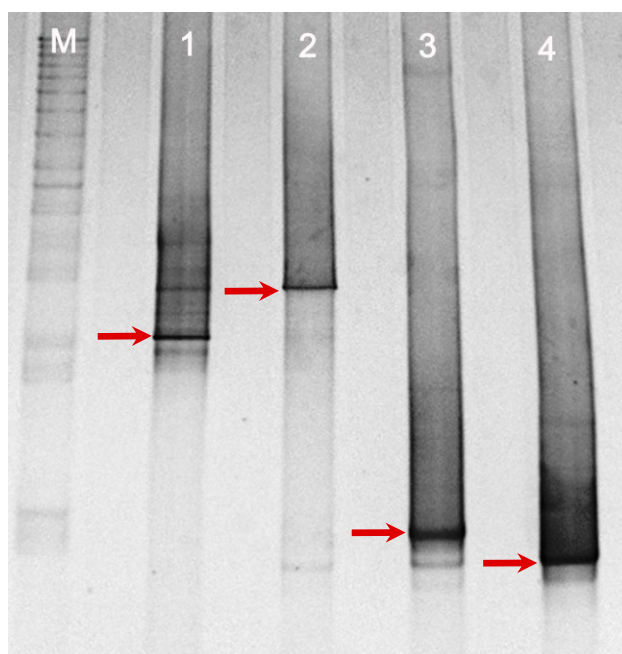


Figura 3.9. Exemplo de *fingerprinting* obtido durante a segunda DGGE. M (marcador 100 pb, Invitrogen); Amostras 1- 4 (bandas excisadas 1 a 4, respectivamente).

Tabela 3.2. Relação das bandas excisadas, bactérias identificadas e a porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada.

Banda	Número de acesso	Classificação RDP	Classificação NCBI (identidade)	% GC da região amplificada
b1	KM486574	<i>Bacillus</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp. (100%)	12,3
b2	KM486575	<i>Delftia</i> (99%)	<i>Delftia</i> sp. (100%)	15,8
b3	KM486576	<i>Phenylobacterium</i> (100%)	<i>Phenylobacterium</i> sp. (99%)	16,8
b4	KM486577	<i>Methylobacterium</i> (100%)	<i>Methylobarium</i> sp. (100%)	18,1

O perfil das bandas identificadas mostrado na Figura 3.7 foi condizente com o gradiente do agente desnaturante e a porcentagem das bases nucleotídicas da região amplificada (Tabela 3.2). As amostras com menor conteúdo GC permaneceram na região superior do gel e aquelas com maior conteúdo GC migraram mais até atingirem a região inferior do gel. Assim, a partir da banda b1, de menor peso molecular, para a banda b4 observou-se um aumento do conteúdo GC da bactéria identificada, os quais correspondem a seguinte relação: $12,3 < 15,8 < 16,8 < 18,1\%$ (Tabela 3.2). Esses valores corroboram com os valores do conteúdo GC do genoma de *Bacillus* sp. (31 a 43%; Ivanova *et al.*, 1999), *Delftia* sp. (65,3 a 66,2 %; Jorgensen *et al.*, 2009; Shigematsu *et al.*, 2003), *Phenylobacterium* sp. (67,3 a 68,4%; Aslam *et al.*, 2005) e *Methylobacterium* sp. (68,5 a 70,4% Vuilleumier *et al.*, 2009; Van Aken *et al.*, 2004), mostrando que a mobilidade diferencial das moléculas do DNA ocorreu proporcionalmente ao conteúdo GC (Figura 3.7).

Com relação às espécies identificadas, bactérias dos gêneros *Delftia* e *Bacillus* foram isoladas de solos com elevada contaminação por arsênio e apresentaram resistência ao arsenito (Cai *et al.*, 2009). Segundo os autores, essa resistência pode estar correlacionada à presença dos genes arsenito oxidase e de genes de transporte do arsenito, os quais podem ser adquiridos via transferência horizontal. Dave *et al.* (2012) isolaram *Delftia* sp. a partir de concentrados polimetálicos contendo Zn, Cu e Fe e a bactéria foi capaz de utilizar mais de 90% tiosulfato do meio de cultivo que, conseqüentemente, resultou um aumento do pH de 4,5 para 7,0. Uma vez que durante biolixiviação ocorre a queda do pH, a utilização de bactérias heterotróficas em consórcio com outras bactérias acidófilas pode ser uma alternativa para manter o pH constante.

Phenylobacterium spp. foram identificados em efluentes de indústria têxtil (Weon *et al.*, 2008) e na comunidade de rizosfera de plantas que crescem nas proximidades de rejeitos de mineração (Navarro-Noya *et al.*, 2010). Isto sugere que espécies de *Phenylobacterium* possam ser resistentes a metais e a compostos xenobióticos. Johnson *et al.* (2003) isolaram a partir de fontes geotermiais uma bactéria proximamente relacionada à *Methylobacterium*, no qual foi capaz de crescer tanto em meio contendo sulfato ferroso suplementado com carbono, como na presença de 1% de pirita (FeS_2) suplementada com extrato de levedura. Apesar deste isolado estar distantemente relacionado das demais bactérias acidófilas e oxidantes de ferro identificadas (*Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Alicyclobacillus*), os autores sugerem que *Methylobacterium* pode acelerar a dissolução oxidativa do sulfeto em processos que utilizam temperaturas

moderadamente termófilas (40 a 55°C).

As bactérias heterotróficas podem contribuir para a solubilização dos metais e por meio da produção de ácidos orgânicos (ácido oxálico, cítrico; Willscher & Bosecker, 2003) ou pela formação de complexos metálicos e quelatos (Bosecker, 1997). Os sideróforos, por exemplo, são moléculas quelantes de ferro (Neilands, 1995) e podem ser produzidos por muitas bactérias heterotróficas, inclusive por *Bacillus* sp. (Wani *et al.*, 2007), *Delftia* sp. (Morel *et al.*, 2011; Johnston *et al.*, 2013) e *Methylobacterium* sp. (Lacava *et al.*, 2008), representados respectivamente, pelas bandas 1, 2 e 4 identificadas. Assim, mediante a produção de sideróforos, a captação de ferro pode ser aumentada, o que pode favorecer principalmente os micro-organismos capazes de oxidar ferro.

Mesmo sob condições de crescimento desfavoráveis como elevado teor de sólidos dissolvidos e baixo pH um consórcio de bactérias heterotróficas composto por *Microbacterium* sp., *Promicromonospora* sp. e *Pseudomonas cedrina* foi capaz de mobilizar metais ($\text{Cr} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Fe} > \text{Pb}$) a partir de rejeitos de mina contendo sulfetos metálicos (Willscher *et al.*, 2007). Na biolixiviação, as bactérias autotróficas solubilizam os sulfetos metálicos e as bactérias heterotróficas degradam a matéria orgânica, aumentam a solubilidade dos íons metálicos pela excreção de ácido e pela formação de complexos com substâncias orgânicas (Schippers *et al.*, 2013). Portanto, a presença das bactérias heterotróficas nos consórcios para a biolixiviação pode ter efeito vantajoso e sinérgico sobre a solubilização e transporte dos metais.

Os consórcios foram obtidos a partir de meio seletivo ácido contendo sais inorgânicos e sulfato ferroso, por isso, esperava-se identificar micro-organismos quimiolitotróficos. No entanto, as espécies identificadas representaram as bandas mais evidentes e correspondem a bactérias heterotróficas ou quimioheterotróficas. Bactérias heterotróficas apresentaram capacidade de biolixiviar silicatos e carbonatos em escala laboratorial, mas a sua utilização em condições reais de operação industrial é incerta, pois a adição de nutrientes orgânicos e o controle da contaminação podem tornar o processo oneroso e inviável (Schippers *et al.*, 2013).

Apesar dos *primers* 341F e 907R serem bastante utilizados para analisar a comunidade de micro-organismos, sobretudo para a DGGE (Sánchez-Andrea *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2013), entre as principais bandas analisadas não foi possível identificar micro-organismos quimiolitotróficos, como *A. ferrooxidans*. Contudo, isso não significa a ausência destes micro-organismos nos consórcios, visto que nem todas as bandas puderam ser identificadas. Além disso, a técnica do

DGGE é baseada na amplificação por PCR do gene de rRNA 16S e viés associados aos *primers* e as amplificações podem ocorrer e interferir as análises (von Wintzinderode *et al.*, 1997). Ainda, deve ser considerado que uma banda intensa resultante do DGGE necessariamente não significa que a bactéria seja abundante no consórcio, porque as intensidades das bandas também podem ser influenciadas pelo número de cópias do gene rRNA 16S, pela amplificação preferencial do DNA, por co-migração de bandas no gel ou pela combinação desses eventos (Ferris & Ward, 1997; von Wintzinderode *et al.*, 1997; Nikolausz *et al.*, 2005). Assim, os micro-organismos quimiolitotróficos podem ter sido amplificados e até mesmo visualizados no gel de DGGE, mas devido à baixa abundância do produto de amplificação não foi possível identificá-los.

3.4 CONCLUSÃO

A utilização de consórcios de bactérias obtidas do próprio local de mineração pode ser promissora para a biolixiviação de metais, uma vez que foram obtidos consórcios de micro-organismos capazes de oxidar sulfato ferroso e biolixiviar sulfeto de cobre (calcopirita) de maneira mais eficiente que *A. ferrooxidans* LR. Houve seleção de populações bacterianas detectadas por PCR/DGGE e bactérias presentes nos consórcios foram identificadas.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aslam, Z.; Im, W. T.; Ten, L. N.; Lee, S. T. (2005) *Phenylobacterium koreense* sp. nov., isolated from South Korea. *Int J Syst Evol Micr* 55(5):2001-2005.
- Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Wheeler, D. L. (2006) GenBank. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkj157.
- Bevilaqua, D.; Diéz-Perez, I.; Fugivara, C. S.; Sanz, F.; Benedetti, A. V.; Garcia Jr, O. (2004) Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy. *Bioelectroch* 64(1):79-84.
- Bonnefoy, V.; Holmes, D.S. (2011) Genomic insights into microbial iron oxidation and iron

- uptake strategies in extremely acidic environments. *Env Microbiol* 14(7):1597-1611.
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 20:591-604.
- Brune, K. D.; Bayer, T. S. (2012) Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Front Microbiol* 3:203. doi: 10.3389/fmicb.2012.00203.
- Cai, L.; Liu, G.; Rensing, C.; Wang, G. (2009) Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol* doi:10.1186/1471-2180-9-4.
- Casamayor, E. O.; Schäfer, H.; Bañeras, L.; Pedrós-Alió, C.;Muyzer, G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66(2):499-508.
- Cole, J. R.; Chai, B.; Farris, R. J.; Wang, Q.; Kulam, S. A.; McGarrell, D. M.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M. (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33:D294-D296.
- Daoud, J.; Karamanev, D. (2006) Formation of jarosite during Fe^{2+} oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Miner Eng* 19(9):960-967.
- Dave, S. R.; Varjani, S.J; Tipre, D.R. (2012) Isolation and characterization of thiosulphate utilizing *Delftia* sp. From bulk polymetallic concentrate leachate. *Res J Biotech* 7 (4):119-124.
- de Andrade, J.C.; de Abreu, M.F. *Análise Química de Resíduos Sólidos para Monitoramento e Estudos Agroambientais*, Editora IAC, Campinas, 2006, 178 p.
- Demergasso, C. S.; Galleguillos, P, P. A.; Escudero, G, L. V.; Zepeda A, V. J.; Castillo, D.; Casamayor, E. O. (2005) Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy* 80(4):241-253.
- Feng, S.; Yang, H.; Xin, Y.; Gao, K.; Yang, J.; Liu, T.; Zhang, L.; Wang, W. (2013). A novel and highly efficient system for chalcopyrite bioleaching by mixed strains of *Acidithiobacillus*. *Bioresour Technol* 129:456-462.
- Ferris, M. J., Ward, D. M. (1997). Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *App Environ Microbiol* 63(4):1375-1381.
- Hackl, R. P.; Dreisinger, D. B.; Peters, E.; King, J. A. (1995) Passivation of chalcopyrite during oxidative leaching in sulfate media. *Hydrometallurgy* 39(1):25-48.
- He, Z.; Zhao, J.; Gao, F.; Hu, Y.; Qiu, G. (2010) Monitoring bacterial community shifts in bioleaching of Ni-Cu sulfide. *Bioresour Technol*. 101(21):8287-8293.

- Ivanova, E. P.; Vysotskii, M. V.; Svetashev, V. I.; Nedashkovskaya, O. I.; Gorshkova, N. M.; Mikhailov, V. V.; Yumoto, N.; Shiigiri, Y.; Taguchi, T.; Yoshikawa, S. (1999) Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Internatl Microbiol* 2(4):267-271.
- Johnson, D. B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 27(4):307-317.
- Johnson, D. B.; Okibe, N.; Roberto, F. F. (2003) Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics. *Arch Microbiol* 180(1):60-68.
- Johnston, C. W.; Wyatt, M. A.; Li, X.; Ibrahim, A.; Shuster, J.; Southam, G.; Magarvey, N. A. (2013) Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe. *Nat Chem Biol* 9:241-243.
- Jorgensen, N. O.; Brandt, K. K.; Nybroe, O.; Hansen, M. (2009) *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Micr* 59 (9):2195-2199.
- Kumar, R. N. Nagendran, R. (2007) Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Chemosphere* 66:1775-1781.
- Lacava, P. T.; Silva-Stenico, M. E.; Araújo, W. L.; Simionato, A. V. C.; Carrilho, E.; Tsai, S. M.; Azevedo, J. L. (2008) Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. *Pesqui Agropecu Bras* 43(4):521-528.
- Lavalle, L.; Chiacchiarini, P.; Pogliani, C.; Donati, E. (2005) Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochemistry* 40:1095-1099.
- Lundgren, D. G.; Silver, M. (1980) Ore leaching by bacteria. *Annu Rev Microbiol* 34(1):263-283.
- Marhual, N. P.; Pradhan, N.; Kar, R. N.; Sukla, L. B.; Mishra, B. K. (2008) Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Biores Technol* 99(17):8331-8336.
- Miqueletto, P. B.; Andreote, F. D.; Dias, A. C.F.; Ferreira, J. C.; Dos Santos Neto, E. V.; Oliveira, V. M. (2011) Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil. *AMB Express* 1:1-16.
- Morel, M. A.; Ubalde, M. C.; Braña, V.; Castro-Sowinski, S. (2011) *Delftia* sp. JD2: a potential Cr (VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Arch Microbiol* 193(1):63-68.
- Muyzer, G.; Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *A Van Leeuw* 73(1):127-141.
- Navarro-Noya, Y. E., Jan-Roblero, J., del Carmen González-Chávez, M., Hernández-Gama, R.,

- Hernández-Rodríguez, C. (2010). Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopoda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. *A Van Leeuw* 97(4):335-349.
- Neilands, J. B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270(45):26723-26726.
- Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., Márialigeti, K. (2005) Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett* 244(2):385-390.
- Norris, P. R.; Clark, D. A.; Owen, J. P.; Waterhouse, S. (1996) Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp nov and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology* 142:775-783.
- Norris, P. R. Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. In: Ehrlich H. L.; Brierley C. L (eds) *Microbial Mineral Recovery*. McGraw-Hill, New York, 1990, 3-27.
- Okibe, N.; Johnson, D. B. (2004) Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions. *Biotechnol Bioeng* 87 (5):574-583.
- Patel, B. C.; Tipre, D. R.; Dave, S. R. (2012) Development of *Leptospirillum ferriphilum* dominated consortium for ferric iron regeneration and metal bioleaching under extreme stresses. *Bioresource Technology* 118:483-489.
- Petersen, J.; Dixon, D. G. (2006) Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. *Hydrometallurgy* 83:40-49.
- Qiu, M.; Xiong, S.; Zhang, W.; Wang, G (2005) A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or a mixed culture. *Minerals Engineering* 18(9):987-990.
- Rawlings D. E. (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact* 4: 13. doi: 10.1186/1475-2859-4-13.
- Rawlings, D. E.; Johnson, D. B. (2007) The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153:315-324.
- Remonsellez, F.; Galleguillos, F.; Moreno-Paz, M.; Parro, V.; Acosta, M.; Demergasso, C. (2009) Dynamic of active microorganisms inhabiting a bioleaching industrial heap of low-grade copper sulfide ore monitored by real-time PCR and oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray. *Microb Biotechnol* 2(6):613- 624.
- Rohwerder, T.; Gehrke, T.; Kinzler, K.; Sand, W. (2003) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:239-24.

- Romo, E.; Weinacker, D. F.; Zepeda, A. B.; Figueroa, C. A.; Chavez-Crooker, P.; Farias, J. G. (2013) Bacterial consortium for copper extraction from sulphide ore consisting mainly of chalcopyrite. *Braz J Microbiol* 44(2):523-528.
- Sánchez-Andrea, I.; Rodríguez, N.; Amils, R.; Sanz, J L. (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol* 77:6085-6093
- Schippers, A.; Hedrich, S.; Vasters, J.; Drobe, M.; Sand, W.; Willscher, S. (2013) Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* doi: 10.1007/10_2013_216.
- Shigematsu, T.; Yumihara, K.; Ueda, Y.; Numaguchi, M.; Morimura, S.; Kida, K. (2003) *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(5):1479-1483.
- Spencer, P. A. (2001) Influence of bacterial culture selection on the operation of a plant treating refractory gold ore. *Int J Miner Process* 62:217-229.
- Suzuki, I. (2001) Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnol Adv* 19(2):119-132.
- Tao, Y.; Zhou, Y.; Ouyang, Y.; Lin, H. (2013) Dynamics of oral microbial community profiling during severe early childhood caries development monitored by PCR-DGGE. *Arch Oral Biol* 58(9):1129-1138.
- Third, K. A.; Cord-Ruwisch, R.; Watling, H. R. (2000) The role of iron oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. *Hydrometallurgy* 57:225-233.
- Tuovinen, O. H.; Kelly, D. P. (1972) Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Zeitschrift für Allgemeine Microbiologie* 12:311-346.
- Van Aken, B.; Peres, C. M.; Lafferty-Doty, S.; Yoon, J. M.; Schnoor, J. L. (2004) *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pinkpigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1191-1196.
- Vuilleumier, S.; Chistoserdova, L.; Lee, M-C.; Bringel, F.; Lajus, Zhou, Y.; Gourion, B.; Barbe, V.; Chang, J.; Cruveiller, S.; Dossat, C.; Gillet, W, et al. (2009) *Methylobacterium* Genome Sequences: A Reference Blueprint to Investigate Microbial Metabolism of C1 Compounds from Natural and Industrial Sources. *PLoS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0005584
- Wani, P. A.; Khan, M. S.; Zaidi, A. (2007) Chromium reduction, plant growth-promoting potentials, and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. *Curr Microbiol* 54(3):237-243.
- Watling, H.R.; Collinson, D. M.; Li, J.; Mutch, L. A.; Perrot, F. A.; Rea, S. M.; Reith, F. Watkin,

- E. L. J (2014) Bioleaching of a low-grade copper ore, linking leach chemistry and microbiology. *Miner Eng* 56:35-44.
- Watling, H. R.; Watkin, E. L. J.; Ralph, D. E. (2010) The resilience and versatility of acidophiles that contribute to the bio-assisted extraction of metals from mineral sulphides. *Environ Technol* 31:915-933.
- Weon, H. Y.; Kim, B. Y.; Kwon, S. W.; Go, S. J.; Koo, B. S.; Stackebrandt, E. (2008) *Phenylobacterium composti* sp. nov., isolated from cotton waste compost in Korea. *IJSEM* 58(10):2301-2304
- Willscher, S.; Bosecker, K. (2003) Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump. *Hydrometallurgy* 71(1):257-264.
- Willscher, S.; Pohle, C.; Sitte, J.; Werner, P. (2007) Solubilization of heavy metals from a fluvial AMD generating tailings sediment by heterotrophic microorganisms: Part I: Influence of pH and solid content. *J Geochem Explor* 92(2):177-185.
- von Wintzingerode, F.; Gobel, U. B.; Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21(3):213-229.
- Xia, L.; Tang, L.; Xia, J.; Yin, C.; Cai, L.; Zhao, X.; Nie, Z.; Liu, J.; Qiu, G (2012) Relationships among bioleaching performance, additional elemental sulfur, microbial population dynamics and its energy metabolism in bioleaching of chalcopyrite." *Trans Nonferrous Met Soc China* 22(1):192-198.
- Xu, Y.; Yin, H.; Jiang, H.; Liang, Y.; Guo, X.; Ma, L.; Xiao, Y.; Liu, X. (2013) Comparative study of nickel resistance of pure culture and co-culture of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum*. *Arch Microbiol* 195(9):637-646.

III. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do interesse científico e tecnológico acerca do potencial dos micro-organismos de ambientes de mineração, as informações sobre a estrutura das comunidades microbianas em mina de cobre ativa do Brasil são limitadas. O conhecimento se restringe aos estudos de isolamento e identificação de linhagens de *A. ferrooxidans* e ao recente trabalho de diversidade molecular baseado no gene de rRNA 16S de bactérias em solos contaminados com drenagem de mina (Pereira *et al.*, 2014). É necessário ampliar o conhecimento acerca dos micro-organismos presentes em mina brasileira para melhor compreender e utilizar os micro-organismos e/ou seus produtos nos processos de beneficiamento de metais, bem como outras aplicações biotecnológicas, tais como biorremediação e produção de compostos antimicrobianos.

A associação de metodologias moleculares e microbiológicas aplicadas neste trabalho evidencia a importância de se utilizar, em conjunto, as técnicas dependentes e independentes de cultivo para a caracterização da comunidade de micro-organismos de um ambiente, de forma a superar as limitações de determinadas técnicas e, ao mesmo tempo, usufruir das vantagens inerentes de outras. As análises da diversidade por pirosequenciamento revelaram que as amostras de ambientes de mina (talude e entorno da drenagem) apresentam uma complexa comunidade bacteriana, cuja composição e estrutura são influenciadas principalmente pelo conteúdo de matéria orgânica e disponibilidade de água. Os resultados indicam que *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* e *Gammaproteobacteria* foram os principais táxons responsáveis pelas diferenças na composição das comunidades de talude e do entorno da drenagem. Os dados obtidos pelo pirosequenciamento mostram um inventário das bactérias presentes em ambientes de mina e as modulações que ocorrem mediante os impactos ocasionados pela atividade de mineração.

O isolamento e identificação das bactérias heterotróficas mostrou diversidade taxonômica, cujas bactérias estão afiliadas aos seguintes gêneros: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Kocuria*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Roseomonas* e *Stenotrophomonas*. Todavia, *Bacillus* spp. representaram a maior fração das bactérias identificadas. Além disso, este foi o primeiro estudo sobre bactérias isoladas de mina de cobre ativa do Brasil com potencial de produção de compostos de interesse biotecnológico. As bactérias heterotróficas apresentaram ampla diversidade metabólica e a produção de sideróforos,

biossurfactantes e antimicrobianos, por exemplo, pode conferir vantagens adaptativas e/ou competitivas para as bactérias que os produzem. Além do mais, a prospecção de novas fontes de enzimas e compostos, principalmente de ambientes extremos, como é o caso da mina de cobre, é importante já que podem ser obtidos compostos mais resistentes às condições adversas que muitas vezes são requeridas em reações químicas e em processos industriais. Neste âmbito, a triagem funcional para as bactérias heterotróficas isoladas foi eficiente, pois todas as bactérias triadas produziram alguma enzima ou composto.

Foram obtidos consórcios de micro-organismos com potencial para a biolixiviação da calcopirita, que é o sulfeto de cobre mais refratário à oxidação. Além disso, as bactérias identificadas podem contribuir para o transporte ou a solubilização de metais. Nesse sentido, utilização de consórcios de micro-organismos capazes de biolixiviar sulfetos metálicos é uma estratégia que pode colaborar para o estabelecimento de novos processos e tecnologias que permitam a recuperação de metais. Portanto, uma vez conhecidos os principais grupos de micro-organismos e a sua distribuição no ambiente poderão ser traçadas pesquisas voltadas para otimizar os consórcios de micro-organismos para a biolixiviação, biorremediação ou outras aplicações industriais.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIMB/DNPM, Caracterização de depósitos minerais em distritos mineiros da Amazônia. Brasília: DNPM-CT/MINERAL-ADIMB, 2005, 782p.
- Alvarado, S.; Maldonado, P.; Barrios, A.; Jaques, I. (2002) Long term energy-related environmental issues of copper production. *Energy* 27(2):183-196.
- Antranikian, G.; Vorgias, C. E.; Bertoldo, C. (2005). Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. In *Marine biotechnology I* (pp. 219-262). Springer Berlin Heidelberg.
- Appia-Ayme, C.; Quatrini, R.; Denis, Y.; Denizot, F.; Silver, S.; Roberto, F.; Veloso, F.; Valdés, J.; Cárdenas, J. P.; Esparza, M.; Orellana, O.; Jedlicki, E.; Bonnefoy, V.; Holmes, D. (2006) Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83:273-280.
- Bergamo, R. F.; Novo, M. T.; Veríssimo, R. V.; Paulino, L. C.; Stoppe, N. C.; Sato, M. I.; Manfio, G. P.; Prado, P. I.; Garcia Jr, O.; Ottoboni, L. M. (2004) Differentiation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains based on 16S-23S rDNA spacer polymorphism analysis. *Res Microbiol* 155(7):559-567.
- Blacksmith Institute, The World's Worst Toxic Pollution Problems. Harris, J., McCartor, A (Eds) Report 2011; New York, 2011, 76p.
- Blacksmith Institute, The Worlds Worst 2013: The Top Ten Toxic Threats in 2013: Cleanup, Progress, and Ongoing Challenges New York, 2013, 37p.
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 20:591-604.
- Bradshaw, A. (1997) Restoration of mined lands – using natural process. *Ecol Eng* 8(4):225-269.
- Bridge, G. (2000) The social regulation of resource access and environmental impact: production, nature and contradiction in the US copper industry. *Geoforum* 31(2):237-256.
- Brierley, J. A.; Brierley, C. L. (2001) Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy* 59 (2-3):233-239.
- Brierley, C. L.; Brierley, J. A. (2013). Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7543-7552.
- Chen, Z. W.; Liu, Y. Y.; Wu, J. F.; She, Q.; Jiang, C. Y.; Liu, S. J. (2007) Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:688-698.

- Clark, D. A.; Norris, P. R. (1996) *Acidimicrobium ferrooxidans* gen nov, sp nov: mixed culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology* 142:785-790.
- Coram, N. J.; Rawlings, D. E. (2002) Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp nov dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. *Appl Environ Microbiol* 68(2):838-845.
- CPRM, Serviço Geológico do Brasil – Relatório da Administração de 2010, Brasil, 2010, 140p.
- CPRM, Geodiversidade do estado do Pará – Programa Geologia do Brasil – Levantamento da Geodiversidade. Belém, 2013, 258p.
- Damasceno, E C. Disponibilidade, suprimento e demanda de minérios para metalurgia /Eduardo Camilher Damasceno. — Rio de Janeiro: cetem/mct, 2007.
- Das, T.; Ayyappan, S.; Chaudhury, G. R. (1999). Factors affecting bioleaching kinetics of sulfide ores using acidophilic micro-organisms. *BioMetals* 12(1):1-10.
- Davis, J. R. Copper and Copper Alloys: ASM Specialty handbook. Ohio, USA: ASM International, 2001, 646 p.
- Delavat, F.; Lett, M. C.; Lièvremon, D. (2012) Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. *Biolo Direct* 7(1):28.
- Demergasso, C.; Galleguillos, F.; Soto, P.; Serón, M.; Iturriaga, V. (2010) Microbial succession during a heap bioleaching cycle of low grade copper sulfides: does this knowledge mean a real input for industrial process design and control? *Hydrometallurgy* 104(3):382-390.
- Departamento Nacional de Produção Mineral – DNPM - Economia Mineral do Brasil, Brasil, 2009, 764p.
- Departamento Nacional de Produção Mineral – DNPM Sumário Mineral, Brasil, 2012, 136p.
- Garcia Jr., O. Microrganismos e metais In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (eds). Microbiologia ambiental. Embrapa-CNPMA Jaguariúna, 1997, 11-41.
- Garcia Jr. O.; Urenha, L. C. 2001. Lixiviação bacteriana de minérios. In: Urgel de Almeida Lima; Eugênio Aquarone; W. Borzani & Willibaldo Schmidell (eds.), Biotecnologia Industrial, Edgard Blücher Editora-São Paulo.
- González-Toril, E.; Llobet-Brossa, E.; Casamayor, E. O.; Amann, R.; Amils, R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* 69(8):4853-4865.
- Hallberg, K. B.; Johnson, D. B. (2001) Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv Appl Microbiol* 49:37-84.
- Harrison Jr., A. P. (1982) Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus*

- ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch Microbiol* 131(1):68-76.
- He, Z.; Xiao, S.; Xie, X.; Zhong, H.; Hu, Y.; Li, Q.; Gao, F.; Li, G.; Liu, J.; Qiu, G. (2007) Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles* 11(2): 305-314.
- He, Z.; Xiao, S.; Xie, X.; Hu, Y. (2008) Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of dongxiang copper mine and Yinshan lead-zinc mine. *Extremophiles* 12(2): 225-234.
- He, Z.; Gao, F.; Zhao, J.; Hu, Y.; Qiu, G. (2010a). Insights into the dynamics of bacterial communities during chalcopyrite bioleaching. *FEMS Microbiol Ecol* 74(1):155-164.
- He, Z.; Zhao, J.; Gao, F.; Hu, Y.; Qiu, G. (2010b) Monitoring bacterial community shifts in bioleaching of Ni–Cu sulfide. *Bioresource Technol* 101(21):8287-8293.
- Instituto Brasileiro de Mineração – Informações e análises da economia mineral brasileira. Brasil, 2012, 68p.
- Izatt, R. M.; Izatt, S. R.; Bruening, R. L.; Izatt, N. E.; Moyer, B. A. (2014). Challenges to achievement of metal sustainability in our high-tech society. *Chem Soc Rev* doi: 10.1039/c3cs60440c.
- Jerez, C. A. (2008) The use of genomics, proteomics and other OMICS technologies for the global understanding of biomining microorganisms. *Hydrometallurgy* 94:162-169.
- Johnson, D.B. (2008) Biodiversity and interactions of acidophiles: key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *Trans Nonferrous Met Soc* 18:1367-1373.
- Johnson, D. B. Extremophiles: Acidic Environments. Encyclopedia of Microbiology. (Moselio Schaechter, ed), 2009, pp. 107-126 Oxford: Elsevier.
- Johnson, D. B. The biogeochemistry of biomining. In Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective Springer Netherlands. 2010, pp. 401-426.
- Johnson, D. B. (2013) Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. *Environ Sci Pollut Res*, 1-9.
- Johnson, D. B. (2014) Biomining - biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr Opin Biotechnol* 30:24-31.
- Johnson, D. B.; Grail, B. M.; Hallberg, K. B. (2013). A New Direction for Biomining: Extraction of Metals by Reductive Dissolution of Oxidized Ores. *Minerals* 3(1):49-58.
- Kelly, D. P.; Wood, A. P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst and Evol Micr* 50(2):511-516.

- Machado N.; Lindenmayer, Z.; Krogh, T. E.; Lindenmayer, D. (1991) U-Pb geochronology of Archean magmatism and basement reactivation in the Carajás area, Amazon Shield, Brazil. *Precambrian Res* 49:329-354.
- Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W. E.; Attiya, S.; Bader, J. S.; Bembien, L. A., et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-380.
- Marschik, R.; Spangenberg, J. E.; Leveille, R. A.; de Almeida, A. J. (2003) The Sossego iron oxide Cu–Au deposit, Carajás, Brazil. Mineral exploration and sustainable development. Millpress, Rotterdam, 331-334.
- MINBEC, Relatório de viabilidade: Projeto Sossego. Minerconsult, Bechtel, ECM, Concremat, 2001.
- Mishra, D.; Rhee, Y. H. (2014) Microbial leaching of metals from solid industrial wastes. *J Microbiol* 52 (1):1-7
- Mohapatra, B. R.; Douglas Gould, W.; Dinardo, O.; Koren, D. W. (2011) Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: a review of molecular methods. *Miner Eng*, 24(8):709-718.
- Monteiro, L. V.; Xavier, R. P.; de Carvalho, E. R.; Hitzman, M. W.; Johnson, C. A.; de Souza Filho, C. R.; Torresi, I (2008a) Spatial and temporal zoning of hydrothermal alteration and mineralization in the Sossego iron oxide–copper–gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil: Paragenesis and stable isotope constraints. *Miner Deposita* 43:129-159.
- Monteiro, L. V. S; Xavier, R. P.; Hitzman, M. W.; Juliani, C.; Souza Filho, C. R.; Carvalho, E. R. (2008b) Mineral chemistry of ore and hydrothermal alteration at the Sossego iron oxide copper gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil. *Ore Geol Rev* 34:317-336
- Ni, Y. Q.; Yang, Y.; Bao, J. T.; He, K. Y.; Li, H. Y. (2007) Inter- and intraspecific genomic variability of the 16S-23S intergenic spacer regions (ISR) in representatives of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 270(1):58-66.
- Ni, Y. Q.; He, K. Y.; Bao, J. T.; Yang, Y.; Wan, D. S.; Li, H. Y. (2008) Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China. *FEMS Microbiol Ecol* 64(2):248-259.
- Nordstrom, D. K.; Alpers, C. N. (1999) Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. *PNAS* 96(7):3455-3462.
- Norgate, T.; Jahanshahi, S. (2010) Low grade ores–Smelt, leach or concentrate? *Miner Eng* 23(2):65-73.
- Norris, P. R.; Clark, D. A.; Owen, J. P.; Waterhouse, S. (1996) Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp nov and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria.

Microbiology 142:775-783.

- Norris, P. R.; Burton, N. P.; Foulis, N. A. M. (2000) Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4:71-76.
- Novo, M. T. M.; De-Souza, A. P.; Garcia, O Jr.; Ottoboni, L. M. M. (1996) RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *Syst Appl Microbiol* 19(1):91-95.
- Nunes, L. P.; Kreischer, A. T. Introdução à metalurgia e aos materiais metálicos. Rio de Janeiro: Interciência, 2010, 376p.
- Oliveira, V. M.; Sette, L. D.; Fantinatti-Garboggini, F. (2006) Preservação e prospecção de recursos microbianos. *Multiciência*, São Paulo. 7:1-19.
- Olson, G. J.; Brierley, J. A.; Brierley, C. L. (2003) Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(3):249-257.
- Ossa Henao, D. M.; Vicentini, R.; Rodrigues, V. D.; Bevilacqua, D.; Ottoboni, L. M. M. (2014) Differential gene expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR planktonic and attached cells in the presence of chalcopyrite. *J Basic Microbiol* 54(7):650-657.
- Paulino, L. C.; Bergamo, R. F.; Garcia Jr, O.; de Mello, M. P.; Manfio, G. P.; Ottoboni, L. M. (2001) Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80(1):65-75.
- Pereira, L. B.; Vicentini, R.; Ottoboni, L. M. M. (2014) Changes in the Bacterial Community of Soil from a Neutral Mine Drainage Channel. *PLoS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0096605.
- Pinto, A. (2012) Viabilização da Mina de Cobre do Salobo. Viabilização da Mina de Cobre do Salobo Do Estratégico ao Tático, SIMEXMIN. Disponível em: <http://www.adimb.com.br/simexmin2012/wpcontent/themes/simexmin/palestras/11novosdepósitos/X_2_Pinto.pdf>. Acesso em 03 de setembro de 2013.
- Pizarro, J.; Jedlicki, E.; Orellana, O.; Romero, J.; Espejo, R.T. (1996) Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl Environ Microbiol* 62:1323-1328.
- Pradhan, N.; Nathsarma, K. C.; Srinivasa Rao, K.; Sukla, L. B.; Mishra, B. K. (2008) Heap bioleaching of chalcopyrite: a review. *Miner Eng* 21(5):355-365.
- Procobre – Aplicações do cobre. (2014) Disponível em: <<http://procobre.org/pt/cobre/aplicacoes/>>. Acesso em 20 de abril de 2014.
- Quatrini, R.; Appia-Ayme, C.; Denis, Y.; Ratouchniak, J.; Veloso, F.; Valdes, J.; Lefimil, C.; Silver, S.; Roberto, F.; Orellana, O.; Denizot, F.; Jedlicki, E.; Holmes, D.; Bonnefoy, V. (2006) Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

- by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* 83(1-4):263-272.
- Rawlings, D. E. (1998) Industrial practice and the biology of leaching of metals from ores. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20(5):268-274.
- Rawlings, D. E. (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* 56:65-91.
- Rawlings, D. E.; Dew, D.; du Plessis, C. (2003) Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends Biotechnol* 21(1):38-44.
- Rawlings, D. E. (2005) Characteristics and adaptability of iron-and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact*, doi:10.1186/1475-2859-4-13.
- Rawlings, D. E.; Johnson, D. B. (2007) The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153:315-324.
- REM: Rev. Esc. Minas (2004). Notícias da REM. Ouro Preto, 57(2):77-82.
- Rodrigues, V. D.; Martins, P. F.; Gaziola, S. A.; Azevedo, R. A.; Ottoboni, L. M. (2010) Antioxidant enzyme activity in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR maintained in contact with chalcopyrite. *Process Biochem* 45(6):914-918.
- Sánchez-Andrea, I.; Rodríguez, N.; Amils, R.; Sanz, J L. (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol* 77:6085-6093.
- Schippers, A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer, 2007, pp. 3-33.
- Schippers, A.; Breuker, A.; Blazejak, A.; Bosecker, K.; Kock, D.; Wright, T. L. (2010) The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe (II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 104:342-350.
- Schippers A, Hedrich S, Vasters J, Drobe M, Sand E, Willscher S (2013) Biomining: metal recovery ores with microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* doi: 10.1007/10_2013_216.
- Selenska-Pobell, S.; Otto, A.; Kutschke, S. (1998) Identification and discrimination of *thiobacilli* using ARDREA, RAPD and rep-APD. *J Appl Microbiol* 84:1085-1091.
- Sindicato das Indústrias Minerais do Estado do Pará - SIMINERAL, Anuário do Estado do Pará. Brasil, 2013, 308p.
- Sogin, M. L.; Morrison, H. G.; Huber, J. A.; Welch, D. M.; Huse, S. M.; Neal, P. R.; Arrieta, J. M.; Herndl, G. J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *PNAS* 103 (32):12115-12120.
- Tassinari, C. C. G.; Macambira, M. J. B. (1999) Geochronological provinces of the Amazonian

Craton. *Episodes* 22 (3):174-182.

Third, K. A.; Cord-Ruwisch, R.; Watling, H. R. (2000) The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. *Hydrometallurgy* 57:225-233.

Vale – Vale: nossa história. (2012) Disponível em: < http://www.vale.com/PT/aboutvale/book-our-history/Documents/livro/Vale_Livro_Nossa_Historia_cap9.pdf>. Acesso em 13 de outubro de 2013.

Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H.; Blake, R.; Eisen, J. A.; Holmes, D. S. (2008a) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9: 597 doi: 10.1186/1471-2164-9-597.

Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Holmes, D. S. (2008b) Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94(1):180-184.

Vera, M.; Schippers, A.; Sand, W. (2013) Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation - part A. *Appl Microbiol Biotechnol* doi: 10.1007/s00253-013-4954-2.

Villas, R. N. N.; Santos, M. D. (2001) Gold deposits of the Carajás Mineral Province: deposit types and metallogenesis. *Mineralium Deposita* 36:300-331.

Waltenbury, D. R.; Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. (2005). The use of RAPD genomic fingerprinting to study relatedness in strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Microbiol Methods* 62:103-112.

Watling, H. R. (2006) The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy* 84:81-108.

Watling, H. R.; Collinson, D. M.; Li, J.; Mutch, L. A.; Perrot, F. A.; Rea, S. M.; Reith, F. Watkin, E. L. J (2014) Bioleaching of a low-grade copper ore, linking leach chemistry and microbiology. *Miner Eng* 56:35-44.