UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE ENERGIA E AMBIENTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA AMBIENTAL

INGRID REGINA AVANZI

ESTUDO DA ATIVIDADE MICROBIANA NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS TÓXICOS NA REGIÃO AMAZÔNICA

SÃO PAULO
2016

INGRID REGINA AVANZI

ESTUDO DA ATIVIDADE MICROBIANA NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS TÓXICOS NA REGIÃO AMAZÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental do Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciência Ambiental.

Área de Concentração: Ciência Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Elen Aquino Perpetuo.

Versão Corrigida

(Versão Original disponível na biblioteca do Instituto de Energia e Meio Ambiente e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

SÃO PAULO

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Avanzi, Ingrid Regina.

Estudo da atividade microbiana na biorremediação de metais tóxicos na região Amazônica. / Ingrid Regina Avanzi, orientador : Claudio Augusto Oller do Nascimento; Co-orientadora : Elen Aquino Perpetuo. – São Paulo, 2016.

176 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciência Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental – Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo.

Nome: AVANZI, Ingrid Regina

Título: Estudo da atividade microbiana na biorremediação de metais tóxicos na Região Amazônica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental do Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciência Ambiental.

Aprovado em:_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Aos meus pais e ao meu marido Raphael

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu marido Raphael pelo companheirismo amor e por toda a sua paciência e dedicação ao meu lado ao longo desses anos. Aos meus pais Valdomiro e Márcia, um agradecimento especial por estarem sempre ao meu lado, me ensinando coisas maravilhosas, por todo o carinho e por nunca duvidarem da minha capacidade. A todos os familiares que estiveram presentes e trouxeram alegria a minha vida ao longo desses anos em especial ao meu sobrinho "terrível" Marcus Vinicius e meu irmão Wallace.

A minha segunda família, meus sogros José Luiz e Marcia e meus cunhados Felipe e Lais, que tiveram um papel muito importante durante os anos do doutorado, e especialmente a Nina, sobrinha canina de coração, pela recepção calorosa com muitas lambidas, todos os dias que eu chegava estressada em casa.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Elen Aquino Perpetuo, um agradecimento mais especial desse mundo e do fundo do coração por todos os ensinamentos, trocas de ideias, apoio e por ter topado ser minha mãe científica ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso, especialmente pela orientação neste trabalho.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação Pedro Roberto Jacobi e Luciana Jandelli Gimenes pelas importantes contribuições para o desenvolvimento dessa tese.

A professora Elizabeth Edwards, pela paciência, e oportunidade de experiência durante o estágio na University of Toronto, Toronto-ON, Canadá.

Ao Edlab e toda a equipe da BioZone, University of Toronto pelos conselhos, reuniões científicas, passeios, *"Tea Time"* e risadas!

Aos meus colegas internacionais Patrícia, Lorien, Yuliana, Jaypee, Benedicte e Rameshwor pela companhia quando eu mais precisei.

Aos meus irmãos científicos Louise, Marcela, Felipe e Letícia pelo apoio, paciência, amizade, cumplicidade, choros e risadas dentro e fora do laboratório.

Ao amigo Bruno Karolski pelas palavras sábias, teimosias, pelas discussões e desmaios que proporcionaram um novo rumo à pesquisa.

Aos colegas da Universidade de São Paulo, Rafaela, Nilson e Daniel pelo apoio durante a instrumentação de equipamentos do Cepema- POLI USP.

Aos meus novos colegas de laboratório, mas não menos importantes: Hugo, Elena, Gustavo e Diego.

A equipe do Cepema – POLI USP e principalmente ao coordenador Prof. Dr. Jorge Tenório pela infraestrutura laboratorial.

A equipe do Laboratório da Prof. Ana Claudia Muniz Rennó, em especial à Kelly, Angela, Patricia, Livia, Paulo (s), Kido, Matheus, Henrique que me receberam de braços abertos para os novos desafios que estão por vir.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP, pela concessão das bolsas de doutorado (processos 2012/06600-7 e 2015/05077-7), sem as quais seria praticamente impossível a conclusão da presente tese no formato que ela foi desenvolvida.

Finalmente ao meu computador pessoal, por ter resistido bravamente a todos os deslocamentos e variações de temperatura, pressão e humidade ao longo do desenvolvimento dessa tese, possibilitando a entrega da mesma sem grandes percalços por razões eletroeletrônicas.

"As águas não eram estas, há um ano, há um mês, há um dia. Nem as crianças, nem as flores, nem o rosto dos amores... Onde estão as águas e festas anteriores? "

Cecília Meireles, Mar Absoluto e Outros Poemas

RESUMO

AVANZI, I.R. **Estudo da atividade microbiana na biorremediação de metais tóxicos na Região Amazônica**. 2016. 176 fls. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Nas últimas décadas o crescimento industrial decorrente do desenvolvimento tecnológico e outras atividades consideradas indispensáveis à vida humana, estão gerando graves problemas ambientais, que está despertando uma preocupação a nível mundial. Dentre os vários contaminantes os metais tóxicos têm recebido atenção especial, pela sua persistência ao ingressar nos ecossistemas acumulando-se por toda a cadeia alimentar, uma vez que são extremamente tóxicos, mesmo em quantidades muito baixas. No Brasil, a legislação ambiental vigente já estabelece normas bastante rigorosas no que diz respeito ao descarte de águas contaminadas por metais tóxicos. Para que o tratamento deste tipo de efluentes seja feito adequadamente, e para que possam ser impostos limites máximos cada vez mais compatíveis com a sustentabilidade da vida moderna, torna-se relevante a preocupação com novas tecnologias mais eficientes e econômicas que permitam a remoção de metais tóxicos do ambiente contaminado. Hoje o tratamento do ambiente contaminado é realizado empregando-se tecnologias convencionais baseadas em princípios físico-químicos, as quais estão sendo consideradas ineficientes e economicamente inviáveis. Alternativamente, uma nova tecnologia, a biorremediação, vem ganhando cada vez mais importância, devido às vantagens que oferece: simplicidade, eficiência e baixo custo. Para isto é necessário ser avaliada a utilização de micro-organismos resistentes e eficazes na remoção do metal, pois, nesta fase são necessários que sejam selecionados organismos com características favoráveis ao processo. Dentro deste contexto, a proposta desse projeto foi isolar e caracterizar micro-organismos de uma área de mineração, avaliando os mecanismos e estratégias para o seu uso na remediação de áreas contaminadas a fim de otimizar a sua capacidade de adsorver íons de metais tóxicos, com vistas à utilização destas bactérias para a biossorção de efluentes de mineração. Foram isoladas e identificadas 105 cepas resistentes a cobre, destas 12 cepas foram capazes de crescer à 7.5 mM de cobre. Experimentos de adsorção com metais tóxicos (Cu, Cd e Ni) mostraram que tais cepas são promissoras na ampliação de tecnologias para uma mineração menos impactante, como a exploração de fontes de metais em baixa concentração, transformando o resíduo em fonte de extração economicamente viável e ambientalmente favorável.
.

Palavras-chave: Metais tóxicos, Cobre, Remediação, Áreas de Mineração.

ABSTRACT

AVANZI, I.R. 2016. **Study of microbial activity in bioremediation of toxic metals in Amazon Region;** 176 p. Doctoral's Degree thesis – Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recently, technological development has been resulted in an industrial growth and has been creating serious environmental problems as concern worldwide. Toxic metals have received special attention among many others contaminants, because their persistence in ecosystems and their capability of accumulation throughout the food chain (even in low amounts). Environmental legislation in Brazil has very strict standards regarding discharge of toxic metals contaminated water. For a successful treatment of such effluents, it is relevant to concern about new technologies more efficient and economics to allow the removal of metals heavy from contaminated environment. Today the treatment of contaminated area is carried out conventional technologies based on physicochemical principles, which are inefficient and uneconomical. Alternatively, a new technology, called bioremediation, is being more important due to the advantages it offers: simplicity, efficiency and low cost. Bioremediation may be a viable alternative for areas contaminated by toxic metals. It's needed to evaluate the use of resistant and effective microorganisms in removing the metal, because it's required to be selected organisms with favorable characteristics for the process. In this context, the aim of this project is isolating and characterizing microorganisms from a mining area, evaluating the mechanisms and strategies for using in the remediation of contaminated areas, in order to optimize its adsorb heavy metal ions ability and use these bacteria for bioremediation of mining effluents. This work isolated and identified 105 strains resistant to copper, 12 of them were able to grow up to 7.5 mM copper, adsorption experiments with toxic metals (Cu, Cd and Ni) showed that these strains are promising in expanding technologies for sustainable mining, such as the exploitation of low concentration metal sources, turning waste into economically viable mining and environmentally friendly.

Keywords: Toxic Metals, Copper, Remediation, Mining Areas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Canaã dos Carajás e município do entorno. Fonte: Adaptado de IBGE (www.ibge.gov.br)..... 35

Figura 2 Distribuição do consumo global do níquel de acordo com a Vale. FONTE: Ministério de Minas e Energia (2007)..... 39

Figura 3 Gráfico do consumo de cobre no mundo. Fonte: CRU GROUP (2011)..... 43

Figura 4 Esquema simplificado da circulação geral do cobre no corpo humano (AZEVEDO et al., 2003) modificado de SARGENTELLI; MAURO; MASSABNI (1996). . 44

Figura 5 Mecanismos de biossorção a) Classificação de acordo com a dependência do metabolismo celular, b) a classificação de acordo com a localização do metal removido no interior da célula (VEGLIÒ E BEOLCHINI APUD PERPETUO ET AL, 2011). 47

Figura 6 Transporte de cobre em procariotos (Gram-negativos) (ANDREAZZA *et al*., 2013). Membrana externa (ME), membrana interna (MI)..... 50

Figura 7 Ionização da amostra, separação por tempo de voo e detecção dos diferentes compostos resultando em um perfil proteico característico de cada amostra (BRUKER, 2013a APUD ANDRADE, 2015). 55

Figura 8 Fluxograma das atividades gerais desenvolvidas em laboratório. 58

Figura 9 Procedimento do isolamento de colônias, a partir do crescimento celular em meio seletivo contendo cloreto de cobre. 63

Figura 10 Medida de Massa Seca baseado no método de Olsson e Nielsen (1997)..... 70

Figura 11 Fluxograma do teste de concentração inibitória mínima de cobre feito nas cepas isoladas, a fim de selecionar as mais resistentes..... 71

Figura 12 Mapa do Google Earth, contendo os pontos georeferenciados dos diferentes eventos de coletas feitas para aquisição de amostras de solo e água para isolamento de bactérias resistentes ao cobre..... 77

Figura 13 Quantidade de isolados de cada gênero, provindos das cinco coletas. Identificadas por espectrometria de massas MALDI TOF..... 81

Figura 14 Identificação dos diferentes gêneros isolados, provindos das cinco coletas. Identificadas pela técnica do gene ribossomal 16S. 84

Figura 15 Frequência das famílias isoladas na Mina do Sossego (Canaã dos Carajás, PA). Identificação feita por MALDI-TOF e por amplificação do gene ribossomal 16S respectivamente. 85

Figura 16 As porcentagens se referem ao total de famílias identificados pela técnica de identificação ribossomal e pela técnica de espectrometria de massas (MALDI- Biotyper), de todos os locais amostrados. 86

Figura 17 Representação esquemática do dendograma de distância entre as 105 cepas isoladas e identificadas por MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics). 88

Figura 18 Curva de calibração feita a partir dos 3 métodos de digestão. As concentrações do eixo x e y estão em ppm, sendo que o eixo x é o valor esperado de cobre na amostra e o eixo y é a concentração real mostrada pelo equipamento ICP-OES. 89

Figura 19. As letras S, L e S+L representam respectivamente amostras sólidas, líquidas e amostras contendo partes sólida e líquida. As amostras de número 13 e 14 são variações do local 10 e a amostra 15 é representativa do fundo da cava de onde se extrai o minério de cobre processado. 92

Figura 20 Curva de Crescimento dos isolados em meio MJS. O gráfico mostra as diferentes fases de crescimento das bactérias utilizadas para a adsorção de metais, Em pontilhado estão os pontos utilizados para o cálculo da velocidade máxima de crescimento (plotados na Figura a seguir). 95

Figura 21 O gráfico mostra a equação utilizada para o cálculo da velocidade máxima de crescimento (μ máximo) de cada cepa isolada. O μ máximo é a inclinação da reta utilizando os pontos em fase exponencial (portanto se y=Ax + B, o valor referente ao μ máximo é o valor de A). 95

Figura 22 Crescimento celular em diferentes concentrações de cobre, visualizados após 24, 48, 72 e 120 horas. Os números ao lado direito são referentes as cepas que apresentaram crescimento em tais concentrações de cobre. 100

Figura 23 O gráfico mostra as porcentagens dos MIC das cepas em diferentes concentrações de cobre, e as cepas que compõem o seleto grupo das que são resistentes a 7,5 mM de cobre 102

Figura 24 Teste para seleção de cepas mais eficientes na adsorção do cobre. O experimento foi feito em meio MJS e 100ppm de cobre, a 28 ºC e 180 rpm. Foram adicionados mais 500ppm do metal após 24h de experimento para verificação da capacidade de adsorção de cada uma das cepas testadas. 103

Figura 25 Relação entre o peso seco de biomassa de *Acinetobacter sp.* e a sua absorbância em 600 nm, e a equação de conversão. 104

Figura 26 Relação entre o peso seco de biomassa de Burkholderia sp. e a sua absorbância em 600 nm, e a equação de conversão..... 105

Figura 27 Relação entre o peso seco de biomassa de Cupriavidus sp. e a sua absorbância em 600 nm, e a equação de conversão..... 105

Figura 28 a 30 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 100 mg.L-1 de CuCl2 em 10 mM de Tris-HCl pH 7,0 (Figura 28); pH 5,0 (Figura 29) e pH 2,0 (Figura 30). As biomassas vivas e mortas das células de Acinetobacter sp. (A), Burkholderia sp. (B) e Cupriavidus sp. (C) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES. 108

Figura 31 Efeito do pH na adsorção de cobre. Os experimentos foram feitos em Tris-HCl e em diferentes pHs (7,0; 5,0 e 2,0) a uma concentração de 100 $mg.L^{-1}$. As biomassas vivas e mortas das células de *Acinetobacter sp.* (A), *Burkholderia sp.* (B) e *Cupriavidus sp.* (C) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES após 24 horas de tempo de contato. 109

Figura 32 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 100 $mg.L^{-1}$ de $CuCl_2$ em TSM nos diferentes pHs estudados. As células viáveis de *Acinetobacter sp.* (A), *Burkholderia sp.* (B) e *Cupriavidus sp.* (C) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram digeridas e analisadas em ICP-OES. 111

Figura 33 Efeito do pH na adsorção de cobre. Os experimentos foram feitos em TSM e diferentes pHs (7,0; 5,0 e 2,0) e concentração de 100 $mg.L^{-1}$. As biomassas vivas das células de *Acinetobacter sp.*, *Burkholderia sp.* e *Cupriavidus sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES após 24 horas em solução. 112

Figura 34 a 36 Eficiência de biossorção do metal antes e depois da dessorção, utilizando-se da mesma massa celular. As células de Acinetobacter sp. (Figura 34), Burkholderia sp.

(Figura 35) e *Cupriavidus sp.* (Figura 36) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram retiradas após 24h de incubação e analisadas em ICP-OES.... 114

Figura 37 Curva de Calibração de níquel (pontos de 0 a 20 ppm) para ICP-OES. 115

Figura 38 Curva de calibração de cádmio (pontos de 0 a 20 ppm) para ICP-OES. ... 116

Figura 39 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 $mg.L^{-1}$ de $NiCl_2$ em pH 7,0. As biomassas vivas (em Tris-HCl 10 mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10 mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES. 117

Figura 40 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 $mg.L^{-1}$ de $NiCl_2$ em pH 5,0. As biomassas vivas (em Tris-HCl 10 mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10 mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES. 118

Figura 41 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 $mg.L^{-1}$ de $NiCl_2$ em pH 2,0. As biomassas vivas (em Tris HCl 10 mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10 mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES. 119

Figura 42 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 mg. L^{-1} de $CdCl_2$ em pH 7. As biomassas vivas (em Tris HCl 10mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180rpm e 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES. 120

Figura 43 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 $mg.L^{-1}$ de $CdCl_2$ em pH 5. As biomassas vivas (em Tris HCl 10mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180rpm e 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES. 121

Figura 44 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 $mg.L^{-1}$ de $CdCl_2$ em pH 2. As biomassas vivas (em Tris HCl 10mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180rpm e 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES. 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais de amostragem georeferenciados por e caracterização de cada amostra uma das cinco coletas. A coleta 1 foi realizada entre os dias 7 e 11 de maio de 2012, a coleta 2 entre os dias 3 e 7 de dezembro de 2012, a coleta 3 entre os dias 18 a 22 de março de 2013, a coleta 4 entre os dias 13 a 17 de maio de 2013 e a coleta 5 entre os dias 18 e 21 de março de 2014. 60

Tabela 2 - Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de cobre. A coloração azul indica que houve crescimento nas amostras e a coloração vermelha indica que não houve crescimento bacteriano observado em relação a variação da concentração de cobre. 78

Tabela 3 - Pontos da curva de calibração de cada metodologia de digestão. Os pontos abaixo estão em ppm e são referentes à média aritmética das triplicatas. É importante lembrar que a detecção máxima do equipamento é de 10 ppm, portanto os valores acima desta concentração foram extrapolados utilizando curva de detecção do equipamento. 90

Tabela 4 - Resultados das análises de metais realizadas pelo ICP-OES. Os valores mostrados já se encontram calculados para a concentração total da amostra. Foram identificadas as respectivas concentrações para cádmio, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco. As Letras S, L e S+L nas amostras significam, respectivamente, *solo, líquido e solo com líquido*. 93

Tabela 5 - Velocidade Máxima de Crescimento ($\mu_{máx}$ em abs por hora) das Cepas selecionadas e o Tempo de duplicação (g em horas), o tempo de duplicação é calculado a partir da divisão do ln 2 pelo $\mu_{máx}$ observado em cada cepa. 94

Tabela 6 - Crescimento celular em diferentes concentrações de cobre, visualizados após 24, 48, 72 e 120 horas. O sinal (+) significa que houve crescimento celular. A coluna nomeada como “isolados”, contém as seguintes informações: tipo de amostra que foi isolada (S) Solo ou (L) líquida, seguido do ponto de coleta; a quantidade de cobre que foi isolada previamente e o número de isolados com a mesma característica. 96

Tabela 7 - Mínima concentração inibitória de cobre no crescimento microbiano de bactérias encontradas na literatura. 100

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$(NH_4)_2MoO_4$	Molibidato de amônio
±	Aproximadamente
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micro molar
µm	Micrômetro
µmáx	Velocidade Máxima de Crescimento
16S	Região dos ribossomos procarióticos (16S)
Ag	Prata
As	Arsênio
ATCC	American Type Culture
Cd	Cádmio
Cd^{+2}	Cátion de cádmio bivalente
$CdCl_2$	Cloreto de cádmio
CENSO	Censo demográfico
Co	Cobalto
$CoCl_2$	Cloreto de Cobalto
CopA/ CopB/ CopC/ CopD/CopY/CopZ	Proteínas envolvidas na resistência do cobre
Cr	Cromo
Cs	Césio
Cu	Cobre
Cu (I)	Cobre I
Cu (II)	Cobre II
Cu^{+1}/Cu^{+2}	Oxidação de cobre II em cobre I
Cu^{+2}	Cátion de cobre bivalente
$CuCl_2$	Cloreto de cobre
D.O.	Densidade Ótica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPM	Departamento Nacional de Produção Mineral
EdLab	Laboratório Prof. Elizabeth Edwards
EIAs	Estudos de Impactos Ambientais

EPA	Agência de Proteção ao Meio Ambiente (Environmental Protect Agency)
Fe (III) (NH_4) citrato	Citrato Férrico de Amônio
FeS	Ferro e Enxofre
g	Grama
$g.L^{-1}$	Grama por litro
g/cm^3	Grama por centímetro cúbico
g/L	Grama por litro
GmbH	Sociedade Comercial Alemã (*Gesellschaft mit beschränkter Haftung)*
GPS	Sistema de Posicionamento Global (*global positioning system*)
h	Horas
H^+	Próton
H_3BO_3	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico
$HCl:HNO_3$	Mistura de ácido clorídrico com ácido nítrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etano sulfônico
Hg	Mercúrio
HNO_3	Ácido Nítrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-OES	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado *(Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy)*
ID	Identificação
IDESP	Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará
ISO 14.000	Sistema de Gestão Ambiental de Empresas e Empreendimentos
KCl	Cloreto de Potássio
Km	Quilômetro
Km^2	Quilômetros quadrados
L	Litro
M	Molar
MALDI	*Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization)*

MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz, separado por Tempo de Voo (Matrix-assisted laser desorption/ionization, Time-of-Flight)
ME	Membrana externa
mg	Miligrama
$mg.g^{-1}$	Miligrama por grama
$mg.L^{-1}$	Miligrama por litro
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
MIC	Mínima Concentração Inibitória
MJS	Meio Nutriente para Crescimento Microbiano
mL	Mililitro
mL/L	Mililitro por litro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
$MnCl_2$	Cloreto de Manganês
$M\Omega cm^{-1}$	MiliOhm por Centímetro
N_2/CO_2	Gás Mix (Nitrogênio e Gás Carbônico)
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas *(National Center for Biotechnology Information)*
NH_4Cl	Cloreto de amônio
Ni	Níquel
NiCd	Níquel-cádmio
$NiCl_2$	Cloreto de níquel
nm	Nanômetro
NOSA	Certificação Ambiental Internacional
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
PA	Pará
PCAs	Planos de Controle Ambientais
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia *(Polimerase Chain Reaction)*
Pb	Chumbo
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por Milhão
R^2	Coeficiente de Correlação

rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
RDP	Projeto de dados Ribossomais *(The Ribosomal Database Project)*
RIMAs	Relatórios de Impactos Ambientais
rpm	Rotações por minuto
S	Sul *(South)*
s	Segundos
Si	Estanho
SINDICEL/ABC	Sindicato da Indústria de Condutores Elétricos, Trefilação e Laminação de Metais Não Ferrosos do Estado de São Paulo
SL 7	Solução traço 7
Sr	Estrôncio
t	Toneladas
TCE	Tri-Cloro- Etileno
Tal	Tálio
TOF	Tempo de voo *(Time-of-flight)*
Tris	Tris (Hidróximetil)Aminometano
Tris-HCl	Tris (Hidróximetil)Aminometano com Ácido Clorídrico
TSM	Meio Mínimo Nutriente
US$	Dólares
USA	Estados Unidos da América (United States of America)
V	Vanádio
V1-V9	Regiões Variáveis do DNA
W	Oeste *(West)*
W	Watts
Zn	Zinco
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 OBJETIVOS 25

3 JUSTIFICATIVA 26

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

4.1 MINERAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL 27

4.1.1 Indicadores ambientais 29

4.1.2 Gestão de resíduos da mineração 30

4.2 MINERAÇÃO NO BRASIL 31

4.3 ACIDENTES NA INDÚSTRIA DA MINERAÇÃO 33

4.4 CANAÃ DOS CARAJÁS 34

4.5 METAIS TÓXICOS 36

4.5.1 Níquel 38

4.5.2 Cádmio 41

4.5.3 Cobre 42

4.5.3.1 Toxicologia do cobre 44

4.5.3.2 A importância do cobre para a economia 45

4.5.3.3 O cobre em organismos e mecanismos de resistência 46

4.6 TÉCNICAS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS 48

4.6.1 A Biorremediação como técnica de reaproveitamento de rejeitos 48

4.6.1.1 Uso de bactérias para a remediação de cobre 50

4.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS 51

4.7.1 Identificação molecular clássica - Sequenciamento do gene 16S 52

4.7.2 Padrão Proteico - MALDI Biotyper 54

5 MATERIAL E MÉTODOS 57

5.1 COLETA DE AMOSTRAS 59

5.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS 62
5.3 PERFIL PROTEICO E GENÔMICO COMO FERRAMENTAS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS 64
5.3.1 Identificação de bactérias por espectrometria de massas (MALDI-TOF) 64
5.3.2 Identificação molecular por amplificação do gene ribossomal 16 S (16 S rDNA) 65
5.4 ESTUDO DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE COBRE POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO AMBIENTE 66
5.4.1 Preparação de solução 66
5.4.2 Padronização do método de quantificação de metais por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma) 67
5.4.2.1 Metodologia 1: Digestão ácida em bloco aquecido 68
5.4.2.2 Metodologia 2: Digestão ácida em micro-ondas 69
5.4.2.3 Metodologia 3: Digestão em água-régia em micro-ondas 69
5.4.3 Determinação da Massa Seca das Bactérias a serem utilizadas para biossorção 70
5.4.4 Teste de concentração inibitória mínima de cobre 71
5.4.5 Teste de seleção prévia dos micro-organismos mais resistentes 72
5.4.6 Identificação dos mecanismos de biossorção de cobre: adsorção, dessorção e ressorção 72
5.4.7 Influência do pH na adsorção do cobre 74
5.5 ESTUDO DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE OUTROS METAIS (NÍQUEL E CÁDMIO) POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO AMBIENTE 74
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 76
6.1 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS RESISTENTES A METAIS TÓXICOS 76
6.2 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF) 80
6.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS ISOLADAS 83
6.3.1 Construção de Árvore Filogenética a partir dos resultados do MALDI-Biotyper 87

6.4 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES 89
6.5 QUANTIFICAÇÃO DE METAIS NAS AMOSTRAS COLETADAS 91
6.6 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS 94
6.7 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE METAIS TÓXICOS – (MIC) 96
6.8 TESTE DE SELEÇÃO PRÉVIA DOS MICRO-ORGANISMOS MAIS RESISTENTES 101
6.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS PARA A BIOSSORÇÃO 104
6.9.1 Influência do pH na biossorção de cobre 106
6.10 TESTE DE ADSORÇÃO, DESSORÇÃO E RESSORÇÃO DE COBRE 112
6.11 EXPERIMENTOS DE BIOSSORÇÃO COM OUTROS METAIS 115
***6.11.1* Adsorção de níquel por *Burkholderia sp.* 116**
***6.11.2* Adsorção de cádmio por *Burkholderia sp.* 119**
7 CONCLUSÃO 123
REFERÊNCIAS 126

1 INTRODUÇÃO

Os metais tóxicos, anteriormente chamados de metais pesados, têm sido utilizados intensamente pelo ser humano após a Revolução Industrial, aumentado a contaminação ambiental, tornando-se um problema pertinente e motivo de intensa pesquisa. Mesmo com novas tecnologias de reciclagem e que diminuem o desperdício, a exploração de recursos minerais que ainda se encontram no meio ambiente é necessária para suprir o constante desenvolvimento tecnológico e social. A atividade de extração de recursos minerais está, na maioria das vezes, acompanhada por problemas ambientais como modificação do relevo, degradação de habitat e também contaminação de solo e de água pelo aumento de concentração de metais livres no ambiente.

A responsabilidade pela gestão ambiental, antes restrita aos profissionais de meio ambiente, passou a abranger pessoas em todas as funções da organização e ser coordenada por gerências ou diretorias, aumentando o compromisso da organização. Para que haja discussão de ideias entre as diferentes áreas do conhecimento, indicadores ambientais cumprem o objetivo social de melhorar a comunicação entre os tomadores de decisão política e a sociedade na discussão de temas complexos sobre os quais há necessidade de um consenso social acerca da estratégia de sua abordagem, como a política ambiental.Neste sentido, os metais tóxicos têm recebido atenção especial pela sua persistência ao ingressar nos ecossistemas acumulando-se por toda a cadeia alimentar. Tóxicos para uma grande variedade de organismos mesmo em quantidades muito baixas, quando lançados no ambiente, uma das formas de se espalharem é alcançando o lençol freático. Os metais tóxicos diferenciam-se dos compostos orgânicos tóxicos por não serem degradáveis, de maneira que podem acumular-se no ambiente, no qual manifestam sua toxicidade, fixando-se de forma final nos solos e sedimentos (OWENS, 1996).

O cobre é um metal usado amplamente nas áreas industrial e agrícola, de forma que pode ser acrescido ao meio a partir da disposição de resíduos sólidos industriais ou domésticos, uso de agroquímicos e aplicação de dejetos animais e efluentes ao solo. Andreazza et al. (2013) citam que em grandes concentrações no solo, o cobre pode proporcionar caráter tóxico aos

vegetais. Para os seres humanos, a contaminação com cobre (Cu) leva a graves complicações à saúde, podendo causar câncer e até mesmo a morte. No desejo de moldar a exploração de minérios em formatos menos agressivos ao meio ambiente e direcioná-la às metas do desenvolvimento sustentável, a busca por novas alternativas na área de biotecnologia, especialmente focados na prevenção da poluição ambiental e biorremediação, estão sendo cada vez mais requisitadas.

A cidade de Canaã dos Carajás, após a implantação do projeto de exploração de cobre na Mina do Sossego e emancipação política tornou-se autônoma economicamente. (SOUZA, 2010). Apesar de sua estrutura sócio espacial ser limitada, sua população aumentou de 10.921 em 2000 para aproximadamente 30.000 habitantes em 2010 (CENSO, 2010) e de acordo com as perspectivas de novos projetos no local de mineração, é possível que este índice aumente para 100.000 habitantes rapidamente (SOUZA, 2010). A Mina do Sossego é a maior mina de exploração de cobre do Brasil com capacidade para 140 toneladas anuais de cobre. Além da extração do minério, a atividade de mineração produz uma lagoa de rejeitos cujos sedimento e água ali depositados apresentam baixas concentrações de cobre metálico. Apesar de contida e administrada, esta lagoa é configurada como um impacto ambiental causado em plena região amazônica.

Ciente deste problema, alternativas de tratamento foram buscadas para sua descontaminação levando-se em consideração o tamanho da lagoa, custo de tratamento e resultados a serem alcançados. Dentro dos fatores levados em conta, a tentativa de descontaminação escolhida foi através de biorremediação através da utilização da microbiota local para este tratamento. Recentemente, uma revisão sobre estudos de biorremediação foi apresentada por Perpetuo et al. (2011), considerando esta técnica como uma alternativa viável para a recuperação de áreas contaminadas por metais tóxicos. No entanto, para que isto ocorra, faz se necessário o isolamento de micro-organismos resistentes e eficazes na remoção do metal, e que também apresentem características favoráveis ao processo, como a possibilidade de concentração destes metais para posterior reaproveitamento.

Para organismos como plantas, fungos e bactérias, altas concentrações de cobre promovem uma pressão de seleção, mantendo somente os organismos resistentes neste local contaminado (ANDREAZZA et al., 2013). Essa pressão de seleção pode ser utilizada para

selecionar organismos resistentes a estas condições, tornando-os alvos interessantes para usos em processos de biorremediação.

Neste contexto, a proposta desse projeto é de isolar e caracterizar micro-organismos provenientes de lagoa de rejeitos uma mina de cobre, avaliando os tratamentos e estratégias de adsorção para sua aplicabilidade na remediação de áreas contaminadas. Como aprofundamento da proposta, serão estudados a sua capacidade de adsorver íons de metais tóxicos pelas bactérias selecionadas com vistas à utilização para a biorremediação de efluentes de mineração.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi contribuir com as pesquisas relacionadas ao processo de adsorção de metais tóxicos de ambientes contaminados e sua recuperação. Este trabalho foi conduzido pelo isolamento, cultivo e caracterização de micro-organismos a partir de amostras ambientais (sedimento e água), de lagoas de rejeitos de minas de cobre situadas na região amazônica.

Para tanto foram delineadas as seguintes etapas:

- Isolar micro-organismos resistentes ao cobre;
- Analisar as condições de cultivo;
- Testar a resistência dos micro-organismos frente aos metais;
- Identificar as cepas através de biologia molecular clássica (amplificação da região 16S rDNA por PCR) e por espectrometria de massa (MALDI Biotyper);
- Testar a adsorção de metais tóxicos em mesa pelas bactérias isoladas e caracterizadas neste trabalho;
- Analisar a influência do pH inicial na adsorção de metais tóxicos (Cobre, Níquel e Cádmio) e a influencia dos diferentes preparos da biomassa das cepas isoladas durante a biossorção;

3 JUSTIFICATIVA

A justificativa para a realização desta pesquisa está baseada na ideia de que o proveito econômico que motivam o engajamento das empresas sobre as questões relacionadas ao meio ambiente, neste caso a partir da adoção de medidas economicamente viáveis para o reaproveitamento de rejeitos, pode enriquecer o debate sobre a internalização dos desafios sobre a relação entre empresas e água, que emergiu recentemente.

A partir dos últimos acidentes ocorridos em barragens de contenção de rejeitos, é importante enfatizar a necessidade de uma utilização consciente dos recursos minerais. Estes desastres causam danos a população do entorno da barragem, além de econômicos ao empreendedor e danos ambientais irreparáveis. Além disso, o uso de técnicas de reaproveitamento de rejeitos, diminui o consumo de água e contribui para a reflexão sobre os caminhos possíveis que as empresas têm sinalizados para atenuarem no sentido do seu uso sustentável. Isso poderá direcionar os esforços no desenvolvimento de ferramentas que pretendam aproximar as empresas de questões relacionadas ao meio ambiente e estimular a parceria e cooperação entre diferentes setores, como o setor público e cidadãos.

A contaminação de efluentes por metais tóxicos é motivo de preocupação por promover severos distúrbios aos organismos e ecossistemas. A poluição do meio ambiente por metais tóxicos é decorrente, em sua maior parte, das atividades antropogênicas produtoras de resíduos que, via de regra, são descartados diretamente em ambientes aquáticos ou no solo, sem prévio tratamento, levando ao acúmulo de metais tóxicos e causando perdas econômicas, de biodiversidade, além de sérios riscos à saúde pública. Portanto, a busca por processos remediadores que sejam economicamente viáveis e ecologicamente corretos tem se intensificado nos últimos anos e o uso de micro-organismos para biorremediação se mostra vantajoso, principalmente pelos baixos custos, quando comparado às técnicas físico-químicas atualmente empregadas no tratamento de efluentes contendo metais.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tendo em vista a complexidade do tema, os aspectos sociais e a diversidade de fatores físico-químicos e biológicos atuantes em áreas contaminadas por metais tóxicos, a revisão bibliográfica foi realizada objetivando demonstrar de forma sucinta o comportamento dos metais, os processos de remediação e como eles afetam diretamente a população.

Para este estudo, como alternativa para descontaminação de passivos ambientais foi escolhida a técnica de biossorção. Desse modo, os principais aspectos envolvidos na biorremediação de áreas contaminadas com metais tóxicos, como os danos causados pela mineração, a toxicologia do cobre, as fontes de poluição, os mecanismos biológicos de resistência e as estratégias para o uso de micro-organismos e de plantas para a remediação de áreas contaminadas por metais foram objetos da presente revisão.

4.1 Mineração e sua relação com o desenvolvimento sustentável

Minerar é uma das atividades mais primitivas exercidas pelo homem como fonte de sobrevivência e produção de bens sociais e industriais, porém tem sido uma das menos aceitas dentro do novo conceito de desenvolvimento sustentável (ASSIS; BARBOSA; MOTA, 2011). A utilização de metais pela atividade antrópica tem sido intensa e contínua e, portanto, têm-se aumentado a contaminação ambiental, tornando-se um problema pertinente e motivo de intensa pesquisa. No mundo moderno é inegável que a mineração assume importância decisiva para o

desenvolvimento econômico e social, pois o minério extraído da natureza é encontrado nos mais diversos objetos de utilização diária (KOPEZINSKI, 2000).

Segundo o relatório “Nosso Futuro Comum”, lançado em 1987 (também conhecido como "Relatório Brundtland"), o conceito de desenvolvimento sustentável ficou estipulado como "o atendimento das necessidades do presente sem comprometer a possibilidade das gerações futuras atenderem as suas próprias necessidades"(WCED, 1987). Neste conceito foram embutidos pelo menos dois importantes princípios: o de necessidades e o da noção de limitação. O primeiro trata da equidade (necessidades essenciais daqueles socialmente vulneráveis) e o outro se refere às limitações que o estágio da tecnologia e da organização social determinam ao meio ambiente (WCED, 1987).

Para atingir as metas de desenvolvimento sustentável, é indispensável o manejo racional dos recursos naturais, o que exige o emprego de novas tecnologias. Entre as tecnologias que apresentam potencial para contribuir para o desenvolvimento sustentável, a biotecnologia tem muito a oferecer, especialmente no campo de prevenção da poluição ambiental.

A atividade de mineração produz considerável impacto ambiental em relação a qualidade das águas dos rios e reservatórios da mesma bacia a jusante do empreendimento. Devido a sua natureza de remoção e processamento do solo concentrado com minérios, sedimentos finos em suspensão alcançam corpos d’água provocando turbidez, o que pode causar menor penetração da luz influenciando principalmente no desenvolvimento de organismos fotossintetizantes. Outro impacto está relacionado com a poluição causada por substâncias lixiviadas, carreadas ou contidas nos efluentes das áreas de mineração, tais como óleos, graxas e principalmente metais tóxicos. Estas substâncias atingem diretamente os seres vivos contaminando os organismos em contato direto com o poluente (caso de óleos e graxa) e indiretamente através das cadeias alimentares (caso dos metais tóxicos), que se espalham no meio ambiente com características acumulativas(PEREIRA, 2004).

4.1.1 Indicadores ambientais

Para aplicar o conceito de desenvolvimento sustentável torna-se fundamental o estabelecimento de indicadores, objetivos e metas que possam dar a medida do desempenho de um país em matéria de sustentabilidade.

Com objetivo de transformar uma realidade complexa em um conceito de fácil entendimento, os indicadores buscam realizar um diagnóstico, servem para indicar uma direção e também podem servir como um recurso que torna um fenômeno ou uma tendência que não seja imediatamente detectável mais perceptível (BELLEN, 2004).

Alguns autores destacam as vantagens e limitações decorrentes da utilização destas ferramentas, mostrando que qualquer sistema que procure medir o grau de sustentabilidade de um determinado processo deve observar determinados aspectos (HARDI; ZDAN, 1997; CHAMBERS; SIMMONS; WACKERNAGEL, 2000).

Viana (2012) elaborou o chamado Índice de Sustentabilidade na Mineração (ISM) que é utilizado para aferir a sustentabilidade de minas a partir de 70 indicadores dispostos nas três dimensões da sustentabilidade: econômica, social e ambiental. Esses indicadores não se limitam apenas ao ambiente interno da empresa, mas refletem o desempenho desta em relação ao ambiente, as comunidades em seu entorno e o município no qual a empresa está inserida. O modelo levou em consideração as metodologias de aferição de sustentabilidade já existentes, agrupando os indicadores de forma similar até a elaboração o Índice de Desenvolvimento Sustentável (IDS). Na dimensão econômica, Viana (2012) levou em consideração os riscos originados pela atividade minerária, na dimensão social foram consideradas as condições de trabalho e da influência da atividade produtiva de mineração próxima as comunidades. E quanto a dimensão ambiental, os aspectos considerados foram a gestão de efluentes e dos resíduos gerados, e quais medidas de gestão ambiental são efetivamente adotadas com vistas a reduzir o impacto gerado pela atividade produtiva de mineração.

A utilização de indicadores ambientais estimula um maior comprometimento das indústrias mineradoras, com uma gestão voltada para a sustentabilidade e que vise minimizar os impactos causados pela sua atividade, denotando também um fator primordial para a competitividade do setor.

4.1.2 Gestão de resíduos da mineração

As barragens para disposição de rejeitos e as pilhas de estéril são elementos estruturais usualmente presentes nas atividades do setor de mineração que representam grandes riscos e podem causar impactos à segurança das pessoas e ao meio ambiente (IBRAM, 2012).

Os demais resíduos das atividades de mineração e processamento de minérios são usualmente em menor quantidade (quando comparados à quantidade de rejeito e estéril). Entretanto, podem compreender resíduos perigosos e, devido à localização frequentemente remota das operações, contar com poucas alternativas para disposição final adequada.

O tema de gestão de resíduos de processos, em especial rejeitos da mineração, gerou iniciativas do Ibram, como a criação em 2008 do Programa Especial de Segurança em Barragens de Rejeitos. Segundo dados do Ibram (2012) embora existam mineradoras com alto desempenho na gestão de barragens, o quadro geral é de preocupação, pois falta conhecimento dos principais conceitos técnicos sobre a gestão de segurança de barragens de rejeitos nos vários níveis operacionais dos empreendimentos além da dificuldade de monitoramento das barragens pelos órgãos fiscalizadores.

Embora haja domínio das técnicas de construção e das ferramentas de monitoramento, ainda há falhas vinculadas à gestão da segurança de barragens. Estado de conservação das

estruturas, ausência de procedimentos de monitoramento, ou ineficiência deles são exemplos de causas de acidentes relacionados à gestão da segurança das barragens.

Especialistas apontam que a maioria dos acidentes e incidentes também decorrem da falta da aplicação de tecnologias já consagradas por parte de empresas e também por falhas na fiscalização do poder público (SILVA; RIBEIRO, 2005). Há espaço, portanto, para aperfeiçoar o papel desempenhado pelos dois lados envolvidos diretamente na questão.

4.2 Mineração no Brasil

A economia brasileira tem aumentado o nível de consumo de matéria-prima mineral apesar da crise internacional. Em 2012, o mercado brasileiro de mineração era dominado por aproximadamente 15 empresas, tanto de capital de origem internacional como nacional (ROCIO et al., 2012). A produção de minério de ferro e das outras principais commodities minerais está concentrada em poucas empresas, acompanhando a tendência mundial do setor de mineração, muito intensivo em capital. Além de ser um dos maiores exportadores mundiais de minério de ferro, o Brasil é também exportador líquido de praticamente todos os metais não ferrosos (ROCIO et al., 2012). A exceção é o cobre, que é importado nas formas de minério concentrado, catodo, fios e cabos. O cobre destaca-se por sua diversidade de aplicações e pela alta taxa de crescimento da demanda no país e no mundo nos últimos anos, apesar de sua indústria ter recebido poucos investimentos nos anos recentes no Brasil e desde o início da década passada, o consumo efetivo de cobre refinado tem apresentado crescimento significativo. Acredita-se que a tendência para os próximos anos é de aumento do consumo desse metal, em função da construção de hidrelétricas e da expansão de segmentos de energia

elétrica, construção civil, circuitos eletroeletrônicos, motores elétricos, componentes automotivos, entre outros (RODRIGUES DA SILVA ENRÍQUEZ, 2009).

Desde os anos 80, acompanhando a institucionalização crescente das questões ambientais no mundo, o Brasil vem estruturando um marco regulatório bastante vasto para tratar dos temas ambientais ligados à mineração (ROCIO et al., 2012). São exemplos disso os órgãos especialmente criados para lidar com o assunto, tais como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), as Secretarias Estaduais e Municipais de Meio Ambiente, Conselhos Estaduais e Municipais de Meio Ambiente, entre outros, bem como as resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), em particular as resoluções 001/1986 e 237/1997, que tratam da exigência dos Estudos de Impacto Ambientais (EIAs) e demais instrumentos de comando e de controle como Relatórios de Impactos Ambientais (RIMAs), Planos de Controle Ambientais (PCAs), Relatórios de Controle Ambientais (RCAs), planos de monitoramentos, planos de fechamento de mina, apresentação dos estudos em audiências públicas, aprovação pelos conselhos estaduais e municipais de meio ambiente, entre outros (RODRIGUES DA SILVA ENRÍQUEZ, 2009). Além desses instrumentos coercitivos, há também mecanismos indutores de mercado que exercem forte pressão para uma atitude ambientalmente mais proativa, por parte da indústria mineral, tais como as negociações de ações das companhias mineradoras em bolsas de valores, além de instrumentos voluntários e de comunicação como a adesão aos 2 programas de certificação ambiental internacionais (ISO 14.000 e NOSA) que contribuem favoravelmente para que as grandes companhias mineradoras assumam maior compromisso com a dimensão ambiental do desenvolvimento sustentável (RODRIGUES DA SILVA ENRÍQUEZ, 2009).

No Brasil, muito mais do que a base produtiva, os municípios mineradores se diferenciam por sua localização regional. O estudo feito por Rodrigues da Silva Enríquez (2009), verificou uma forte associação entre a idade da mina, o seu potencial de impacto ambiental e a localização geográfica. As minas mais antigas têm muito mais passivos, não somente por causa da idade, mas, principalmente, pelo descaso com o meio ambiente. As minas mais jovens, via de regra, já nascem incorporando princípios de gestão ambiental e, portanto, têm menor potencial de gerar passivos ambientais graves. A tendência histórica da atividade mineradora no Brasil é se expandir para a região Norte, cujo território está ainda pouco explorado. Muitas das minas das regiões Sudeste e Sul já estão em fase de esgotamento. No

entanto, os crescentes preços de commodities minerais vêm alcançando nos últimos anos, tem permitido o aumento da vida útil da mineração nessas regiões (RODRIGUES DA SILVA ENRÍQUEZ, 2009).

4.3 Acidentes na Indústria da Mineração

A mineração pode causar impactos sérios, às vezes, irreversíveis, ao meio ambiente – desde a água, o ar, o solo e seres vivos – e à vida das pessoas que vivem próximas à região em que está localizada, ou diretamente àqueles que trabalham para ela, alguns nunca relatados oficialmente. Na presente revisão bibliográfica destaca-se os principais acidentes ocorridos mundialmente:

- Honkeiko, China (1942): país com maior número de acidentes na mineração de carvão, este episódio matou cerca de 1.600 pessoas e deixou suspensa uma grande quantidade de pó de carvão pela região (LOPES, 2016);
- Chasnala, Índia (1975): mina de carvão explodiu e sete milhões de litros inundam a caverna com 372 mortos (ASHUTOSH, 2012);
- Romênia (2000): substância utilizada para purificar metais preciosos, o cianeto vazou e contaminou os rios próximos a região de Baia Mare com metais tóxicos (BUCHAREST et al., 2000);
- Minas Gerais, Brasil (2007): vazamento de lama tóxica pela Mineradora Rio Pomba Cataguazes, atingiu cidades de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, deixando grande número de famílias desabrigadas, com dois bilhões de litros de resíduos contaminados de bauxita(LOPES, 2016).

- Istambul (2014): incêndio em mineradora de carvão mata 245 trabalhadores e deixa escapar alta concentração de monóxido de carbono no ar ("Explosão de mina de carvão mata centenas de trabalhadores na Turquia", 2014);
- Minas Gerais, Brasil (2015): rompimento de uma barragem da mineradora Samarco, devastando o distrito de Bento Rodrigues, causando impactos ambientais irreversíveis (SANTOS, 2016).

4.4 Canaã dos Carajás

Canaã dos Carajás, no Sudeste do estado do Pará, distante 760 km da capital, com uma área de 3.053,85 km², tem a origem de seu nome na Bíblia, e significa "Terra Prometida". Sua população iniciou-se nos anos 80 devido a um assentamento agrícola, era distrito de Parauapebas, do qual se emancipou em outubro de 1994. Canaã está localizada na região de Carajás, na microrregião de Parauapebas, em um território formado por seis municípios, que integram um "arco imaginário" da mineração, conforme Figura 1 a seguir.

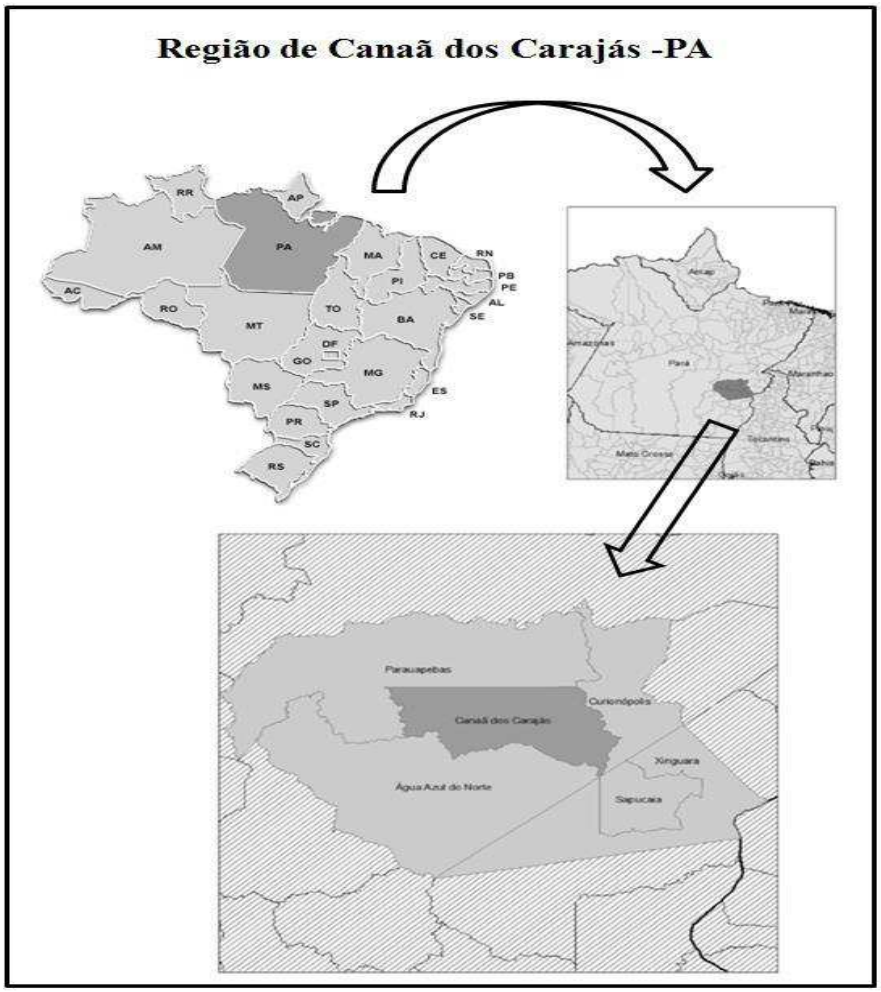


Figura 1 Canaã dos Carajás e município do entorno. Fonte: Adaptado de IBGE (www.ibge.gov.br).

Sua economia é baseada em agricultura e pecuária (SOUZA *et. al*., 2010). As grandes mudanças aconteceram em função da exploração comercial de Minério de cobre pela Cia Vale do Rio Doce a partir de julho de 2003. Instalando-se no município a partir de então, a Vale, como é hoje conhecida, impulsionou Canaã dos Carajás que atualmente apresenta um grande crescimento tanto econômico quanto demográfico (DUARTE *et al.,*2008).

> *"Para se ter uma ideia do que representa o município em termos potenciais, ali existem minas de diamantes, bauxita, níquel vermelho, cobre e ouro. " (DUARTE et al.,2008).*

Um dos motivos que levou a imigração desta população para este município foi a busca por melhores condições de vida, a busca por emprego. As estratégias de territorialidades, que

os atores sociais consolidam no território paraense, originaram uma rede de relações sociais que tornaram suas relações de poder mais solidificadas. Nesse contexto, as estratégias territoriais e o conjunto de atores sociais são indutores para que os recortes espaciais precisem considerar as particularidades sociais econômicas das sociedades historicamente excluídas do poder de decisão(SOUZA, 2010).

4.5 Metais tóxicos

São considerados metais tóxicos os elementos químicos com massa atômica maior que 22 e densidade superior a $6g/cm^3$ (ALLOWAY, 1995). Dentre os principais metais associados à contaminação do meio ambiente que oferecem perigo potencial ao ecossistema estão: cobre (Cu), zinco (Zn), prata (Ag), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), estrôncio (Sr), césio (Cs), cobalto (Co), níquel (Ni), tálio (Tl), estanho (Si) e vanádio (V) (SZE; LU; WONG, 1996; WANG; CHEN, 2006).

Os metais também são imprescindíveis para a vida, atuando como micronutrientes para organismos vivos e também usados em pesticidas para a agricultura (Cu e Zn); Ag, na fabricação de fármacos para tratamentos de queimaduras; Pb, na produção de baterias, pigmentos e aditivos para o petróleo; Hg, para fabricação de equipamentos elétricos, tintas, termômetros, fungicidas, cosméticos e na extração do ouro; As, na produção de conservantes de madeira e pesticidas; Cd, um inevitável subproduto da extração de Zn, é muito empregado na fabricação de equipamentos eletrônicos, pigmentos (amarelo e vermelho), baterias e como estabilizante de plásticos; Cr, presente nos efluentes das indústrias de couro, tintas, têxtil e fertilizantes; Sr e Cs são manipulados em indústrias nucleares (ROANE; JOSEPHSON; PEPPER, 2001; ADAMIS et al., 2003; JÄRUP, 2003; WANG; CHEN, 2006).

Além disso, atualmente, cresce assustadoramente o chamado “lixo tecnológico”, tais como televisores, celulares, pilhas e componentes de informática que acabam sendo descartados, como resultado da troca por modelos mais novos e sofisticados. O problema é que tais equipamentos contêm muitas substâncias perigosas e tóxicas, principalmente metais tóxicos que, se não forem corretamente descartados, atingem lençóis freáticos e solos, contaminando o ambiente e suscitando sérias preocupações sobre o manejo desta nova forma de lixo (BABU; PARANDE; BASHA, 2007).

A contaminação de efluentes por metais tóxicos é motivo de preocupação por promover severos distúrbios aos organismos e ecossistemas. A poluição do meio ambiente por metais tóxicos é decorrente, em sua maior parte, das atividades antropogênicas produtoras de resíduos que, via de regra, são descartados diretamente em ambientes aquáticos ou no solo sem prévio tratamento. Esta disposição direta provoca o acúmulo de metais tóxicos e causa perdas econômicas, de biodiversidade, além de sérios riscos à saúde pública.

Existe um fluxo reverso de logística, do ponto de consumo até o ponto de origem, que precisa ser gerenciado. Há uma clara tendência de que a legislação ambiental caminhe no sentido de tornar as empresas cada vez mais responsáveis por todo ciclo de vida de seus produtos. Isto significa ser legalmente responsável pelo seu destino após a entrega dos produtos aos clientes e do impacto que estes produzem no meio ambiente(LACERDA, 2011). As iniciativas relacionadas à logística reversa têm trazido consideráveis retornos para as empresas. As mineradoras possuem grande potencial em lucrar com esta ferramenta, pois o mesmo metal responsável pela contaminação de rios e lagos, se retirado do meio ambiente através de técnicas viáveis ambiental e economicamente (como a adsorção proposta neste trabalho), tem grande valor de mercado, e pode transformar lagoas de rejeitos em fonte de matéria prima.

Dentre os metais tóxicos existentes, este trabalho estudou a adsorção de 3 deles: o Cobre (por ser o principal metal encontrado na Mina do Sossego), o Cádmio e o Níquel (pela grande aplicabilidade destes metais em baterias NiCd, sua toxicidade ao meio ambiente e pelo seu alto valor de mercado).

4.5.1 Níquel

Níquel é um metal que ocorre no solo, água, ar e na biosfera (HERTEL; MAASS; MÜLLER, 1991). O níquel, que é emitido para o ambiente através de processos naturais e antrópicos, é circulado por todos os compartimentos ambientais através de processos físicos e químicos e é transportado biologicamente por organismos vivos. As fontes primárias de emissão de níquel para o ambiente são: combustão de carvão e ó1eo para aquecimento ou geração de energia; incineração de resíduos e lodo de esgotos, mineração e produção primária de níquel, manufatura do aço, e outros (HERTEL; MAASS; MÜLLER, 1991).

O níquel é um dos mais importantes metais de adição às ligas, sejam ferrosas, sejam não-ferrosas em razão de suas propriedades - alta resistência à corrosão e oxidação, moderada condutividade elétrica e térmica, elevada resistência e tenacidade a altas temperaturas -, (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2007).

No mundo atual, o níquel é empregado em uma grande variedade de produtos dos setores de bens de consumo duráveis, industrial, militar, transporte, aeroespacial, marítimo, e aplicações arquitetônicas. O níquel é aplicado eletroliticamente como fina cobertura ao aço, no processo conhecido como niquelagem, se fazendo presente nos utensílios domésticos e em inúmeros outros artigos do dia a dia do homem moderno (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2007). Mas a maior parte do uso do níquel é como elemento de liga com o cromo e outros metais nos aços inoxidáveis. A indústria de aço inoxidável é a principal consumidora do níquel, sendo responsável por cerca de 62% do níquel consumido no mundo. O restante é usado na fabricação de ligas ferrosas e não-ferrosas, baterias, niquelagem, etc. A Figura 2 mostra a distribuição do consumo global do níquel, em 2006, de acordo com a Vale.

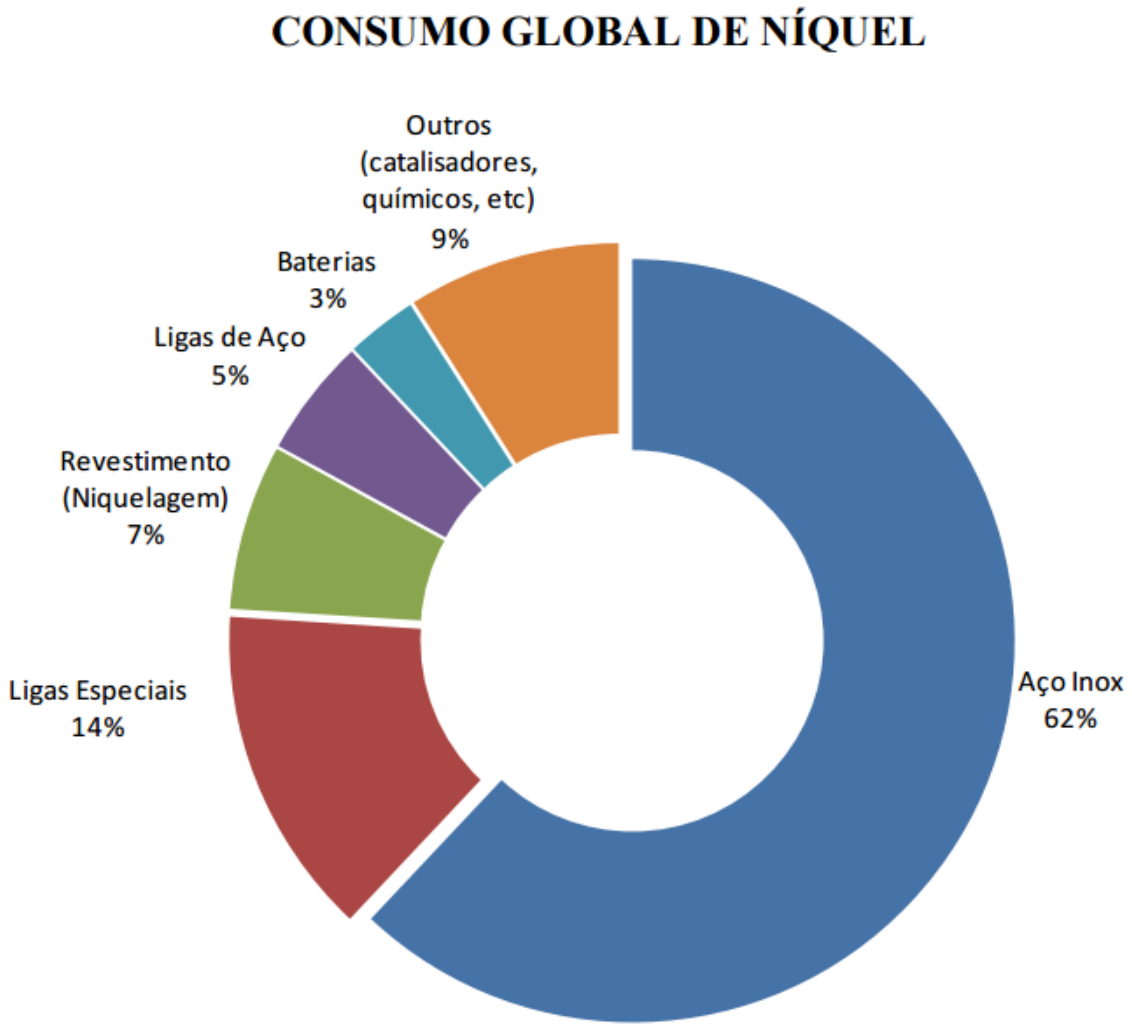


Figura 2 Distribuição do consumo global do níquel de acordo com a Vale. FONTE: Ministério de Minas e Energia (2007)

Nos rios e lagos o níquel é transportado principalmente na forma aderida à superfície das partículas e em associação com matéria orgânica. Dependendo do tipo de solo, o níquel pode apresentar uma alta mobilidade dentro do perfil do solo e finalmente alcançar a água subterrânea e a água superficial de rios e lagos (HERTEL; MAASS; MÜLLER, 1991).

O níquel pode ser absorvido por seres humanos e animais pelo pulmão, ingestão ou pela pele e está diretamente relacionado à solubilidade de seus compostos (FELLER, 2014). A exposição dérmica ao níquel é importante devido à indução e manutenção de reação alérgica produzida em indivíduos hipersensíveis causada por contato diário da pele com objetos

niquelados ou ligas que contenham níquel, por exemplo: joias, moedas, clips, e outros (HERTEL; MAASS; MÜLLER, 1991).

A maior acumulação de níquel ocorre nos rins, glândulas endócrinas, pulmões e fígado, quando a administração de sais de níquel é via parenteral. Efeitos crônicos como as rinites, sinusites, perfuração do septo nasal, asma, fibrose pulmonar, displasia nasal, tem sido relatados por exposição de trabalhadores via inalação, além de alergia, conjuntivite, e irritação pulmonar crônica (HERTEL; MAASS; MÜLLER, 1991). A hipersensibilidade por contato com níquel, por exposição ocupacional ou da população em geral a compostos solúveis do metal, resulta em eczema nas mãos e em diversas partes do corpo, mesmo que não tenha tido contato direto com o metal além de sensação de queimação e irritações na pele(FELLER, 2014). O níquel já teve sua confirmação como agente carcinogênico para o homem (FELLER, 2014) apresentando alto risco de provocar câncer do pulmão e câncer nasal, enquanto que câncer renal, gástrico, ou da próstata e sarcomas em tecidos têm sido relatados apenas em trabalhadores envolvidos com o metal

As plantas terrestres absorvem o níquel do solo, principalmente através das raízes, fato que ocorre em função de vários parâmetros geoquímicos e físicos, incluindo o tipo de solo, seu pH e umidade, o conteúdo de matéria orgânica e a quantidade de níquel disponível. Níveis de níquel acima de 50 mg/kg (peso seco) são tóxicos para muitas plantas e é possível observar a bioacumulação e os efeitos tóxicos em vegetais que crescem tanto em solos de locais de tratamento de lodo de esgoto quanto em vegetação próximas à estas fontes de emissão de níquel (HERTEL; MAASS; MÜLLER, 1991).

4.5.2 Cádmio

O cádmio (Cd) é um elemento metálico pertencente ao grupo 12 da tabela periódica, juntamente com zinco e mercúrio, de número atômico 48 e massa atômica 112,4 g. Raramente é encontrado em estado puro, ou seja, quase sempre está presente em vários tipos de rochas e solos e na água, bem como no carvão e no petróleo. Entre estas fontes naturais, zinco, chumbo, e minério de cobre são as principais fontes de cádmio (DOBSON, 1992).

O grande uso das baterias de níquel-cádmio (NiCd) contribuíram para um aumento significativo da contaminação ambiental a partir dos anos 40. Outros usos industriais do cádmio como a indústria de pigmentos, reagentes para a fabricação de plásticos, soldagens de juntas e de placas de circuitos eletrônicos, atividades de mineração de cobre, níquel e zinco, produção de fertilizantes e a queima de combustíveis fósseis também contribuíram para esta contaminação (GUIMARÃES et al., 2008).

A porta de entrada do Cd na cadeia alimentar são as plantas. Diferente de outros metais tóxicos, o Cd no solo é mais facilmente absorvido pelas raízes das plantas, sendo este fenômeno mais pronunciado em solos ácidos (GUIMARÃES et al., 2008). O cádmio e seus compostos são considerados muito perigosos ao meio ambiente e ao homem pois se acumulam na cadeia alimentar e promovem danos irreversíveis à saúde humana. O cádmio foi classificado pela "*International Register of Potentially Toxic Chemical of USA"* como espécie química altamente perigosa ao planeta e está entre os produtos químicos mais tóxicos, persistentes e acumulativos que existe (CARDOSO; CHASIN, 2001).

O homem se expõe a contaminação de Cd através da ingestão de produtos agrícolas ou hortícolas. Tal metal provocam lesões no sistema renal, respiratório, cardiovascular, hematológico, esquelético, digestivo e hepático. Diversos trabalhos na literatura citam altas concentrações de Cd encontradas nos rins, em níveis maiores do que aqueles encontrados nos alimentos ingeridos, caracterizando um processo de acumulação de Cd no corpo humano, processo presente também em outros animais (GUIMARÃES et al., 2008), o trabalho feito por Johri, Jacquillet & Unwin (2010) relaciona a exposição ao Cd com o desenvolvimento de

insuficiência renal e outras doenças como hipertensão e diabetes. Já Thévenod (2003) estudou a nefrotoxicidade causada pelo cádmio, que pode causar a Síndrome de Falconi.

Na literatura, há alguns procedimentos descritos para a remoção de Cd^{+2} contido em corpos d'água, através do emprego de plantas aquáticas do tipo aguapé (OLIVEIRA et al., 2001) , bagaço de cana de açúcar e serragem (ALBERTINI; CARMO; PRADO FILHO, 2001), leveduras da classe *Saccharomyces cerevisiae* (ALBERTINI; CARMO; PRADO FILHO, 2001; MARIANO-DA-SILVA; BASSO, 2004), vinhaça (MARIANO-DA-SILVA; BASSO, 2004) e micro-organismos da família *Pseudomonas aeruginosa* (ADAMIS et al., 2003; SINHA; MUKHERJEE, 2009).

4.5.3 Cobre

O cobre é considerado um metal de transição, e pertence ao grupo 11 da tabela periódica, possui número atômico 29 (29 prótons e 29 elétrons) e massa atômica de 63,54 g. A temperatura ambiente o cobre encontra-se no estado sólido, é um dos metais mais importantes industrialmente, de coloração avermelhada, maleável e bom condutor de eletricidade. (ANDREAZZA et al., 2013).

O cobre é um elemento essencial a todos os seres vivos, inclusive aos humanos, pois atua como cofator de uma série de metaloenzimas envolvidas na formação da hemoglobina e no metabolismo de carboidratos, xenobióticos e drogas, bem como nos mecanismos de prevenção a oxidação celular (ATSDR, 2004). O cobre é um dos metais cuja concentração é controlada pela legislação brasileira nos efluentes, o qual se situa em um limite de 1 mg L^{-1} (CONAMA, 2011).

O cobre é um ótimo condutor, e tem como principal aplicação a transmissão de energia (DNPM, 2015). Por isso é muito usado nos setores elétrico e da construção civil (responsáveis

pela maioria do consumo mundial de cobre) o metal também tem outras diversas aplicações em componentes de bens de consumo. A Figura 3 mostra a distribuição percentual do consumo do cobre por setor no mundo.

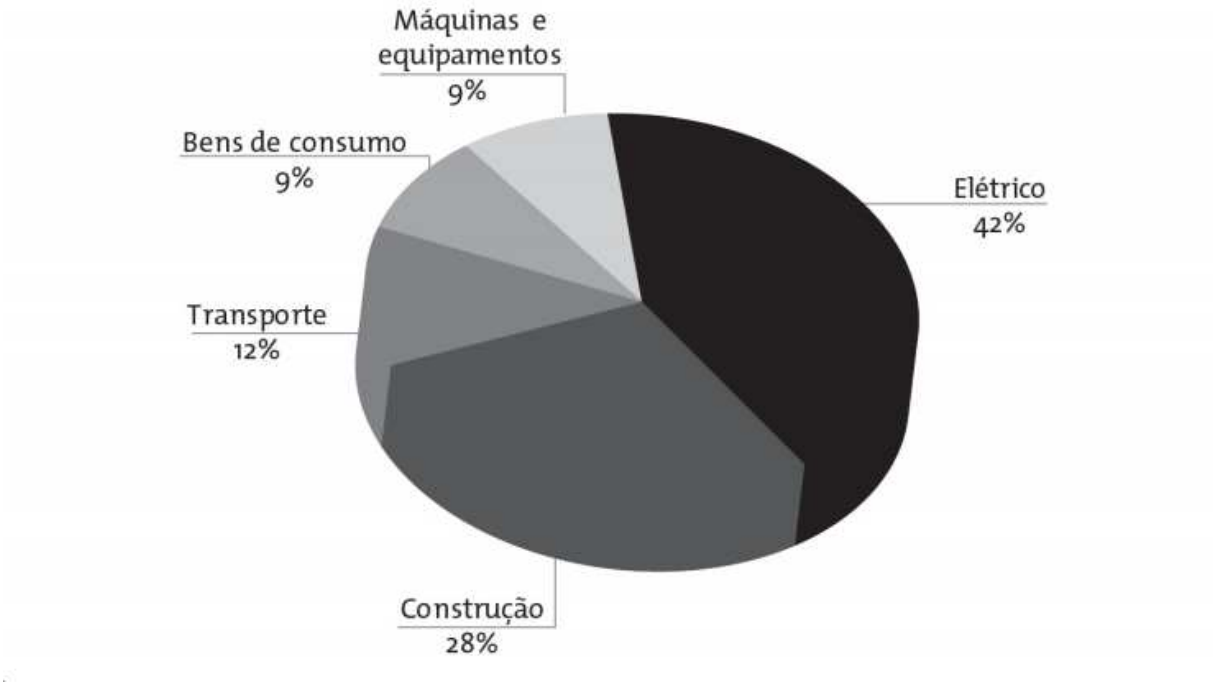


Figura 3 Gráfico do consumo de cobre no mundo. Fonte: CRU GROUP (2011).

Em 2013, a indústria brasileira do cobre, incluindo a de concentrado, de refinado, de semimanufaturados e o de condutores elétricos, apresentou em 2013, segundo o SINDICEL/ABC, faturamento de US$ 17,53 bilhões e 24.230 postos diretos de trabalho, devido ao aumento da utilização do metal em território nacional por conta das obras de infraestrutura para Copa do Mundo (DNPM, 2015).

4.5.3.1 Toxicologia do cobre

O cobre é um metal essencial necessário como elemento-traço nos processos fisiológicos e bioquímicos (LEHNINGER; COX, 2011). Nos animais, o cobre, atua participando de processos fisiológicos, como, por exemplo: 1) na cadeia respiratória, fazendo parte do complexo citocromo oxidase (MURRAY et al., 1988; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; LEHNINGER; COX, 2011); 2) para síntese de hemoglobina, o cobre é um constituinte de eritrocupreína no eritrócito (revisto por SORENSEN, 1991); 3) no aproveitamento adequado do ferro; 4) na síntese do colágeno e da elastina; e 5) está presente no centro ativo da lisil oxidase, enzima que produz interligações entre as cadeias polipeptídicas (LEHNINGER; COX, 2011). Contudo, quando em altas concentrações e por períodos prolongados de exposição, esse elemento-traço apresenta efeito tóxico, podendo causar a morte. A Figura 4 mostra um esquema simplificado da circulação geral do metal no corpo.

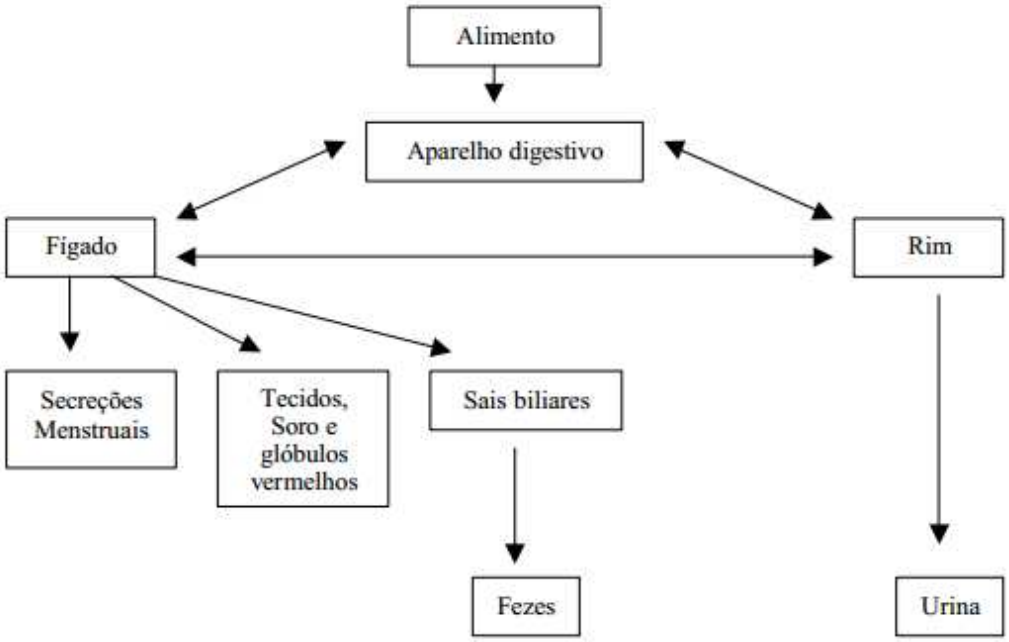


Figura 4 Esquema simplificado da circulação geral do cobre no corpo humano (AZEVEDO et al., 2003) modificado de SARGENTELLI; MAURO; MASSABNI (1996).

O alimento que contém cobre é digerido no aparelho digestivo do indivíduo, o cobre assimilado é, então, distribuído para os tecidos, plasma, glóbulos e fígado. Esse processo é chamado de fluxo normal de cobre (AZEVEDO et al., 2003). Pequenas mudanças podem ser desprezíveis e não leva a maiores complicações. Todavia, grandes alterações podem provocar graves distúrbios e até doenças. Essas últimas podem ser decorrentes tanto do excesso como também da falta de cobre, causando a hiper e hipocupremia, respectivamente. A mais conhecida enfermidade decorrente dos distúrbios do metabolismo do cobre é a degeneração hepatolenticular ou doença de Wilson que, à primeira vista, parece tratar-se de um caso de hipercupremia. Os sintomas apresentados pelos pacientes são: peso do lado direito do corpo (dilatação da cápsula do fígado), dores ao correr e andar (alterações musculares), mudança na cor da pele para amarela (alteração da função bioquímica do fígado), e tremores fortes nos dedos (alterações nervosas) (SARGENTELLI; MAURO; MASSABNI, 1996). Segundo Bezerra (1995), os sintomas da doença de Wilson caracterizam-se pela precipitação do metal nas córneas e pela destruição do fígado e do tecido nervoso.

O metabolismo do cobre pode ser considerado como um fator de risco. Segundo WAGGONER *et al.* (1999), o cobre está associado a doenças neurodegenerativas, como: doenças de Menkes, doenças de Wilson, aceruloplasminemia, esclerose e doença de Alzheimer.

4.5.3.2 A importância do cobre para a economia

Por ser um ótimo condutor, o cobre tem como principal aplicação a transmissão de energia. Assim, além de muito usado nos setores elétrico e da construção civil, responsáveis por 60 % do consumo mundial de cobre, o metal tem diversas aplicações em componentes de bens de consumo, de máquinas e equipamentos e de meios de transporte.

O estado do Pará possui as maiores reservas de minério de cobre do Brasil, localizadas no distrito de Carajás, em Marabá, apresentando uma quantidade total de 853.140.341 t. As reservas somam 618.108.992 t, com teor médio de 0,93% de cobre, correspondendo a 5.767.411 t de cobre (DPNM, 2001).

O Brasil mostra-se bastante competitivo na mineração do cobre, apesar dos custos de processamento da fase metálica serem pouco competitivos no país. A atualização tecnológica das empresas associadas às economias de escala podem acarretar uma redução significativa dos custos médios unitários, e estes, quando somados aos baixos custos da mineração, podem levar a um grande aumento da competitividade da indústria de cobre (ROCIO et al., 2012). Contudo, também é necessário repensar, política e economicamente, os territórios paraenses e inovar na inclusão de outros canais de participação das sociedades nas formas de desenvolvimento e na produção de tecnologias próprias do local (SOUZA, 2010).

4.5.3.3 O cobre em organismos e mecanismos de resistência

A interação entre micro-organismos e metais tóxicos vem ocorrendo desde o início da vida no planeta, há 4 bilhões de anos, o que permitiu a evolução de sistemas biológicos de resistência permitindo a sobrevivência em ambientes contendo elevadas concentrações de metais (VALLS; DE LORENZO, 2002a; SILVER; PHUNG, 2005).

A estrutura complexa dos micro-organismos pode implicar em muitas maneiras de biossorção do metal. Existem diferentes mecanismos de biossorção e eles ainda não são totalmente compreendidos. Segundo Perpetuo et al. (2011), eles podem ser classificados de acordo com vários critérios (Figura 5). O transporte de metal através da membrana celular produz um acúmulo intracelular, que é dependente do metabolismo da célula, o qual reage na presença de um metal tóxico. Enquanto que na biossorção não-dependente do metabolismo, a

adsorção de metais ocorre por meio da interação físico-química entre o metal e os grupos funcionais presentes na superfície da célula microbiana, ou seja, o processo é baseado em adsorção física, troca iônica ou sorção química. Tais mecanismos também podem ser classificados quanto ao meio, podendo ser: intracelular, extracelular ou na membrana da célula (PERPETUO et al, 2011).

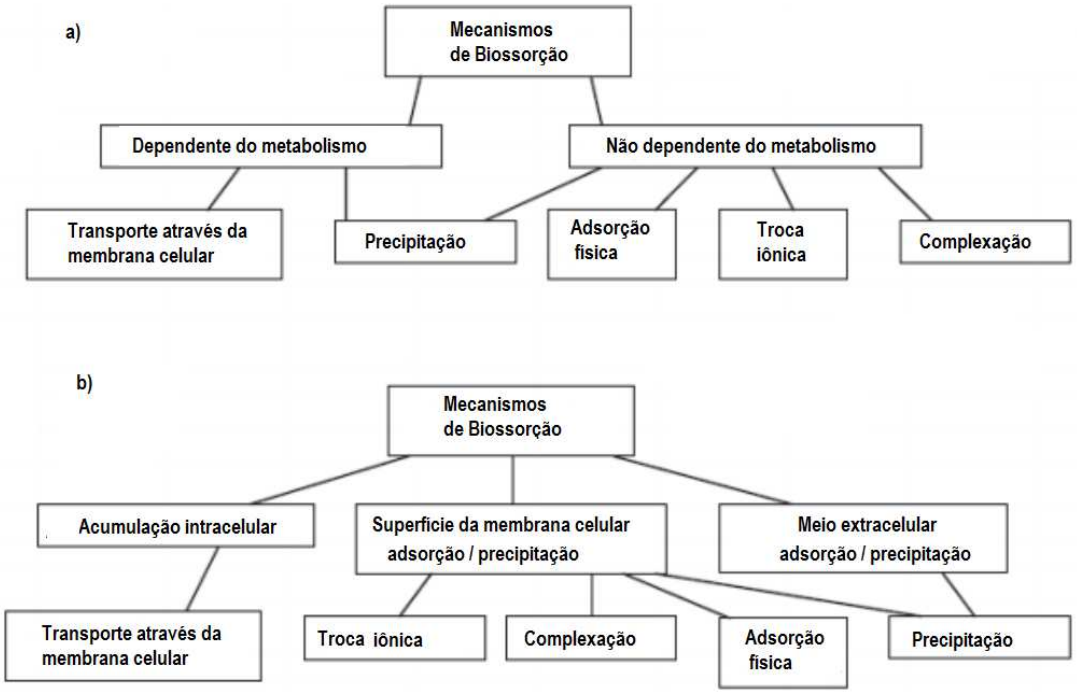


Figura 5 Mecanismos de biossorção a) Classificação de acordo com a dependência do metabolismo celular, b) a classificação de acordo com a localização do metal removido no interior da célula (VEGLIÒ E BEOLCHINI APUD PERPETUO ET AL, 2011).

4.6 Técnicas de Tratamento de Resíduos

4.6.1 A Biorremediação como técnica de reaproveitamento de rejeitos

Atualmente, o tratamento mais comum para sítios contaminados é realizado por tecnologias convencionais baseadas em princípios físico-químicos, as quais podem ser ineficientes e economicamente inviáveis. Por outro lado, a biorremediação vem ganhando cada vez mais importância, devido às vantagens que oferece, tais como: simplicidade, eficiência e baixo custo (DAVIS; VOLESKY; VIEIRA, 2000; LAZARIDIS; JEKEL; ZOUBOULIS, 2003).

Métodos alternativos, como o emprego de micro-organismos e plantas para a retirada de metais de águas de rios e aterros, apresentam baixos custos e alta eficiência e, portanto, são mais atrativos do que métodos físico-químicos (MACASKIE, 1990; GADD, 1992; WATANABE, 1997). O processo pelo qual estes organismos vivos são utilizados para remover ou reduzir poluentes no ambiente é conhecido como biorremediação (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005).

A biorremediação pode ser realizada tanto com organismos selvagens como geneticamente modificados. Neste sentido, ferramentas moleculares, como a construção de micro-organismos geneticamente modificados (OGM), têm sido desenvolvidas para a transformação de contaminantes ambientais, com o intuito de aumentar a eficiência destas novas cepas. No entanto, estas modificações genéticas devem ser entendidas na íntegra e qualquer investigação deve sempre determinar os riscos reais e benefícios envolvidos, pois antes de liberar um OGM no meio ambiente, os pesquisadores devem enfatizar as responsabilidades éticas a serem consideradas antes de usar essas novas estratégias para biorremediação (PERPETUO; BARBIERI; OLLER NASCIMENTO, 2011). Estes micro-

organismos podem apresentar defasagem de eficiência quando comparados aos OGMs, porém são mais fáceis, do ponto de vista burocrático, de utilizar em ambientes abertos por serem micro-organismos existentes na natureza sem nenhuma modificação genética realizada em laboratório. Portanto, seu uso apresentaria menos riscos ao meio ambiente

Segundo Perpetuo et. al (2011), a técnica da biorremediação é uma alternativa viável para a recuperação de áreas contaminadas por metais tóxicos, porém para que ela seja efetiva faz se necessário o isolamento de micro-organismos resistentes e eficazes na remoção do metal, e que também apresentem características favoráveis ao processo, como a possibilidade de concentração destes metais para posterior reaproveitamento. A versatilidade metabólica natural microbiana, decorrente de sua enorme diversidade genética, pode ser empregada para a diminuição da biodisponibilidade destes contaminantes, e posterior reutilização, até sua eventual reintegração aos ciclos biogeoquímicos naturais (GAVRILESCU, 2004).

Como citado anteriormente, a biorremediação pode se dar também através de micro-organismos selvagens capazes de imobilizar metais tóxicos, por simples adsorção em sua superfície celular, promovendo sua precipitação, ou por processos de formação de complexos intracelulares (DIELS; VAN DER LELIE; BASTIAENS, 2002; VALLS; DE LORENZO, 2002b). Uma considerável variedade de fungos, algas e bactérias têm sido estudada e utilizada como biosorvente para biorremediação de efluentes contendo metais pesados (MACASKIE & DEAN apud BIONDO, 2008).

Sendo que a água tende a tornar-se escassa, e que tem papel fundamental na vida do homem e no equilíbrio da biodiversidade, desenvolver metodologias para tratar efluentes contaminados é uma iniciativa indispensável para a sustentabilidade do planeta.

4.6.1.1 Uso de bactérias para a remediação de cobre

Os micro-organismos necessitam do cobre em pequenas quantidades, mas em grandes quantidades o metal é extremamente tóxico. Os organismos desenvolveram mecanismos de resistência para resolver este problema e sobreviver em ambientes, tanto limitantes em cobre, como em concentrações tóxicas às células.

Quatro genes arranjados no *operon cop* são responsáveis pela homeostase das células procarióticas. Este *operon* possui um sistema de regulação gênica que é expresso em função da quantidade de cobre na célula. O gene *copA* capta o cobre quando limitante e transporta para o citoplasma, ao passo que o gene *copB* remove o cobre de dentro das células quando este atinge concentrações tóxicas (ANDREAZZA *et al.,* 2013). O gene *copY* é o gene repressor, e *copZ* ativador, os quais regulam a concentração de cobre na célula (SOLIOZ E STOYANOV, 2003). O mecanismo de proteção das células ao cobre é feito pelo gene *copY* que reprime as ATPases *copA* e *copB*, diminuindo o transporte deste elemento para o citoplasma, evitando a morte celular pela exposição a concentrações tóxicas de cobre (Figura 6).

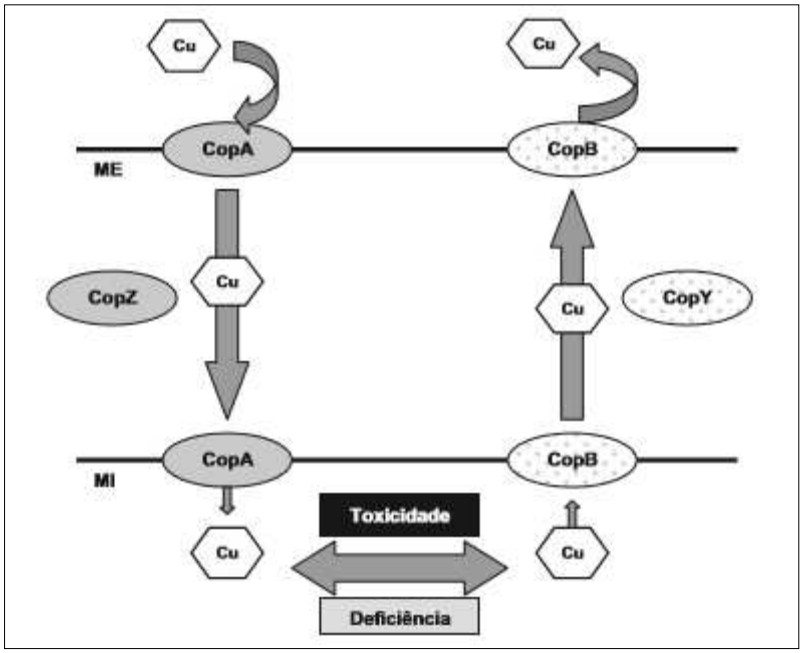


Figura 6 Transporte de cobre em procariotos (Gram-negativos) (ANDREAZZA *et al*., 2013). Membrana externa (ME), membrana interna (MI).

O cobre só pode ser transportado pelas ATPases quando está na forma reduzida Cu (I), e deste modo, as células necessitam de enzimas como a cobre redutase para reduzir o Cu (II), disponibilizando o cobre para o transporte intracelular (SOLIOZ E STOYANOV, 2003).

A atividade das metalotioneínas e chaperonas também podem controlar a homeostase do cobre celular, que retém o íon cobre não-livre no citosol (ARREDONDO E NÚÑEZ, 2005). Bactérias podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência ao cobre, tanto no cromossomo como em plasmídeos através de genes de resistência a concentrações tóxicas de cobre. Estes mecanismos também incluem a redução do transporte do cobre, complexação pelos componentes celulares e acúmulo de concentrações de cobre internamente na célula (ANDREAZZA *et al.,* 2013).

Os fungos também desenvolveram vários mecanismos de resistência ao cobre, similar às bactérias, como engrossamento da parede celular, a redução de citosina e quitina e o aumento da proporção de metalotioneínas.

4.7 Técnicas de Identificação de bactérias

Como já mencionado, há muitos microrganismos com potencial para a aplicação em biotecnologia ambiental. Microrganismos isolados de diversos ambientes, como solo e água, já vem sendo estudados para utilização em diversas atividades em prol do meio ambiente (AVANZI et al., 2015). No entanto, existe grande necessidade de se identificar esses microrganismos, não apenas para evitar a aplicação de organismos patogênicos em bioprocessos, mas também para conhecer melhor suas características e metabolismo a fim de potencializar suas possíveis aplicações.

A identificação de isolados bacterianos pode ser realizada empregando-se diversos métodos. Além das técnicas de microbiologia básica (análise da morfologia ou das provas bioquímicas) e das metodologias de genética clássica, como a utilização de métodos moleculares (PACE, 1997), recentemente, uma nova técnica denominada MALDI-TOF vem sendo amplamente utilizada para a identificação de microrganismos. Esta técnica consiste na aplicação de métodos físico-químicos, como a espectrometria de massa com processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz e análise de tempo de voo das proteínas ribossomais envolvidas no processo de identificação da microbiota ("Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight¨ – MALDI-TOF).

4.7.1 Identificação molecular clássica - Sequenciamento do gene 16S

O termo diversidade para a biologia é geralmente utilizado para descrever o número de espécies presentes em um habitat. Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de sequências de DNA encontradas no ambiente (LIESACK et al., 1997).

A análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido empregada para a classificação de microrganismos. Um exemplo dessas macromoléculas é o DNA ribossomal, essencial para a sobrevivência dos organismos, e altamente conservado entre as bactérias. O sequenciamento do gene do DNA ribossomal 16S tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética (BECKER et al., 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (NOLTE; CALIENDO, 2003).

O gene 16S do DNA ribossomal é uma das regiões mais conservadas no DNA das bactérias, apresentando cerca de 1500 pares de bases. O 16S rDNA tem sido utilizado como

marcador molecular, permitindo a identificação destes microrganismos ou pelo menos um conhecimento filogenético destes, possibilitando averiguar sua procedência e estabelecer relações entre eles(DESANTIS et al., 2006).

Apesar do gene codificador do 16S rDNA apresentar regiões não tão conservadas do DNA (denominadas de V1 a V9), cujas sequências se alteram com o decorrer da evolução, esta característica faz com que haja diferenciação entre as diferentes espécies, pois também apresenta diversas regiões altamente conservadas. A partir das sequências conservadas, é possível desenhar oligonucleotídeos iniciadores "*primers*" universais para amplificar este gene (CHAKRAVORTY et al., 2007; PETTI, 2007).

As sequências de 16S rDNA são utilizadas como padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013). O gene codificador do 16S rDNA tem sido amplamente utilizado devido ao fato dele apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal: possui uma distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os táxons e um tamanho grande o suficiente que permita o aparecimento de divergências na sequência, permitindo assim a identificação de bactérias de forma reprodutível e confiável.

Por fim, o grande número de sequências de 16S rDNA disponíveis atualmente (mais de 3.224.600 sequências segundo o Ribosomal Database Project-II http://rdp.cme.msu.edu), favorece ainda mais o uso desse gene como marcador molecular filogenético por permitir uma vasta gama de comparações. O aperfeiçoamento dos métodos de extração de DNA de amostras ambientais, PCR, clonagem e sequenciamento permitiu a exploração dos mais variados tipos de ambientes e o desenvolvimento de diversos trabalhos e análises baseados no 16S rDNA.

Apesar de todas as vantagens derivadas do emprego de 16S rDNA para a identificação de procariotos, existem alguns problemas nesta utilização como por exemplo, a recente descoberta que mostrou que 15% das bactérias contém apenas 1 cópia do 16S rDNA e que, em muitos casos, estas cópias não são idênticas, tornando os resultados do sequenciamento impreciso (VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013). Também há alguns gêneros bacterianos muito diversos que reúnem grande número de espécies tornando a identificação baseada apenas nessa sequência muito difícil (MULET; LALUCAT; GARCÍA-VALDÉS, 2010). Devido ao exposto, é entendido que se faz necessário analisar as sequências de outros genes e analisar outras

características, como suas proteínas e suas necessidades metabólicas para a separação de espécie, porém a metodologia se mostra eficaz na identificação de gêneros bacterianos (PETTI, 2007; KANG et al., 2010).

4.7.2 Padrão Proteico - MALDI Biotyper

A Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e análise de tempo de voo – MALDI-TOF (do inglês Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) – é um método que possibilita a ionização de macromoléculas biológicas, que geralmente são difíceis de serem ionizadas. A ionização é permitida através da irradiação de uma matriz (geralmente um composto orgânico de baixo peso molecular que absorve no comprimento de onda do laser utilizado) misturada à amostra a ser analisada. A técnica consiste basicamente na aceleração de partículas dessorvidas. A matriz absorve os feixes de laser de nitrogênio e converte em energia térmica que aquece rapidamente a amostra, vaporizando-a e ionizando-se por um campo eletromagnético no interior de um tubo com vácuo constante. O tempo de voo das partículas (TOF) é precisamente medido, e baseando-se nessa informação é possível gerar um perfil dos constituintes de uma amostra, o qual se torna tão específico que é denominado de impressão digital ("fingerprinting") de uma espécie (ANDRADE, 2015). Um "software" analisa este perfil e o compara com os existentes em uma base de dados permitindo, assim, a identificação da amostra (Figura 7).

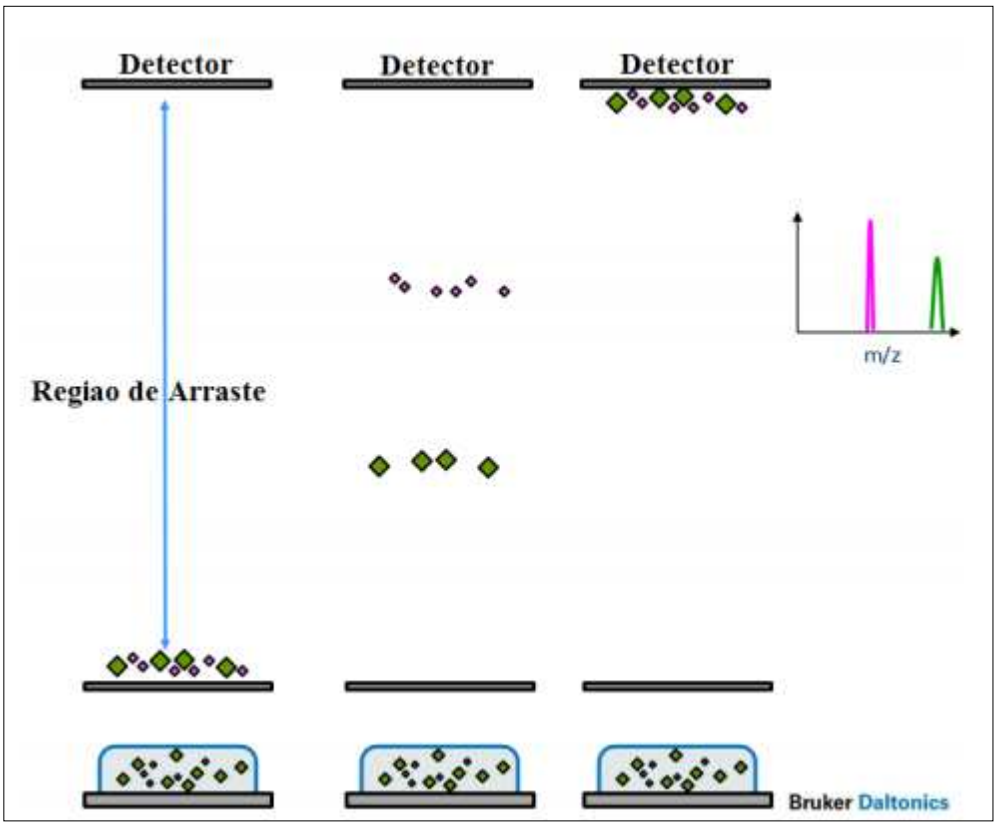


Figura 7 Ionização da amostra, separação por tempo de voo e detecção dos diferentes compostos resultando em um perfil proteico característico de cada amostra (BRUKER, 2013a APUD ANDRADE, 2015).

A capacidade de gerar um espectro baseado na massa e na carga dos componentes proteicos de uma amostra é a principal característica desta amostra. Tal espectro apresenta alta precisão e reprodutibilidade, sendo considerado singular para cada espécie e até mesmo para cada cepa de uma mesma espécie (CARBONNELLE et al., 2011).

A metodologia MALDI-TOF ("espectrometria de massa associada à metodologia de ionização por dessorção a laser assistida por matriz e análise de tempo de voo") vem sendo empregada para a identificação de microrganismos patogênicos em ambientes hospitalares. Esta metodologia é capaz de diferenciar os microrganismos não apenas à nível de gênero e espécie, mas também a nível de cepa, principalmente para amostras de procedência clínica (MURRAY, 2010).

As principais vantagens desta técnica são a rapidez e a simplicidade para a identificação de isolados, uma vez que não é necessário nenhum preparo prévio da amostra, sendo possível utilizar células intactas, como as obtidas em uma colônia isolada recém cultivada sendo o tempo para análise em questão de minutos (HORNIK, 2015). O custo deste tipo de análise também é

bastante reduzido, já que necessita de pequenas quantidades de material. No entanto, esta tecnologia é baseada em bases de dados comercializados, cujas entradas são principalmente de microrganismos de importância clínica, sendo esta uma limitação técnica para a identificação de isolados ambientais (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

5 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de atingirmos o objetivo deste trabalho, o desenho experimental seguiu 3 subseções, assim como mostrado na Figura 8: 1º Isolamento de micro-organismos resistentes ao cobre de amostras ambientais, 2º Identificação e caracterização destes micro-organismos e 3º Experimentos de adsorção dos organismos mais resistentes.

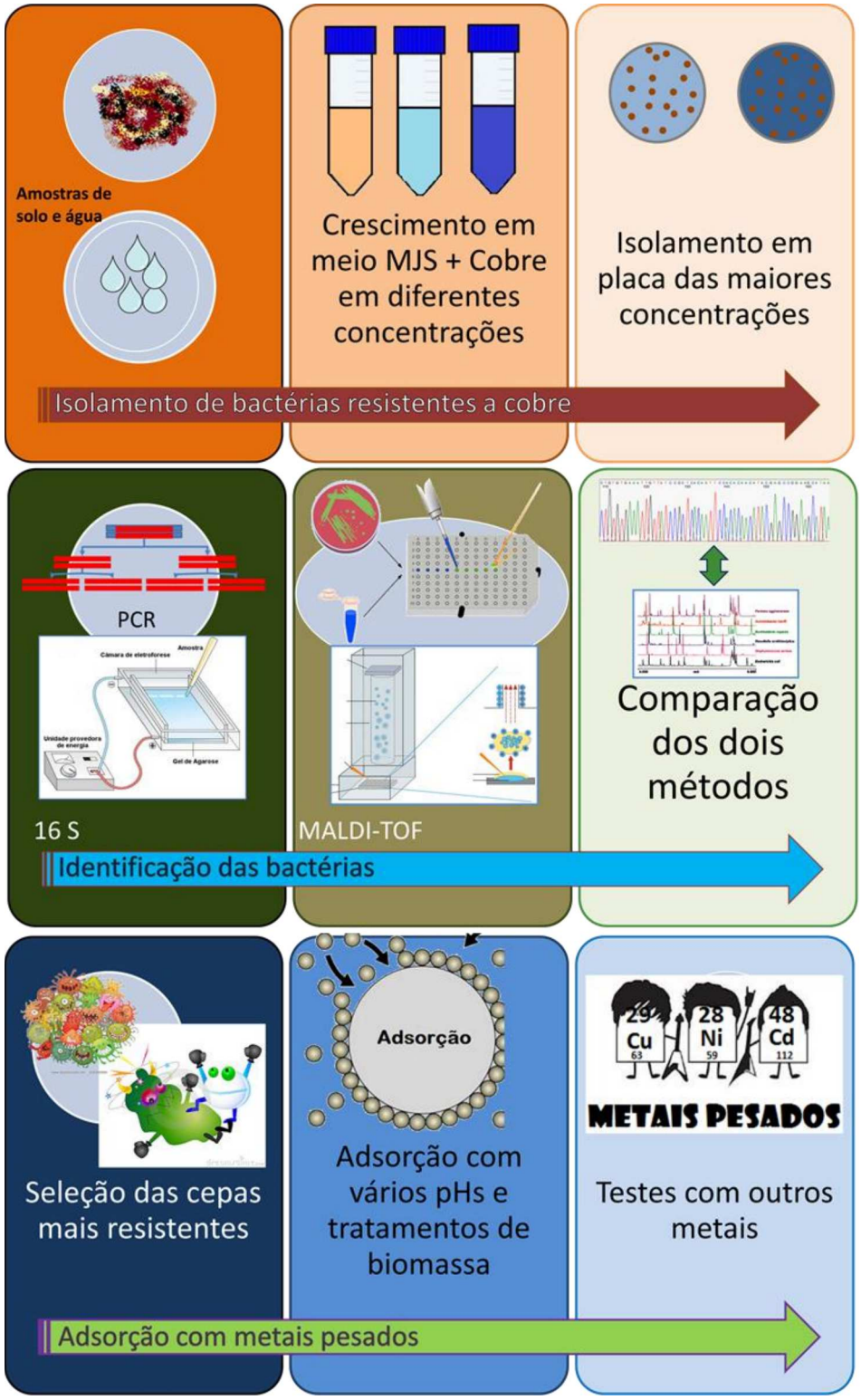


Figura 8 Fluxograma das atividades gerais desenvolvidas em laboratório.

5.1 Coleta de amostras

Ao todo foram feitas 5 coletas em diferentes épocas do ano de 2012, 2013 e 2014 na Mina do Sossego, localizada na Província Mineral de Carajás, em Canaã dos Carajás, sudeste do Pará. 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 (RODRIGUES, 2014). A região possui temperatura média anual de 26 °C e os períodos chuvosos ocorrem, notadamente, de novembro a maio (IDESP, 2012).

As amostras foram coletadas com auxílio de uma espátula, onde tomou-se o cuidado de se retirar a camada mais superficial dos locais, no caso de amostras sólidas. As amostras foram alocadas em tubos de polipropileno de 50 ml sendo preenchidos quase que toda sua totalidade. Pelo menos um tubo foi designado para análise físico-química e um para análise microbiológica, acontecendo de alguns locais terem sido amostrados em maior quantidade.

As amostras líquidas foram retiradas colocando-se o tubo diretamente sob a água evitando-se o contato da água recolhida com as mãos ou outros interferentes que pudessem modificar os resultados das análises posteriores.

Os locais de amostragem foram georeferenciados por GPS (Garmin Mao 60 CSX) e avaliados quanto ao pH do local de coleta (somente das amostras líquidas). Na tabela 1 estão listados os dados de cada amostra.

Tabela 1 - Locais de amostragem georeferenciados por e caracterização de cada amostra uma das cinco coletas. A coleta 1 foi realizada entre os dias 7 e 11 de maio de 2012, a coleta 2 entre os dias 3 e 7 de dezembro de 2012, a coleta 3 entre os dias 18 a 22 de março de 2013, a coleta 4 entre os dias 13 a 17 de maio de 2013 e a coleta 5 entre os dias 18 e 21 de março de 2014.

Coleta	Amostra	Tipo	pH	Latitude	Longitude
1	1	Líquida	10	06° 27' 0.55"S	50° 04'43.7"W
1	1a	Líquida	7	06° 27' 0.94"S	50° 07'47.1"W
1	1b	Sólida	7	06° 27' 0.94"S	50° 07'47.1"W
1	2	Sólida	7	06° 27' 05.1"S	50° 04'57.5"W
1	3	Sólida	7	06° 27' 04.9"S	50° 04'51.2"W
1	4	Sólida	7	06° 27' 04.9"S	50° 04'44.8"W
1	5	Sólida	7	06° 27' 05.1"S	50° 04'48.4"W
1	6	Sólida	7	06° 27' 04.8"S	50° 04'44.8"W
1	7	Sólida	7	06° 27' 02.0"S	50° 04'54.8"W
1	8	Sólida	7	06° 27' 07.4"S	50° 05'02.3"W
1	9	Sólida	7	06° 27' 05.6"S	50° 05'07.7"W
1	10	Sólida	7	06° 27' 01.3"S	50° 05'05.5"W
1	11	Sólida	7	06° 26' 54.9"S	50° 05'01.6"W
1	12	Sólida	7	06° 26' 56.6"S	50° 04'56.1"W
1	13	Sólida	7	06° 27' 01.4"S	50° 04'50.9"W
1	14	Líquida	6	06° 25'47.4"S	50° 05'16.0"W
1	15	Sólida	6	06° 25'48.5"S	50° 05'16.0"W
1	16	Líquida	6	06° 26'03.2"S	50° 05'37.3"W
1	17	Sólida	6	06° 26'03.2"S	50° 05'37.3"W
1	18	Sólida	6	06° 26'18.2"S	50° 05'38.3"W
1	19	Líquida	6	06° 26'19.7"S	50° 05'39.6"W
2	Bete1	Sólida		6° 25' 53.122"S	50° 03' 14.9"W
2	Bete2	Sólida		6° 25' 53.594"S	50° 04' 43.5"W
2	Bete3	Líquida	5	6° 25' 36.6"S	50° 03' 04.8"W
2	Bete4	Sólida		6° 25' 36.6"S	50° 03' 04.8"W
2	N	Líquida	6	6° 27' 12.643"S	50° 05' 50.672"W
2	O	Sólida		6° 27' 44.405"S	50° 05' 54.399"W
2	P	Líquida	6	6° 27' 44.405"S	50° 05' 54.399"W
2	Q	Sólida		6° 27' 44.528"S	50° 04' 45.874"W
2	R	Sólida		6° 27' 55.232"S	50° 04' 50.809"W
2	S	Sólida		6° 27' 59.693"S	50° 04' 50.817"W
2	T	Sólida		6° 27' 59.687"S	50° 04' 54.203"W
2	X	Sólido		6° 27' 47.679"S	50° 04' 32.045"W
2	Y	Líquida	6	6° 27' 2.013"S	50° 04' 16.945"W
3	1	Líquida	7	6° 28' 44.528"S	50° 03' 54.7"W
3	2	Sólida		6° 28' 55.232"S	50° 02' 37.5"W

Coleta	Amostra	Tipo	pH	Latitude	Longitude
3	3	Sólida		6° 28' 59.693"S	50° 02' 36.2"W
3	4	Líquida	4	6° 28' 59.687"S	50° 03' 06.0"W
3	5	Sólida		6° 28' 47.679"S	50° 03' 05.6"W
3	6	Sólida		6° 25' 37.5"S	50° 06' 04.0"W
3	7	Líquida	5	6° 25' 37.5"S	50° 06' 04.0"W
3	8	Líquida	6	6° 25' 44.7"S	50° 05' 11.8"W
3	9	Sólida		6° 25' 58.8"S	50° 02' 57.9"W
3	10	Líquida	6	6° 25' 58.8"S	50° 02' 57.9"W
3	11	Líquida	6	6° 25' 59.5"S	50° 04'18.2"W
3	12	Sólida		6° 26' 00.5"S	50° 05' 27.3"W
3	13	Sólida		6° 26' 00.6"S	50° 02' 53.9"W
3	14	Sólida		6° 26' 14.3"S	50° 04' 02.5"W
3	15	Líquida	7	6° 26' 19.5"S	50° 05' 38.8"W
3	16	Sólida		6° 26' 19.5"S	50° 05' 38.8"W
3	17	Líquida	7	6° 26' 51.6"S	50° 04' 48.2"W
3	18	Líquida	7	6° 27' 16.8"S	50° 05' 56.3"W
3	19	Líquida	6	6° 27' 17.2"S	50° 04' 51.8"W
4	1	Sólida		6° 25' 33"S	50° 02' 0"W
4	2	Sólida		6° 24' 40.8"S	50° 02' 57.2"W
4	3	Líquida	7	6° 25' 05.8"S	50° 02' 36.2"W
4	4	Líquida	5	6° 25' 3.0"S	50° 03' 5.5"W
4	5	Sólida		6° 25' 3.0"S	50° 03' 5.5"W
4	6	Sólida		6° 25' 36.5"S	50° 06' 5.5"W
4	7	Líquida	5	6° 25' 37.6"S	50° 03' 03.7"W
4	8	Sólida		6° 25' 55.1"S	50° 02' 58.1"W
4	9	Líquida	7	6° 25' 58.8"S	50° 02' 57.8"W
4	10	Sólida		6° 25' 58.8"S	50° 02' 57.8"W
4	11	Líquida	7	6° 26' 00.5"S	50° 02' 53.8"W
4	12	Sólida		6° 26' 55.9"S	50°04' 57.9"W
4	13	Sólida		6° 27' 6.3"S	50°04' 45.8"W
4	14	Sólida		6° 27'06.3"S	50°04' 51.6"W
4	15	Sólida		6° 27' 09.5"S	50°04' 47.2"W
4	16	Sólida		6° 27' 13.3"S	50°04' 33.9"W
4	17	Líquida	7	6° 27' 16.9"S	50°05' 56.6"W
4	18	Sólida		6° 26' 19.4"S	50°05' 38.9"W
4	19	Líquida	7	6° 26' 19.4"S	50°05' 38.9"W
4	20	Líquida	7	6° 25' 45.1"S	50°05' 12.3"W
4	21	Líquida	7	6° 25' 59.5"S	50°04' 18.5"W
5	1	Sólida		6° 27' 6.128" S	50° 4' 46.217" W

Coleta	Amostra	Tipo	pH	Latitude	Longitude
5	2	Sólida		6° 27' 6.063" S	50° 4' 46.510" W
5	3	Sólida		6° 27' 9.814" S	50° 4' 49.889" W
5	4	Sólida		6° 27' 14.473" S	50° 4' 33.831" W
5	5L	Líquida	7	6° 27' 15.848" S	50° 4' 37.507" W
5	6	Sólida		6° 26' 14.969" S	50° 5' 38.815" W
5	7L	Líquida	6	6° 26' 15.328" S	50° 5' 39.173" W
5	8	Sólida		6° 26' 0.296" S	50° 5' 27.611" W
5	9L	Líquida	6	6° 25' 36.007" S	50° 3' 5.665" W
5	10L	Sólida/liquida	5	6° 25' 36.007" S	50° 3' 5.665" W
5	13L	Líquida	7	6° 25' 36.007" S	50° 3' 5.665" W
5	14	Sólida		6° 25' 36.007" S	50° 3' 5.665" W
5	15L	Liquida	7	Fundo da cava	

As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (25 °C), e transportadas até o Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-POLI-USP), onde foi feito o isolamento e identificação das bactérias mais resistentes ao metal e realização de testes de adsorção.

As amostras da última coleta foram destinadas para análise físico-química e processadas no equipamento ICP-OES revelando sua composição quanto aos principais metais encontrados na região de mineração.

5.2 Isolamento de bactérias

A seleção de bactérias com potencial para biossorção de cobre foi realizada através da inoculação de uma amostra de solo (1 g) ou amostra líquida (1 mL) em meio “MJS” descrito por Valls et al (2000), o qual consiste em 12,5 mM HEPES; 50 mM NaCl; 20 mM NH_4Cl; 1 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; 0,05 mM $MnCl_2$; 0,8% casaminoácidos; 0.005% tiamina; 0,10% de

glicose, 0,50% de glicerol, 10,0 mg/L de anfotericina B, adicionado de 1mM de cobre ($CuCl_2$) à 28 °C e 180 rpm. A avaliação do crescimento celular foi feita após 2 dias (48 h) e 1 mL deste "pré-inoculo" foi incubado em diferentes concentrações de cobre (1mM; 2,5mM; 5mM; 7,5mM e 10mM) por 48 horas, a 28 °C e 180 rpm (Figura 9). As 2 maiores concentrações que obtiveram crescimento, foram crescidas em placa e seus isolados identificados.

Cada amostra foi estocada utilizando 2 mL do cultivo líquido suplementado com 30% glicerol em freezer -80 ºC, para análises posteriores e para a construção de um banco de dados.

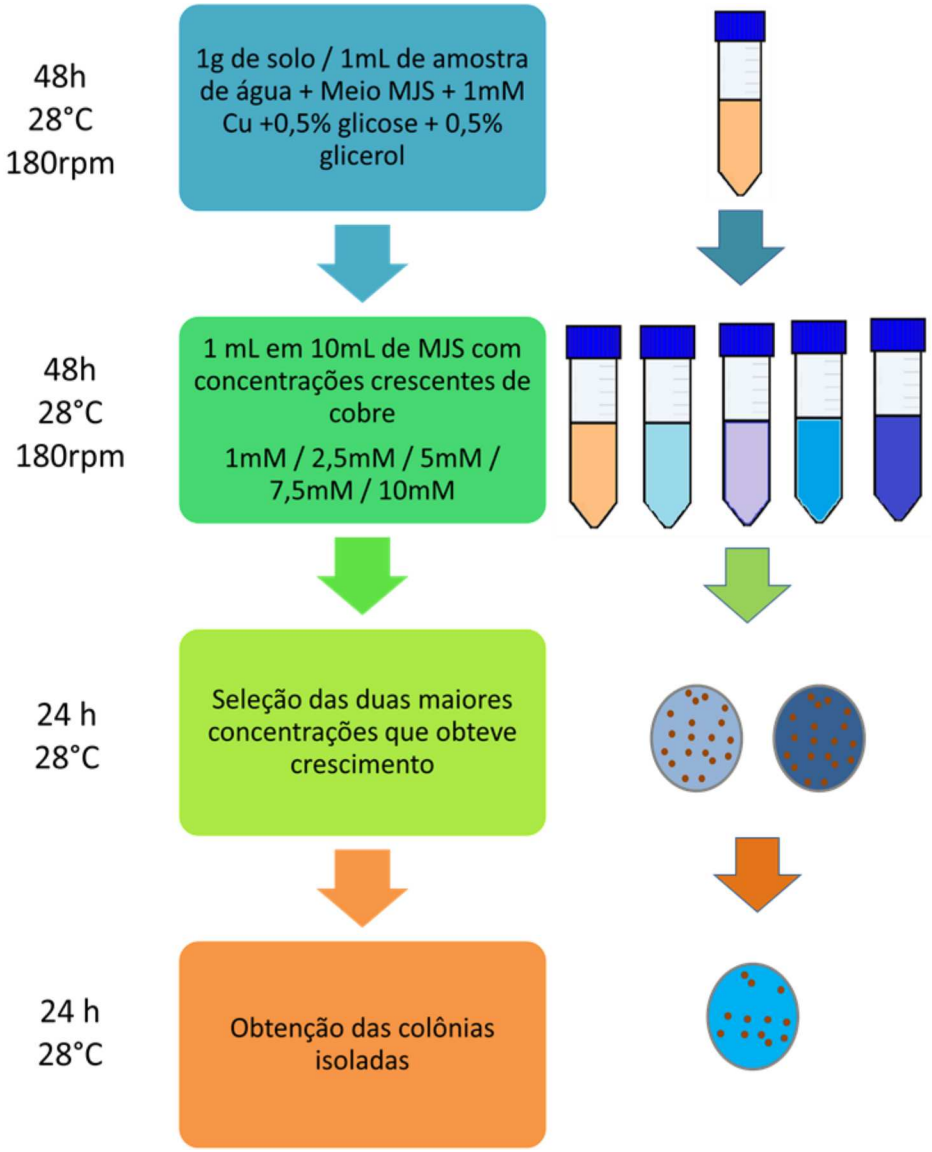


Figura 9 Procedimento do isolamento de colônias, a partir do crescimento celular em meio seletivo contendo cloreto de cobre.

As linhagens isoladas foram identificadas e utilizadas nos ensaios de biossorção de metais em meio líquido. A eficiência de biossorção do metal foi comprovada através de experimentos das cepas mais resistentes em Tris-HCL e TSM contendo cobre e outros metais.

5.3 Perfil proteico e genômico como ferramentas de identificação de bactérias

O método convencional de identificação de micro-organismos (amplificação do gene ribossomal 16S) exige longo tempo para a identificação comparado à nova metodologia que está ganhando cada vez mais espaço em trabalhos científicos: o MALDI-TOF. Esse método está condicionado ao reconhecimento de padrões espectroscópicos de proteínas ribossomais para distintas espécies microbianas. O presente trabalho comparou as duas técnicas, a fim de viabilizar a rápida identificação de micro-organismos em estudos posteriores de remediação de locais contaminados por minas, ou efluentes industriais contendo metais tóxicos.

5.3.1 Identificação de bactérias por espectrometria de massas (MALDI-TOF)

A identificação taxonômica dos isolados bacterianos foi feita por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, que fornece perfis proteicos de cada linhagem isolada. A metodologia empregada foi a sugerida pela *Bruker Daltonics*. Em resumo, as células de uma

única colônia foram transferidas da placa de Petri para uma placa de 96 poços de aço polido (Bruker Daltonics GmbH) e secas à temperatura ambiente (25° C). Cada amostra foi coberta com 1µL da solução matriz (que consiste numa solução saturada de alpha-ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico em 50% acetonitrila e ácido trifluoracético 2,5%).

As medidas foram realizadas com o equipamento LT Microflex espectrômetro de massas (Bruker Daltonics) usando software FlexControl (versão 3.0, Bruker Daltonics). Os espectros foram gravados no modo linear positivo. Para cada espectro, foram feitas 240 leituras e 50 tiros de laser a partir de posições diferentes da amostra-alvo (modo automático).

Os espectros foram então, importados para o software Biotyper (versão 2.0, Bruker Daltonics), processados pelo modelo padrão de correspondência com as configurações-padrão, e os resultados apresentados em uma tabela de classificação. Essa classificação trata-se de um processo de correspondência de padrão proposto pelo fabricante Biotyper MALDI-TOF, com pontuações de ID ("*scores*") que variam de 0 a 3. "*Scores*" menores de 1,55 foram considerados como baixa identificação; scores entre 1,55 e 1,9 foram consideradas como ID confiável para gênero, e maiores que 1,9 foram consideradas como ID confiável para identificação de espécies.

5.3.2 Identificação molecular por amplificação do gene ribossomal 16 S (16 S rDNA)

A fim de comprovar a identificação previamente realizada pelo MALDI-TOF Biotyper, foi realizada a identificação molecular (gene 16S rDNA) das cepas isoladas. Os micro-organismos foram identificados através de extração do DNA baseando-se no protocolo de Chen & Kuo (1993). A amplificação dos nucleotídeos do gene que codifica o rDNA 16S foi realizada através de PCR (reação de polimerase em cadeia) com o seguinte protocolo: 1 µL do DNA genômico, 0,04 µL da enzima Taq-polimerase 5unidades (GE) (5 unidade), 2,75 µL do tampão da enzima Taq (GE), 0,5 µL dNTPs (10mM), 1 µL dos iniciadores 347F (5'-

GGAGGCAGCAGTRRGGAAT-3') e 803R (5'-CTACCRGGGTATCTAATCC-3') (WUYTS, 2004) na concentração de 10 µM, 1,10 µL de $MgCl_2$ na concentração de 25 mM e 20,86 µL de água duplamente destilada-deionizada autoclavada. A reação foi calculada para uma margem de segurança de 10% sendo que o volume final para cada reação foi de 25 µL. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos em um termociclador (Master Cycler - eppendorf). A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 0.8 % de agarose, conforme descrito por Sambrook & Russell (2001). A sequência obtida do gene 16S foi analisada pelo sequenciador de DNA ABI modelo 3130 (Applied Biosystems) e o kit de sequenciamento ABI Prism (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit V 3.1, Perkin-Elmer). Estas sequências obtidas para as linhagens isoladas foram comparadas com sequências conhecidas do banco de dados (*NCBI- National Center for Biotechnology Information*).

5.4 Estudo da Capacidade de Adsorção de cobre por bactérias isoladas do ambiente

5.4.1 Preparação de solução

Todos os produtos químicos utilizados no presente estudo foram de grau analítico de qualidade e foram utilizados sem purificação adicional. Todas as diluições foram preparadas em água duplamente deionizada (Milli-Q Millipore resistividade de 18,2 $M\Omega cm^{-1}$). A solução estoque de cobre foi preparada por dissolução de $CuCl_2.2H_2O$ em água duplamente destilada-

deionizada. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo uma solução de estoque de 10.000 ppm de cloreto de cobre, cloreto de níquel e cloreto de cádmio.

5.4.2 Padronização do método de quantificação de metais por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma)

A introdução direta de amostras requer modificações nas condições operacionais usuais do instrumento do ICP-OES. Segundo Moura (2006), estas alterações são necessárias para reduzir as interferências provocadas por efeito de matriz dos compostos orgânicos, recomendando-se empregar maior potência da fonte usada rotineiramente. É recomendado também usar uma mistura de argônio e oxigênio como gás de nebulização, de forma a melhorar a combustão e evitar o depósito de composto de carbono no tubo central do injetor. Não foram encontradas referências citando a introdução direta de amostras orgânicas em sistemas de analise espectrométricos. Isto se deve provavelmente à complexidade da sua matriz orgânica, que lhe dá uma grande resistência química, uma difícil digestão e solubilização e aos problemas potenciais que podem acontecer no sistema de transporte, nebulização e excitação do ICP-OES.

Portanto, antes de analisadas e quantificadas as concentrações de diversos metais (Ag, Al, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Sn, Ti, Zn e Pb) por meio da técnica de ICP-OES, as amostras tiveram que ser tratadas por um processo de digestão, a fim de reduzir possíveis interferências da amostra ao equipamento. A digestão consiste na decomposição de compostos orgânicos e inorgânicos em seus elementos constituintes empregando ácidos e aquecimento. Vários procedimentos analíticos para tratamentos de amostras têm sido reportados na literatura, nesses procedimentos utilizam-se diferentes misturas ácidas no processo de solubilização de metais. O presente trabalho estudou 3 formas diferentes de digestão de matéria orgânica e de solubilização de metais para o tratamento de amostras antes de serem analisadas em ICP-OES,

a fim de eleger uma técnica a ser utilizada na quantificação de metais durante os experimentos de adsorção.

5.4.2.1 Metodologia 1: Digestão ácida em bloco aquecido

Uma das formas mais tradicionais de preparação de amostras para ICP-OES é a digestão conduzida em meio ácido em bloco digestor ou chapa aquecida (ERICKSON, 2011) Em um Becker de 100 mL foram adicionados 5 mL de amostra e 250 μL de ácido nítrico (HNO_3) e colocados em uma chapa aquecida a 150 °C até secar a amostra, tomando cuidado para não ferver. Esfriou-se o resíduo, adicionou-se 250 μL de ácido nítrico e repetiu-se o procedimento até que o resíduo ficasse límpido. Enfim, a amostra foi avolumada em um balão volumétrico a fim de que a quantidade de cobre estivesse dentro dos padrões de detecção do ICP-OES.

Esta é uma técnica tradicionalmente lenta e requer várias horas de aquecimento e necessita de grandes volumes de reagentes que geram quantidades indesejáveis de vapores agressivos (ERICKSON, 2011).

5.4.2.2 Metodologia 2: Digestão ácida em micro-ondas

O procedimento foi adaptado do descrito em "EPA *Method 3015A" - Environmental Protection Agency* (EPA, 2007). Para tanto, as amostras foram submetidas a uma digestão ácida, utilizando-se 100 μL de amostra, 1 mL de HNO_3 e qsp 5mL de água duplamente destilada-deionizada. Tal mistura foi submetida ao forno de micro-ondas por 20 minutos de aquecimento em 90 ºC. Após o resfriamento do material foi acrescentando 5 mL de água duplamente destilada-deionizada à mistura para auxiliar na solubilização dos metais. Enfim, a amostra foi analisada em ICP-OES (Varian 710-ES).

5.4.2.3 Metodologia 3: Digestão em água-régia em micro-ondas

O procedimento assemelha-se ao da EPA 3015A descrito acima, porém substitui-se o ácido nítrico e água duplamente destilada-deionizada para a chamada Água-Régia ($HCl:HNO_3$, 3:1, v/v). Para tanto, as amostras foram submetidas a uma digestão ácida, utilizando-se 1 mL de amostra, 9 mL de Água-Régia ($HCl:HNO_3$, 3:1, v/v). Tal mistura foi submetida ao forno de micro-ondas por 20 minutos de aquecimento em 90 ºC. Após o resfriamento do material foi analisado em ICP-OES (Varian).

5.4.3 Determinação da Massa Seca das Bactérias a serem utilizadas para biossorção

Para determinar o peso seco da cultura microbiana, foram utilizados filtros de membrana 0,22 milímetros de poro e de 47 mm de diâmetro (Millipore - Merck - Darmstadt , Alemanha). As membranas foram secas em um microondas a 360 W de potência durante 20 minutos e depois pesados. Após a pesagem , as membranas foram colocadas sobre um dispositivo de filtração ligado à bomba a vácuo. Cerca de 20 ml da amostra foram separados por filtração em diferentes estágios de crescimento das células. Após a filtração, as membranas foram novamente secas em microondas e pesadas, tal como descrito por Olsson e Nielsen (1997) e ilustrado na Figura 10 .

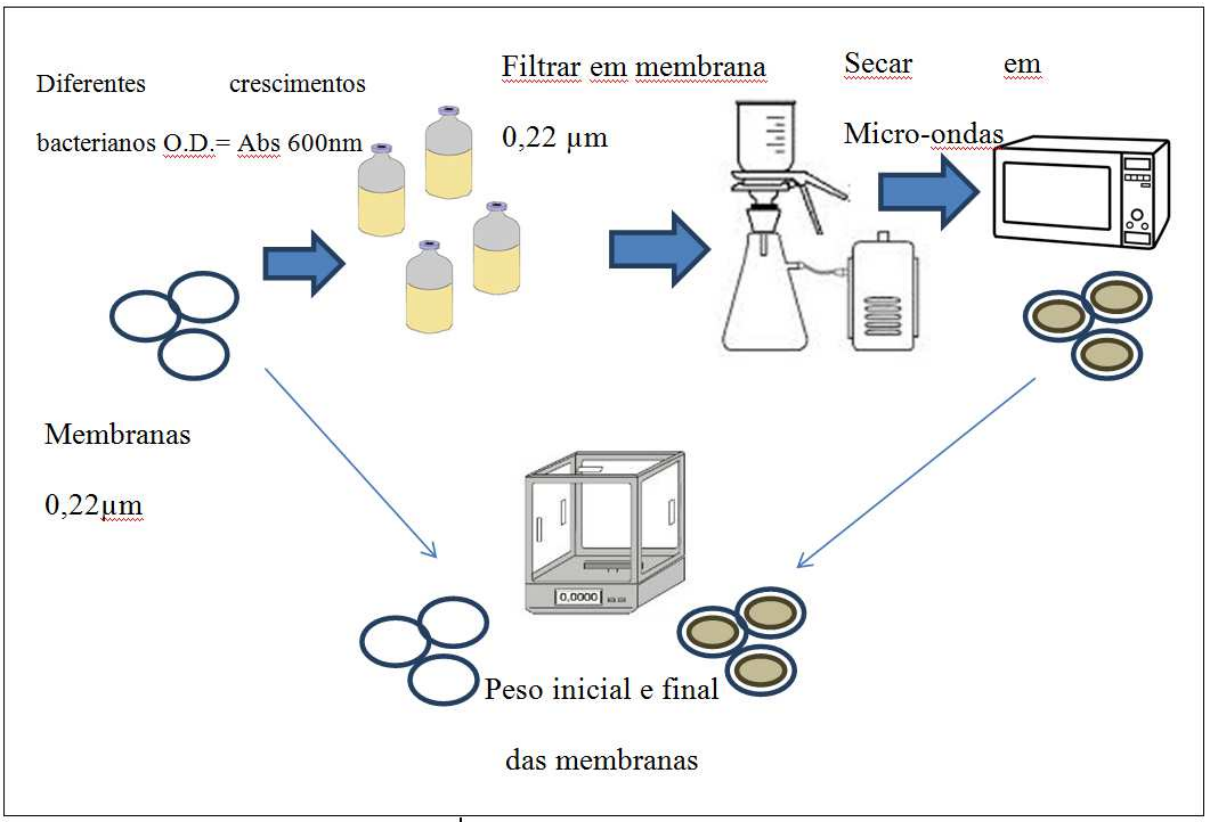


Figura 10 Medida de Massa Seca baseado no método de Olsson e Nielsen (1997).

5.4.4 Teste de concentração inibitória mínima de cobre

Todos os isolados foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima adaptado a metodologia de Ball et al. (2007) . Os isolados foram crescidos em meio de cultura MJS (sem cobre) a uma agitação de 180 rpm e a temperatura de 28 ± 2 ºC por 24 h aproximadamente. Após este período, as culturas foram submetidas a espectrofotômetro para medição de absorbância em comprimento de onda de 600 nm. Após atingirem a D.O. (densidade ótica) equivalente a 0,8 de absorbância, 3 µL de amostra foram distribuídos em placas contendo meio MJS sólido acrescido de $CuCl_2$ nas concentrações de 1 a 10 mM. Os isolados foram incubados por até 120 h a 28 ± 2 ºC e o crescimento foi avaliado visualmente após 24, 48, 72 e 120 horas de incubação pelo crescimento de colônias. A concentração de cobre capaz de interromper o crescimento microbiano foi considerada a concentração inibitória mínima deste metal, em relação ao micro-organismo avaliado. A Figura 11 a seguir resume a metodologia descrita:

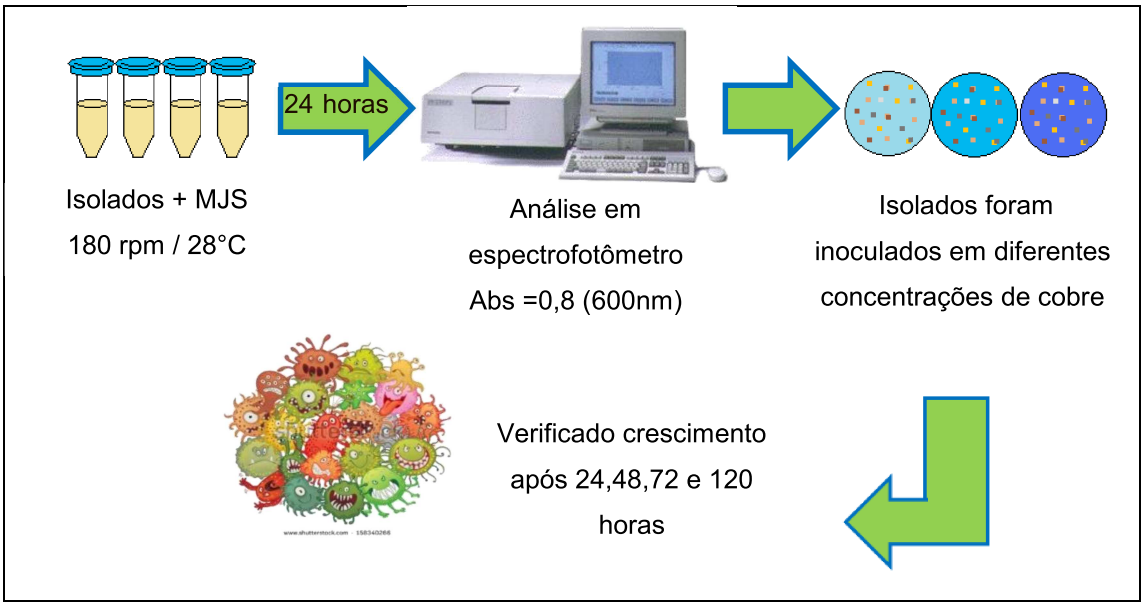


Figura 11 Fluxograma do teste de concentração inibitória mínima de cobre feito nas cepas isoladas, a fim de selecionar as mais resistentes.

5.4.5 Teste de seleção prévia dos micro-organismos mais resistentes

A fim de selecionar as cepas mais aptas atuarem como biossorventes de cobre e estudar os parâmetros de adsorção do metal, foi feito o seguinte experimento: os micro-organismos que cresceram nas maiores concentrações de $CuCl_2$ nos experimentos de concentração inibitória de cobre foram estudados quanto a adsorção do metal. Para isto foram crescidos em MJS por 24h, a 28 ± 2 ºC e agitação de 180 rpm. Após este período, as culturas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro para medição de absorbância em comprimento de onda de 600 nm. Deste modo, foi padronizada a D.O. (densidade ótica) equivalente a 0,8, e as culturas foram submetidas à um crescimento em MJS com 100 ppm de $CuCl_2$. Após 24h de incubação, foi retirada uma alíquota para análise em ICP-OES e adicionado o equivalente a 500 ppm de $CuCl_2$, e re-incubados a 28 ± 2 ºC e agitação de 180 rpm por mais 24h. Amostras foram retiradas, analisadas quanto a concentração de metal e 3 cepas foram escolhidas para serem estudadas em experimentos posteriores de adsorção e ressorção de cobre.

5.4.6 Identificação dos mecanismos de biossorção de cobre: adsorção, dessorção e ressorção

Para os experimentos de adsorção e dessorção, as cepas selecionadas foram crescidas em meio MJS até sua fase estacionária e divididas em subculturas idênticas de células mortas e células vivas, esta segunda cultura, divididas em viáveis (quando incubadas em TSM) e não-viáveis (quando incubadas com Tris-HCl).

Para a obtenção das células mortas, as células foram submetidas a temperatura de 85 °C por 24 h e a eficiência deste tratamento foi checada através da ausência de crescimento em meio ágar e MJS. A massa das células foi então ressuspendida em Tris-HCl (10 mM) contendo 100 ppm de cloreto de cobre (utilizados a partir da solução estoque de 10.000 ppm).

Para a obtenção das células vivas, estas foram separadas por centrifugação e lavadas em Tris-HCl pH 7 (10 mM), incubadas em Tris-HCl a temperatura ambiente por 12 horas para consumo do excesso de nutrientes. Depois, as células foram separadas por centrifugação novamente e, então ressuspendidas em solução contendo 100 ppm de cobre (Tris-HCl e TSM).

Para a células viáveis, ou seja, células vivas mantidas em meio com fonte de carbono, a massa celular foi ressuspendida no volume inicial de 40 mL de meio TSM, adaptado de (MERGEAY et al., 1985) contendo 0,10% de glicose (p/v) e 0,50% de glicerol (mL/L) 6,06 g/L de Tris; 4,68 g/L de NaCl; 1,49 g/L de KCI; 1,07 g/L de NH_4Cl; 0,43 g/L de Na_2SO_4; 0,2 g/L de $MgCl_2$ x $6H_20$; 0,03 g/L de $CaC1_2$ x $2H_20$; 0,23 g/L de Na_2HPO_4 x $12H_20$; 0,005 g/L de Fe(III)(NH_4) citrato; 1 mL de solução de elementos traço SL7 [para 1 L: 1 mL de HCl solução a 25%; 70 mg de $ZnCl_2$; 100 mg de $MnCl_2.4H_2O$; 60 mg de H_3BO_3; 200 mg de $CoCl_2.6H_2O$; 20 mg of $CuCl_2.H_2O$; 20 mg of $NiCl_2.6H_2O$ e 40 mg de $(NH_4)_2MoO_4.2H_2O$)], e $CuCl_2$ (100 ppm). Já as células mortas e vivas foram ressuspendidas em 40 mL de Tris-HCl (10 mM) e cobre, e incubadas a 28°C, 180 rpm para a adsorção do metal.

A biomassa foi medida através do cálculo de peso seco. A concentração celular de 1 g/L foi padronizada em todos os experimentos (seguindo os parâmetros dos experimentos de Chen et al., 2005) e foi construída uma curva de correlação de absorbância a 600 nm e peso seco das bactérias utilizadas para adsorção, baseado no método de Olsson e Nielsen, descrito anteriormente). As concentrações de cobre durante o experimento foram medidas através de ICP-OES.

O processo de dessorção foi obtido lavando-se o precipitado celular com Tris-HCl 10 mM pH 2, seguido de centrifugação de 5000 rpm em 20 minutos e então repetido o processo com solução salina, 0,1M de NaOH, e novamente solução salina. Para ensaios de ressorção, foi inoculada a mesma amostra de célula (que passaram pelo processo de dessorção) em Tris-HCl ou TSM contendo 100 ppm de metal para a ressorção, mantidos a 28 °C e em agitação de 180 rpm, após 24 h a quantidade de metal foi analisada por ICP-OES.

5.4.7 Influência do pH na adsorção do cobre

A principal variável investigada em estudos de adsorção é o pH e isso se deve ao efeito significativo do mesmo sobre a fração do metal adicionado que é adsorvido (SZE; LU; WONG, 1996). O pH é o principal fator que governa as reações de adsorção de metais por coloides orgânicos e inorgânicos do solo (LU et al., 2006). A adsorção é acompanhada de liberação de prótons, sendo estes considerados os maiores competidores pelos sítios de adsorção (LU et al., 2006). A entrada de um cátion bivalente no sítio corresponde à saída de 1 ou 2 íons H^+, o que diminui o pH.

Para determinar o pH ótimo de dessorção, a biomassa bacteriana (morta e viva) foram expostas a quantidades iguais de metal em diferentes pH (pH 2,0; pH 5,0 e pH 7,0), e sua eficiência de recuperação do metal foi calculada.

5.5 Estudo da Capacidade de Adsorção de outros metais (níquel e cádmio) por bactérias isoladas do ambiente

A cepa que se mostrou mais resistente nos experimentos de adsorção com cobre foi utilizada para reproduzir os experimentos de adsorção com outros metais tóxicos. As células foram crescidas em meio MJS e divididas em 3 conjuntos de subculturas idênticas: células mortas (autoclavadas), células secas e células vivas.

Assim como nos experimentos anteriores, para a obtenção da biomassa de células vivas, estas foram colhidas por centrifugação e lavadas em Tris-HCl pH 7,0 (10 mM) e incubadas em

Tris-HCl (10 mM) durante 12 horas para consumo do excesso de nutrientes. Depois, as células foram novamente centrifugadas e, ressuspendidas em Tris-HCl (10mM) contendo 50 ppm de um dos metais estudados ($NiCl_2$ e $CdCl_2$) e incubadas a 28 °C, 180 rpm para a adsorção do metal.

Para a obtenção das células mortas, as células foram autoclavadas a 120°C por 30 minutos e a eficiência deste tratamento foi checada através da ausência em meio ágar contendo Meio MJS (pela ausência de crescimento celular). Para a produção de biomassa seca, as células foram centrifugadas e a biomassa foi colhida e submetida a estufa a 105°C por 5 horas. Enfim, as biomassas de células provenientes de diferentes tratamentos foram utilizadas em experimentos de adsorção de níquel e cádmio.

Como no experimento com cobre, a biomassa foi medida através do cálculo de peso seco. A concentração celular de 1 g/L foi padronizada em todos os experimentos (de acordo com os experimentos de Chen *et al* (2005) e foi usada a mesma curva de correlação de absorbância a 600 nm e peso seco das bactérias utilizadas para adsorção de cobre. As concentrações de níquel e cádmio durante os experimentos foram medidas através de ICP-OES e digeridas a partir do método 2: “Digestão ácida em micro-ondas”, adaptado de EPA 3015.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento de micro-organismos resistentes a metais tóxicos

Foram realizadas 5 coletas (maio e dezembro de 2012; março e maio de 2013; março de 2014) (Figura 12) para isolamento dos micro-organismos resistentes ao cobre. As amostras coletadas foram submetidas ao crescimento em meio de cultura MJS com diferentes concentrações de cobre e as 2 maiores concentrações que foi observado crescimento foram submetidas a isolamento de colônias em placa. O crescimento bacteriano nas diferentes concentrações de cobre é apresentado na tabela 2.

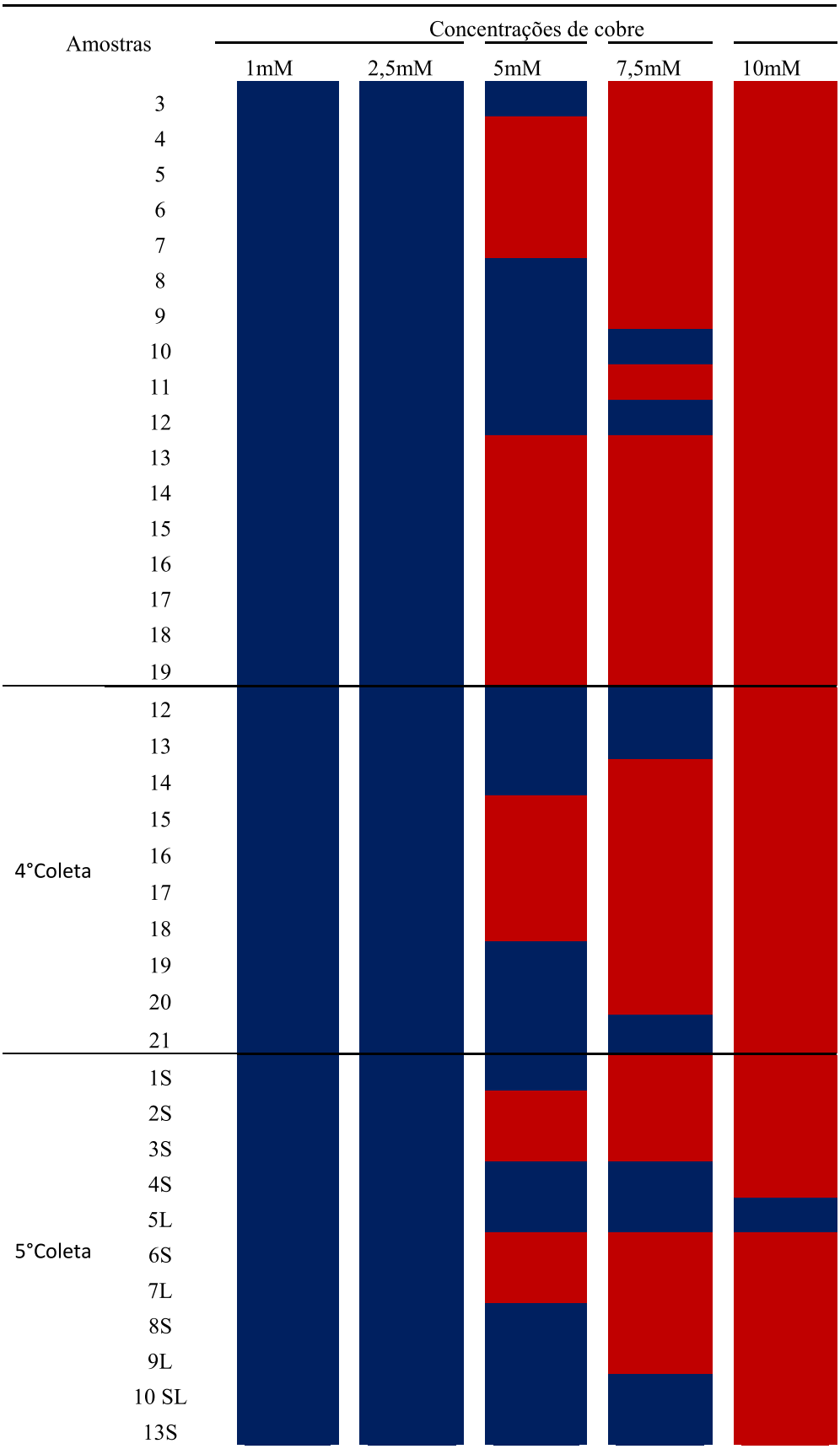
Pelos resultados observados, pudemos constatar crescimento de bactérias presentes nas amostras coletadas. Este resultado comprova a existência de bactérias resistentes a cobre em locais que apresentam altas concentrações do metal como havíamos proposto na tese, levando a crer que bactérias promissoras na remediação de cobre estejam sobrevivendo nas amostras coletadas.

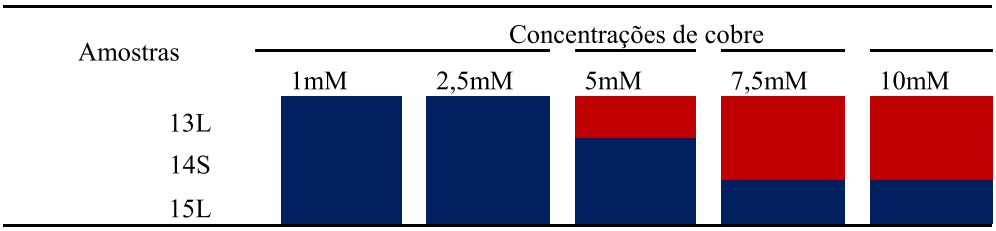
Mapa de Coletas

Figura 12 Mapa do Google Earth, contendo os pontos georeferenciados dos diferentes eventos de coletas feitas para aquisição de amostras de solo e água para isolamento de bactérias resistentes ao cobre.

Tabela 2 - Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de cobre. A coloração azul indica que houve crescimento nas amostras e a coloração vermelha indica que não houve crescimento bacteriano observado em relação a variação da concentração de cobre.

Amostras		Concentrações de cobre				
		1mM	2,5mM	5mM	7,5mM	10mM
1°Coleta	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					
	16					
	17					
	18					
	19					
2°Coleta	BETE1					
	BETE2					
	BETE3					
	BETE4					
	N					
	O					
	P					
	Q					
	R					
	S					
	T					
	X					
	Y					
3°Coleta	1					
	2					


Amostras
Concentrações de cobre
1mM
2,5mM
5mM
7,5mM
10mM
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
4°Coleta
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
5°Coleta
1S
2S
3S
4S
5L
6S
7L
8S
9L
10 SL
13S



Uma vez crescidas em placas, as bactérias isoladas, foram estocadas em meios MJS com glicerol 20% em freezer -80 ºC, e submetidas a identificação genética e proteica e os dois métodos foram comparados.

6.2 Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas (MALDI-TOF)

A identificação realizada utilizando espectrometria de massas MALDI TOF Biotyper (Bruker Daltonics), foi escolhida por se tratar de um equipamento que consegue realizar a identificação em questão de minutos, baseando-se em espectros de massa/carga de proteínas ribossomais. Dubois et al., (2010) utilizaram o MALDI-TOF MS, para a identificação de 152 cepas de *Staphylococcus* de origem clínica e ambiental. Com os resultados obtidos eles concluíram que essa abordagem é uma excelente alternativa aos métodos tradicionais e pode ser utilizado para a análise das relações clonais e/ou taxonômica. A utilização do MALDI-TOF MS também foi avaliada por Nagy et al., (2009) para a identificação das espécies de 277 amostras clínicas do gênero *Bacteróides*, a identificação das espécies foi realizada com MALDI software Bruker Biotyper Daltonik (Bruker Daltonics EUA) e os resultados e identificação fenotípica convencional dos isolados foram utilizados como referência. Nagy et al. (2009) concluíram que o poder de discriminação e identificação do MALDI-TOF MS mostrou-se superior aos testes bioquímicos para *bacteroides*.

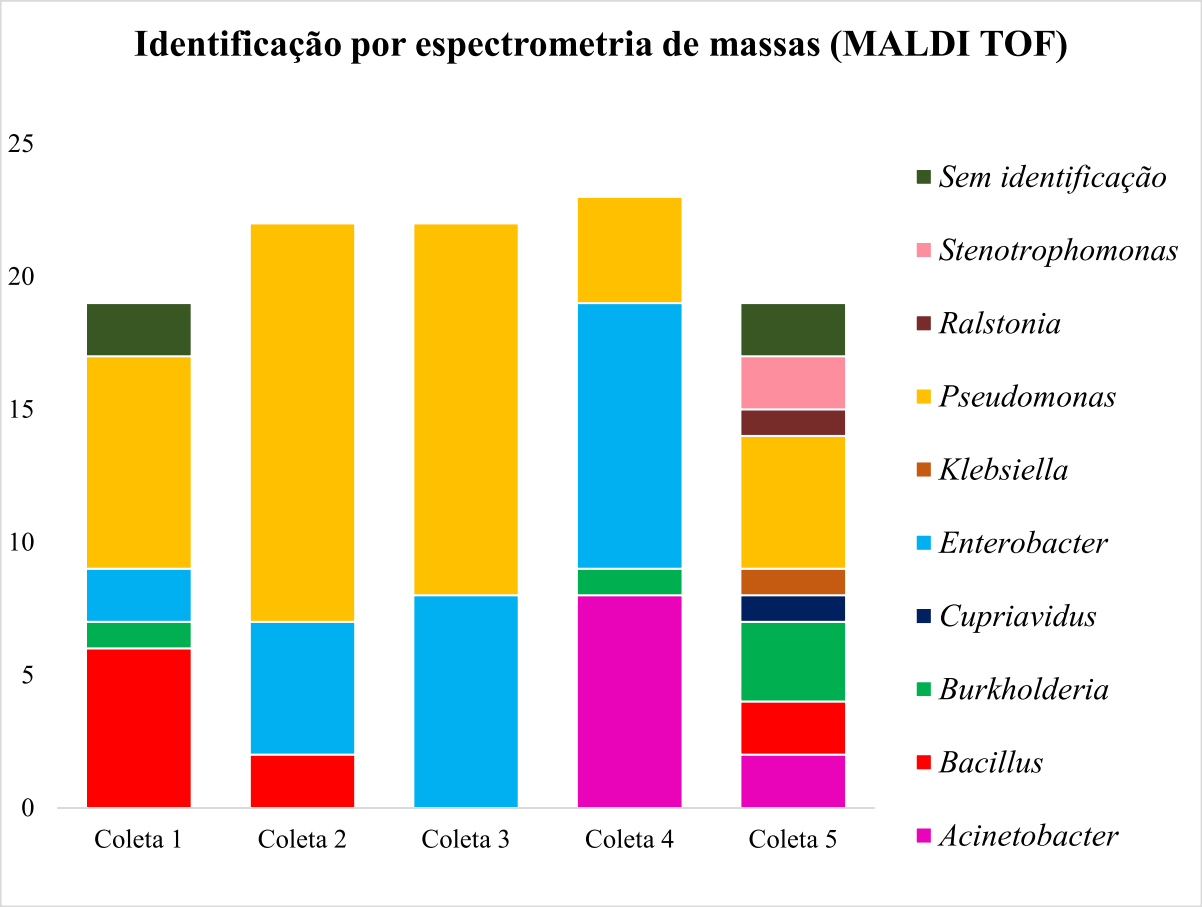


Figura 13 Quantidade de isolados de cada gênero, provindos das cinco coletas. Identificadas por espectrometria de massas MALDI TOF.

Conforme a Figura 13, durante primeira coleta foram isoladas 19 bactérias, sendo 8 indivíduos do gênero *Pseudomonas*, 6 *Bacillus, 2 Enterobacter e 1 Burkholderia*. Na segunda e terceira coleta foram isoladas 22 bactérias em cada coleta, sendo que na segunda coleta foi observado a presença dos gêneros *Pseudomonas, Bacillus* e *Enterobacter* e na terceira coleta apenas os gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*. A quarta coleta apresentou os gêneros já vistos nas três primeiras amostragens e mais um novo que foi o gênero *Acinetobacter*. Na quinta coleta foi isolada uma variedade maior de micro-organismos incluindo os gêneros *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas, Klebsiella, Citrobacter* e *Ralstonia* (Figura 13). Pelos resultados, pudemos notar que a biodiversidade da última coleta foi significativamente maior. Uma das hipóteses para este fenômeno pode ter sido o rápido processamento das amostras (enriquecimento seletivo realizado logo após a coleta), pois tal fato desfavoreceu a grande competidora *Pseudomonas* a se reproduzir e ser encontrada em grande quantidade como aconteceu nas outras coletas, onde

houve um maior período de espera para o processamento de amostras. Vale lembrar também, que a Mina do Sossego está em constante mudança e movimento, e as coletas não foram feitas nos mesmos pontos. Os demais parâmetros de metodologia para isolamento bacteriano sempre foram mantidos em todas as coletas, por isso não devem ter propiciado este aumento de biodiversidade.

Os resultados do trabalho mostraram a prevalência de bactérias do gênero *Pseudomonas*, presente em todas as coletas, fato esperado em função do seu amplo metabolismo e já descrito por vários autores (MORAGA; MERINO; MONDACA, 2003; ROSENFELD; RAMSEY; GIBSON, 2003; HUSSEIN et al., 2004). O gênero *Pseudomonas* é largamente citado na literatura como resistente a metais tóxicos por outros autores. Todas as cepas isoladas por Hussein *et al*. (2004) em uma estação de tratamento de esgoto no Egito eram do gênero *Pseudomonas sp.*, sendo 18 cepas com potencial tolerância ao cobre, níquel, zinco, cádmio e cromo. Moraga et al. (2003) também isolaram bactérias resistentes a metais tóxicos e encontraram, em sua maioria, cepas do gênero *Pseudomonas* e *Alcaligenes* provenientes da Baia de Iquique, no Chile. *Pseudomonas* sp. é um gênero conhecido pela versatilidade do seu metabolismo e por isso é encontrada nos mais diversos habitats (ROSENFELD, 2003). Caille & Perron (2007) descreveram dois sistemas de regulação do metabolismo celular de *P. aeruginosa* ativados pelo cobre, pelos quais bactérias previamente tratadas com altas concentrações de cobre se tornaram mais aptas a absorver não só o cobre, mas também outros metais tóxicos, como o zinco, corroborando o fato de que micro-organismos isolados de áreas de processamento de cobre são mais eficientes no processo de adsorção de metais tóxicos.

Além da família *Pseudomonadaceae*, outras cepas encontradas na Mina do Sossego também foram relatadas como resistentes a metais: Roane & Kellogg (1996) isolaram cepas da família *Enterobacteriaceae* em solos contaminados com chumbo no Canadá, além de espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* sugerindo uma afinidade pela biossorção de metais tóxicos por tais gêneros. Já o trabalho feito por Dhakephalkar & Chopade (1994) testou cerca de 40 estirpes de bactérias do gênero *Acinetobacter* isoladas de um local contaminado por metais tóxicos na Índia e concluíram que todas elas eram resistentes a pelo menos 13 íons de metais tóxicos, dentre eles o cobre, mercúrio e chumbo.

Estudos feitos por Castro-Silva et al. (2003), em uma mina de cobre em Santa Catarina, Brasil, encontraram cepas do gênero *Bacillus* resistentes a metais tóxicos, assim como o

presente trabalho. Tal gênero também foi isolado em uma área contaminada por metais tóxicos na Turquia por Yilmaz (2003) e testado frente a concentrações de até 2 mM de cobre.

Já o gênero *Burkholderia* (presente em 3 coletas) foi descrito na literatura como simbionte de plantas para a bioacumulação de metais tóxicos pelas mesmas. Huang et al., (2013) verificaram que a inoculação de uma cepa do gênero *Burkholderia* estimulou a germinação das sementes de vegetais na presença de cobre, promovendo o alongamento das raízes e aumentando a diversidade de rizobactérias, favorecendo um maior acúmulo de metais tóxicos em diversos tecidos vegetais.

Os gêneros *Cupriavidus* e *Ralstonia* são amplamente descritos na literatura como resistentes a metais e utilizados na biossorção (VALLS et al., 2000; ASCARRUNZ et al., 2011; FERREIRA, 2011; BIONDO et al., 2012). Ferreira, (2011) usou estirpes de *Cupriavidus* para remediação de solos contaminados com cádmio e zinco.

6.3 Identificação Molecular das cepas isoladas

As 105 bactérias isoladas foram identificadas por técnica molecular (amplificação do gene ribossomal 16S) para confirmação da identificação realizada pelo espectrômetro de massas MALDI/TOF Biotyper (Bruker Daltonics). O programa computacional possui atualmente mais de 4000 espectros referências (cepas ATCC), os quais abrangem a taxonomia proposta pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information). No entanto, ainda é pequeno quando comparado ao banco de dados de sequências de rDNA 16S do RDP que possui aproximadamente 3,000,000 de sequências depositadas.

Para identificação molecular as bactérias foram submetidas a extração de DNA e o sequenciamento de Sanger (sequências presentes no ANEXO F). As sequências de rDNA 16S obtidas pelo sequenciamento foram comparadas ao banco de dados do NCBI (National Center

for Biotechnology Information). A Figura 14, mostra a distribuição dos gêneros de bactérias encontrados em cada coleta e identificados pela ampliação do gene ribossomal 16 S.

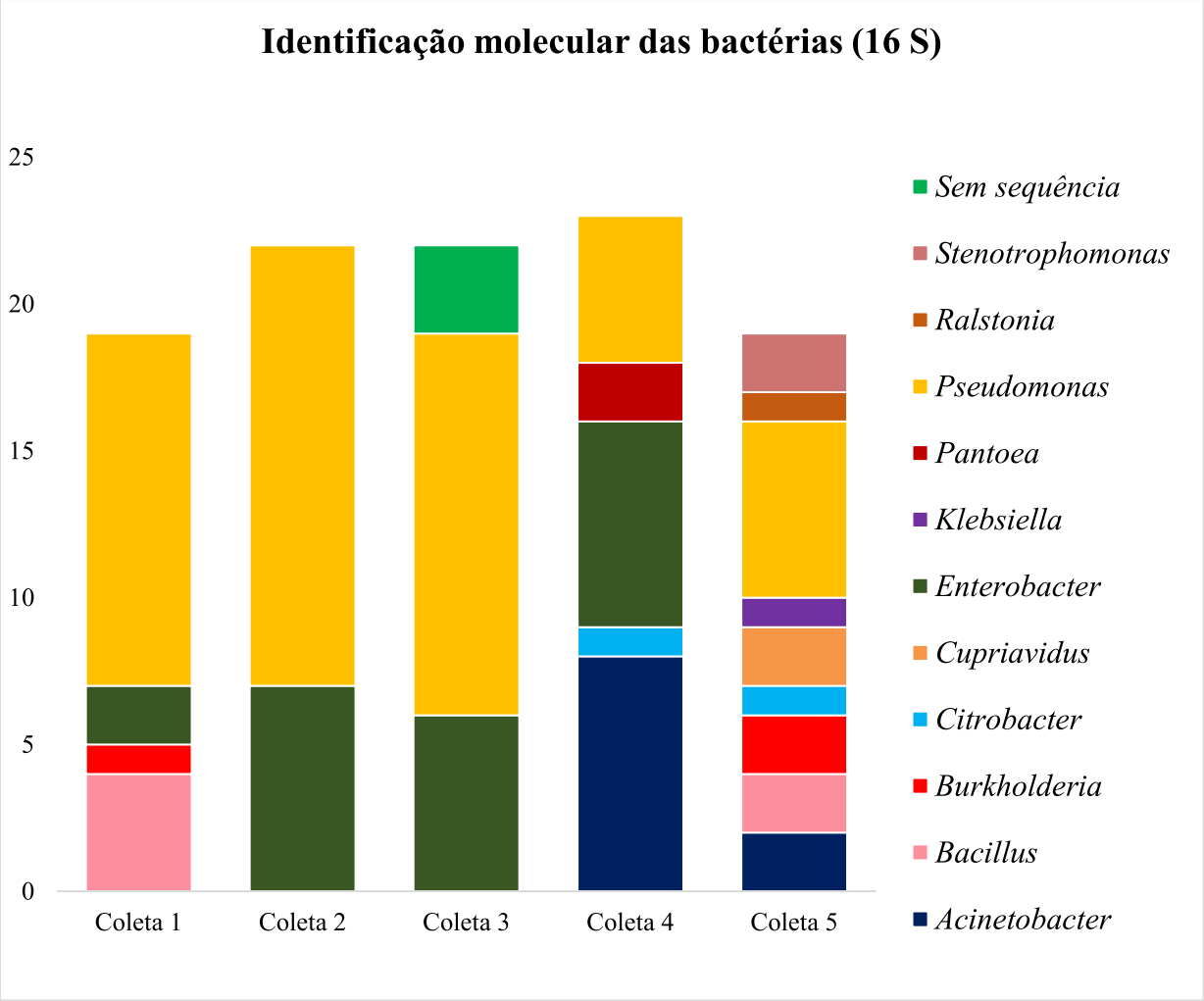


Figura 14 Identificação dos diferentes gêneros isolados, provindos das cinco coletas. Identificadas pela técnica do gene ribossomal 16S.

Os resultados obtidos pelos dois métodos de identificação (rDNA 16 S e MALDI TOF) são comparadas a seguir nas Figuras 15 e 16.

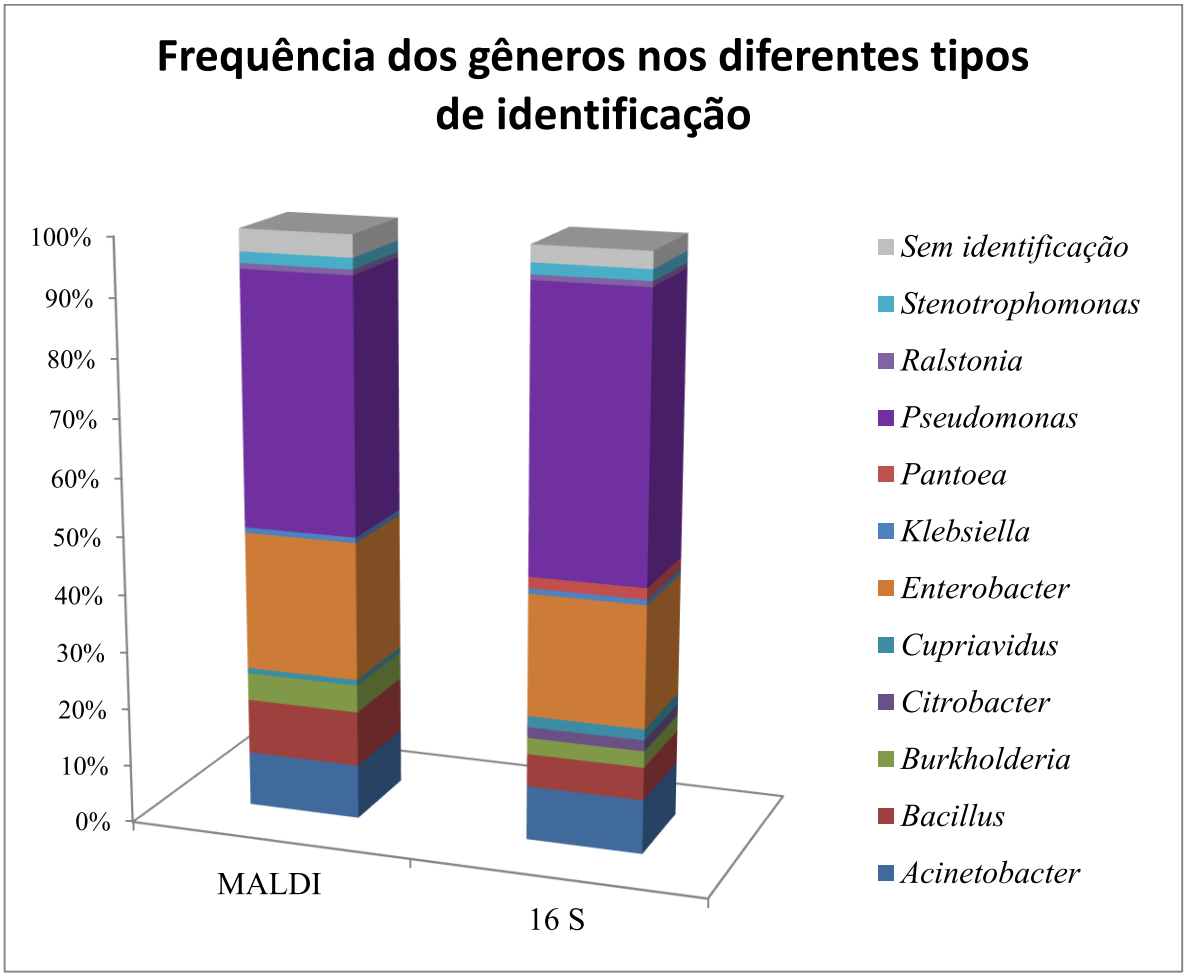


Figura 15 Frequência das famílias isoladas na Mina do Sossego (Canaã dos Carajás, PA). Identificação feita por MALDI-TOF e por amplificação do gene ribossomal 16S respectivamente.

Das 105 bactérias isoladas nas coletas, apenas três não foram identificadas pelo 16 S e 4 não foram identificadas pelo MALDI TOF, 86 estirpes resultaram na mesma identificação de gênero para ambos os métodos de identificação (Figuras 15 e 16). Estes resultados mostram que o Biotyper pode ser uma ferramenta muito útil na identificação de bactérias resistentes a cobre isoladas de amostras ambientais, pois apesar do grande investimento inicial para a compra do equipamento, uma vez comprado ele possui um melhor custo-benefício (preparo simples e barato de amostras e as placas do MALDI são reutilizáveis). Além disso, há de se contabilizar a economia de tempo e o alto desempenho (a coleta do espectro de massas e a comparação com o banco de dados demora menos de 2 minutos por amostra).

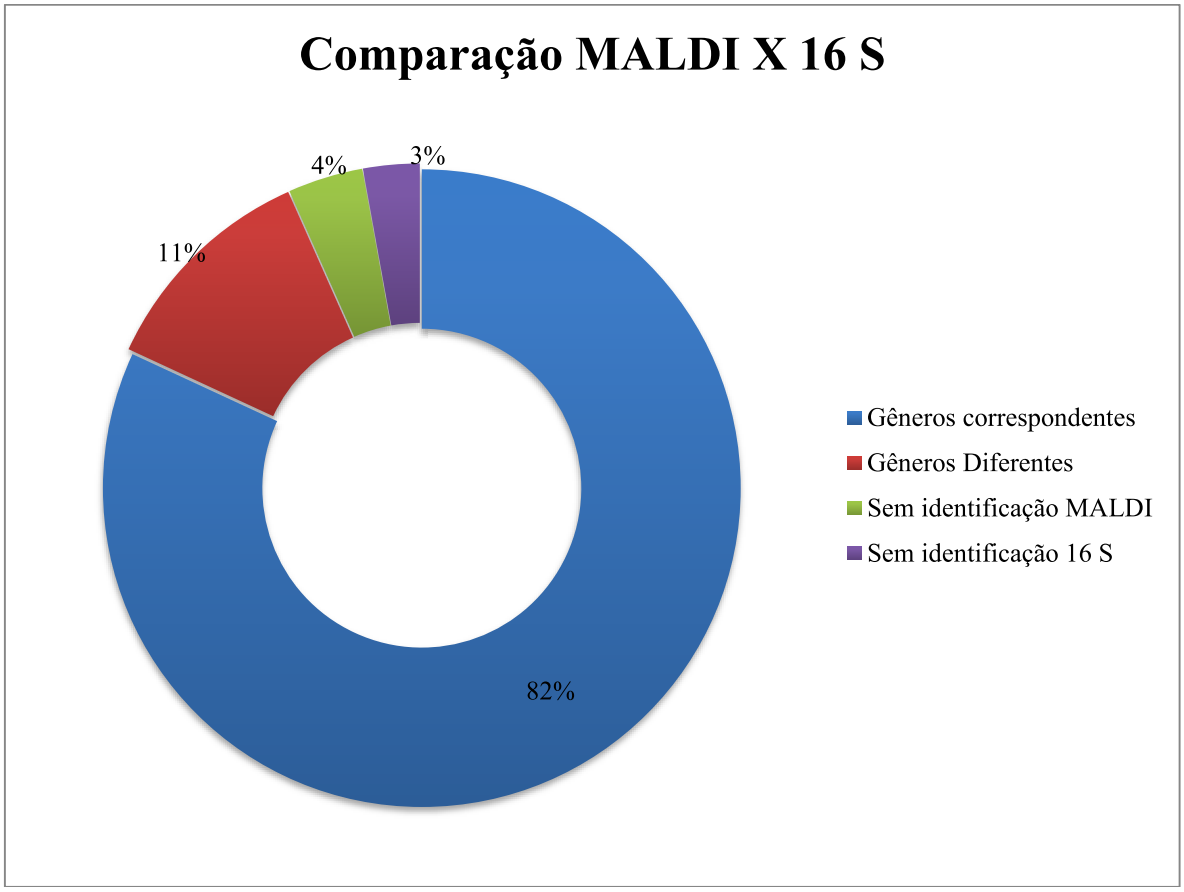


Figura 16 As porcentagens se referem ao total de famílias identificados pela técnica de identificação ribossomal e pela técnica de espectrometria de massas (MALDI- Biotyper), de todos os locais amostrados.

Vale lembrar que o banco de dados do Biotyper é baseado em cepas ATCC, cultivadas em laboratório, além do que, o equipamento é bastante utilizado para diagnósticos hospitalares em caso de infecção causada por bactérias em seres humanos. Em nosso caso, para amostras ambientais, o ideal é a construção de um banco de dados próprio relacionado a uma identificação molecular pelo gene 16S. Assim, com um maior banco de dados, seria possível uma identificação mais acurada de forma rápida, sendo necessário empregar a técnica de identificação do gene 16S apenas em casos em que a identificação apresentasse pontuação baixa.

6.3.1 Construção de Árvore Filogenética a partir dos resultados do MALDI-Biotyper

As cepas identificadas por MALDI TOF foram agrupadas em um dendograma produzido pelo Software do equipamento Biotyper (Bruker Daltonics). Os espectros podem ser descritos, comparados e correlacionados de diversas maneiras, sendo possível classificá-los por seu nível de similaridade e parentesco (FOSTER, 2001).

Este trabalho teve por objetivo, a identificação de algumas bactérias isoladas potencialmente mais promissoras para emprego em biorremediação e/ou bioacúmulo de cobre, não sendo importante, neste momento, a história evolutiva destes isolados. Assim, a construção de um dendograma com os resultados obtidos pelo MALDI-TOF, permite relacionar o grau de similaridade entre as cepas isoladas baseado em sua constituição proteica. O método de análise que foi escolhido para a construção de árvores filogenéticas pertence à escola fenética, ou seja, permite taxonomia numérica. Neste método, a maior importância é dada à similaridade entre os organismos. Quanto maior a proximidade filogenética, maior a semelhança entre eles (ALVES, 2001). O dendrograma da Figura 17, mostra a relação entre as cepas isoladas levando em conta o espectro gerado no MALDI-TOF Biotyper.

O principal problema desta metodologia é que todas as informações contidas em uma sequência ficam reduzidas a números levando à perda de informações da evolução do microrganismo analisado (HORNIK, 2015).

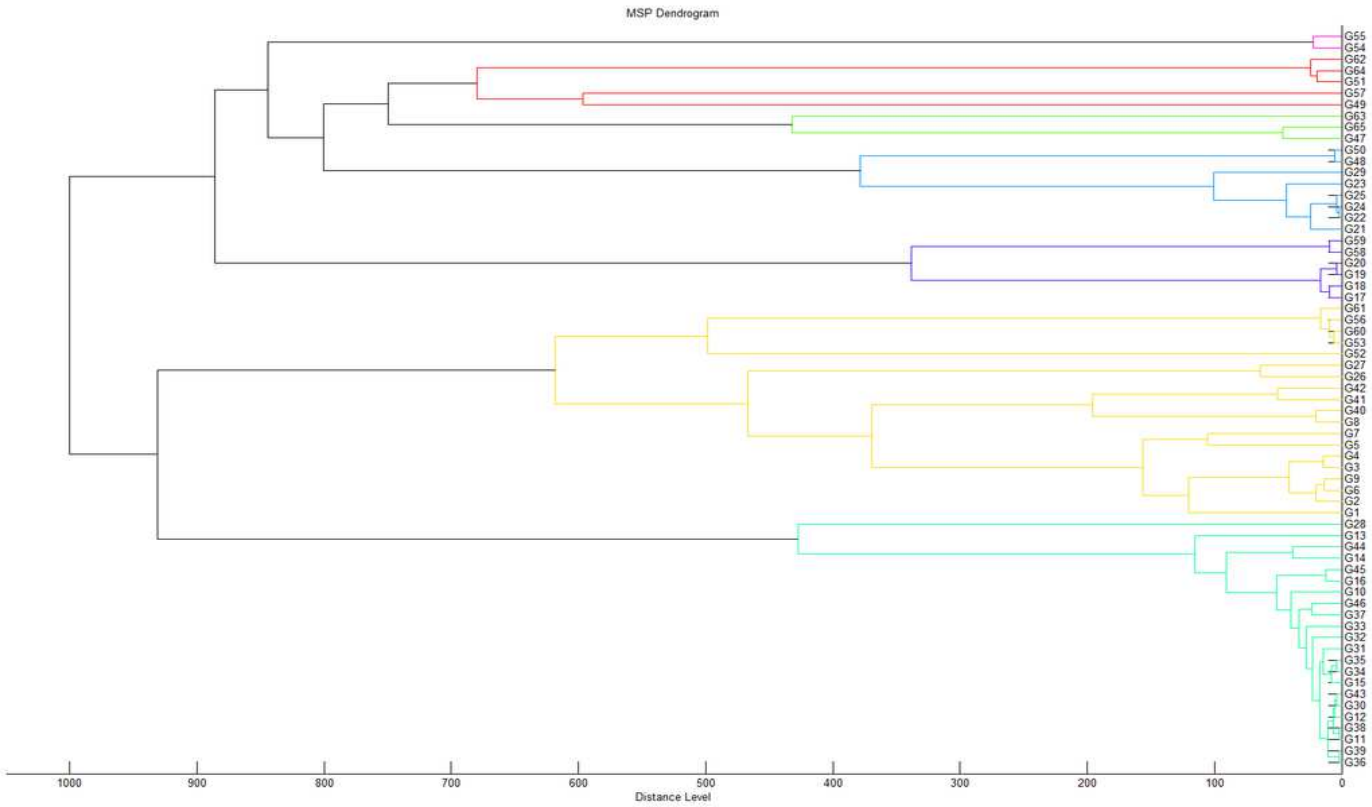


Figura 17 Representação esquemática do dendograma de distância entre as 105 cepas isoladas e identificadas por MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics).

6.4 Padronização do método de quantificação de metais por ICP-OES

Diferentes procedimentos analíticos para digestão ácida das amostras foram testados neste trabalho, considerando que as amostras de solo podem sofrer interferência da matéria orgânica. Deste modo, realizou-se digestão ácida (ácido nítrico) em bloco digestor (método 1), digestão ácida (ácido nítrico) em micro-ondas (método 2) e digestão ácida (água régia) em micro-ondas (método 3). Tais métodos foram comparados e os resultados apresentados na Figura 18, onde todos mostraram uma boa correlação ($R^2 > 0,9$) entre os pontos da curva.

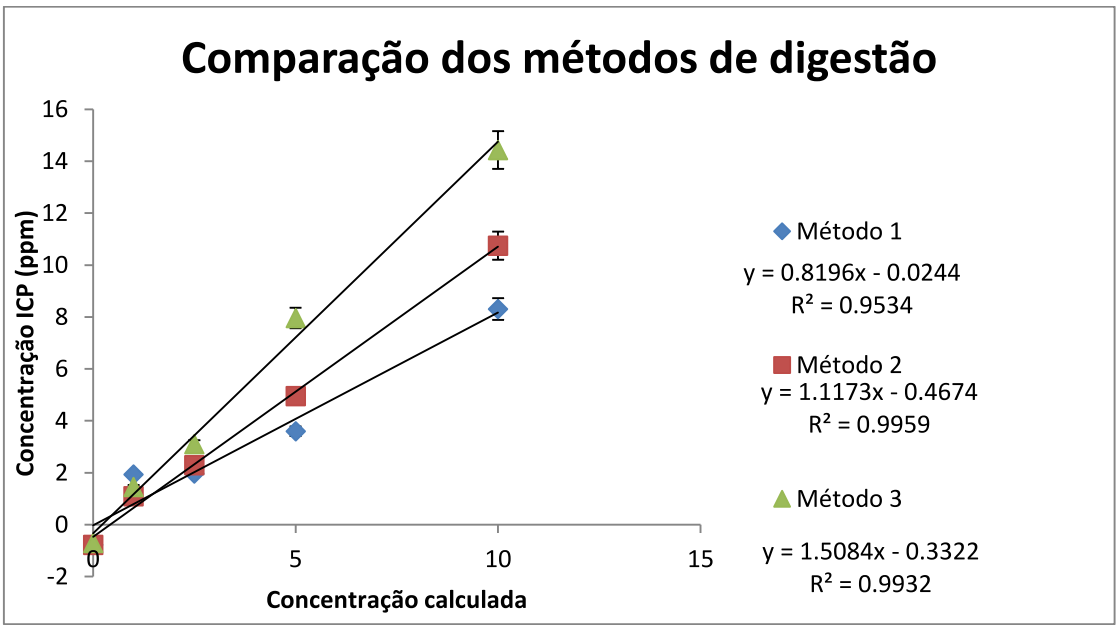


Figura 18 Curva de calibração feita a partir dos 3 métodos de digestão. As concentrações do eixo x e y estão em ppm, sendo que o eixo x é o valor esperado de cobre na amostra e o eixo y é a concentração real mostrada pelo equipamento ICP-OES.

A tabela 3 mostra a média dos pontos de cada método, para uma análise mais detalhada de qual valor está mais próximo do valor calculado. Nota-se que os valores dos pontos do método 2 (micro-ondas e ácido nítrico) encontram-se mais próximos do valor esperado de cobre, quando comparado com os outros métodos. O uso instrumental em laboratório das interações entre micro-ondas e meios sólidos e líquidos tem sido reportado em muitos trabalhos como uma fonte alternativa de energia com resultados positivos não só para misturas digestoras, mas também para extrações, sínteses e microscopia (BOON; KOK, 1988). Estes resultados apoiam-se principalmente na redução do tempo para obtenção dos resultados quando comparados aos métodos tradicionais e são baseados no controle da quantidade de energia incidente, na alta taxa de transferência de energia ao sistema, no controle das condições do meio reacional e na seletividade de interação das ondas eletromagnéticas com espécies químicas polares.

Tabela 3 - Pontos da curva de calibração de cada metodologia de digestão. Os pontos abaixo estão em ppm e são referentes à média aritmética das triplicatas. É importante lembrar que a detecção máxima do equipamento é de 10 ppm, portanto os valores acima desta concentração foram extrapolados utilizando curva de detecção do equipamento.

Pontos Calculados	Método 1	Método 2	Método 3
0,0	-0,77082	-0,77077	-0,70222
1,0	1,93113	1,10166	1,45063
2,5	1,97282	2,29401	3,1016
5,0	3,59992	4,9608	7,96097
10,0	8,30819	10,7477	14,4324

Nos métodos tradicionais de aquecimento, empregando a chapa de aquecimento (método 1), a transferência de calor ocorre somente nas partes da amostra que estão em contato com a fonte de calor e este se propaga pelo meio através de processos de condução, convecção e irradiação. Neste caso, a dispersão de calor por toda a solução eleva lentamente a temperatura do sistema, e o máximo valor de temperatura que pode ser atingido pelo conteúdo fica basicamente limitado ao seu ponto de ebulição e pela pressão ambiente. Por outro lado, o aquecimento promovido por energia das micro-ondas (métodos 2 e 3) é um processo que se dá *in situ*, ou seja, a produção de calor ocorre diretamente em cada molécula de um meio ao interagir com a energia de micro-ondas. Este modo de aquecimento, que vem da propriedade de um campo eletromagnético interagir com partículas carregadas e dipolos (MINGOS;

BAGHURST, 1991) impulsionou o uso da radiação de micro-ondas como uma nova fonte de energia para digestões principalmente por via ácida, sendo empregada na preparação de amostras para determinação de elementos em diversos materiais (KINGSTON; JASSIE, 1988; KINGSTON; HASWELL, 1999).

Enfim, para análises das amostras de experimentos de biossorção, o método escolhido para ser empregado para a digestão das amostras antes de serem analisadas por ICP-OES foi a metodologia 2, que utiliza o micro-ondas e o ácido nítrico (EPA 3015).

6.5 Quantificação de metais nas amostras coletadas

No mês de março de 2014, as amostras coletadas da mina de cobre Sossego (Canaã dos Carajás, PA) foram direcionadas para quantificação de metais além de isolamento bacteriano e estudos de biolixiviação. Os principais pontos de coletas são mostrados na Figura 19, tais pontos foram coletados e armazenados para o isolamento de micro-organismos de água e solo do local.

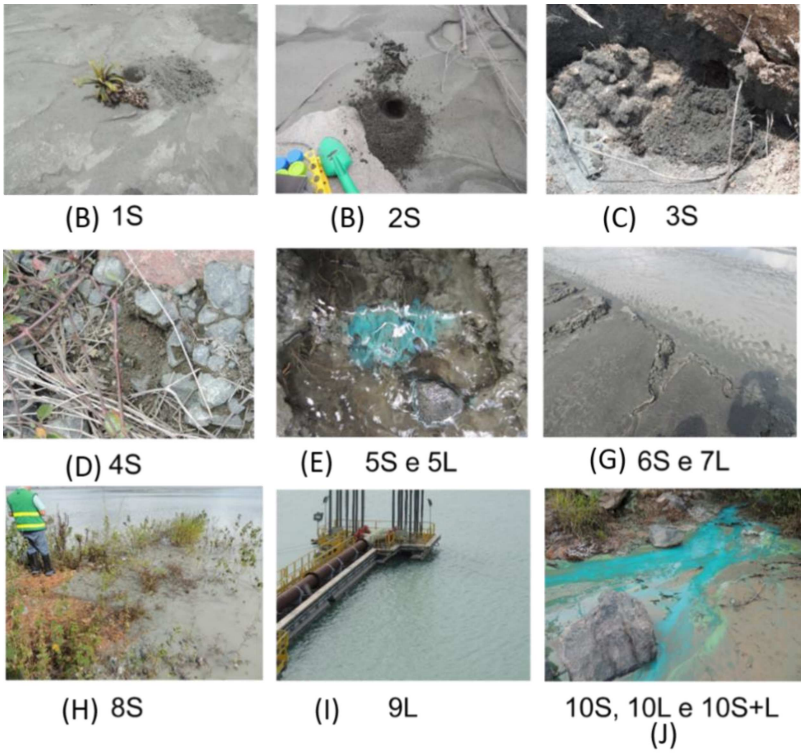


Figura 19. As letras S, L e S+L representam respectivamente amostras sólidas, líquidas e amostras contendo partes sólida e líquida. As amostras de número 13 e 14 são variações do local 10 e a amostra 15 é representativa do fundo da cava de onde se extrai o minério de cobre processado.

Foram conduzidos estudos de caracterização dos metais nas amostras coletadas, os quais permitiram definir a composição mineralógica das amostras e outros parâmetros relevantes ao estudo. Segundo Shimizu (2012), em estudos de caracterização da Mina do Sossego, a calcopirita é praticamente o único minério, e ocorre tanto na forma de micro cristais inclusos nos minerais de ganga quanto como cristais maiores. Com exceção da pirita, os demais sulfetos (calcocita, siegenita e milerita) ocorrem como traços. Os resultados obtidos da concentração de alguns metais nas amostras coletadas estão na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados das análises de metais realizadas pelo ICP-OES. Os valores mostrados já se encontram calculados para a concentração total da amostra. Foram identificadas as respectivas concentrações para cádmio, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco. As Letras S, L e S+L nas amostras significam, respectivamente, *solo, líquido e solo com líquido*.

Amostras líquidas (ppm)

Amostras	**Cd**	**Cr**	**Cu**	**Fe**	**Mn**	**Ni**	**Zn**
Padrão 5 ppm	4,95	4,76	5,06	4,95	4,85	4,75	4,59
9 L	0,9	0,48	0,44	0,47	0,47	0,54	0,99
13 L	0,9	0,48	0,64	0,5	0,56	0,55	0,78
15 L	0,9	0,48	1,43	1,63	0,49	0,56	0,86
Branco digerido	0,9	0,48	0,45	0,48	0,47	0,54	1,58
CONAMA 397/2008 Limite de Efluente	0,2	1,0	1,0	15,0	1,0	2,0	5,0

Amostras sólidas (ppm)

Amostras	**Cd**	**Cr**	**Cu**	**Fe**	**Mn**	**Ni**	**Zn**
1S	11,2	1491,72	32,79	335,09	13,21	20,53	23,31
2S	11	1521,71	31,01	431,14	13,64	20,96	25,7
3S	11,2	1546,51	41,73	593,69	13,81	23,25	22,97
6S	11,3	1508,37	24,76	541,12	13,24	22,6	22,88
8S	11,1	1475,91	20,62	271,85	17,91	19,12	23,82
10S+L	11,2	1488,73	678,99	276,47	15,92	21,59	22,22
13S	11,3	1547,21	207,22	1070,77	20,67	23,58	22,55
14S	11	1509,64	709,68	457,58	16,2	21,1	22,2
*CONAMA 420/2009 Limite Solo Industrial**	20	400	600	-	-	130	200

*Valores em $mg.kg^{-1}$ de acordo com o ANEXO II da Resolução CONAMA 420/2009.

6.6 Determinação da Curva de Crescimento dos isolados bacterianos selecionados

Uma vez que as bactérias podem ter diversos mecanismos de resistência a metais tóxicos, que podem não envolver sua remoção do meio ambiente, como ocorre nos processos de adsorção, a resistência a altas concentrações de $CuCl_2$ não indica que um micro-organismo possa ser aplicado com sucesso para a biorremediação, sendo necessário avaliar além da resistência a capacidade de remoção do metal tóxico de seu ambiente. Para a obtenção de resultados de adsorção mais precisos, faz-se necessário o conhecimento do perfil de crescimento dos isolados. Para isso, foram construídas curvas de crescimento para os isolados selecionados em Meio MJS e seu μ máximo e tempo de duplicação (h) foram calculados, como mostra o gráfico na Figura 20 e 21 e a tabela 5.

Tabela 5 - Velocidade Máxima de Crescimento ($\mu_{máx}$ em abs por hora) das Cepas selecionadas e o Tempo de duplicação (g em horas), o tempo de duplicação é calculado a partir da divisão do ln 2 pelo $\mu_{máx}$ observado em cada cepa.

Cepa isolada	**Velocidade máxima ($\mu_{máx}$)**	**Tempo de duplicação (h)**
Acinetobacter sp.	0,4916	1,4
Burkholderia sp.	0,3975	1,7
Cupriavidus sp.	0,297	2,3

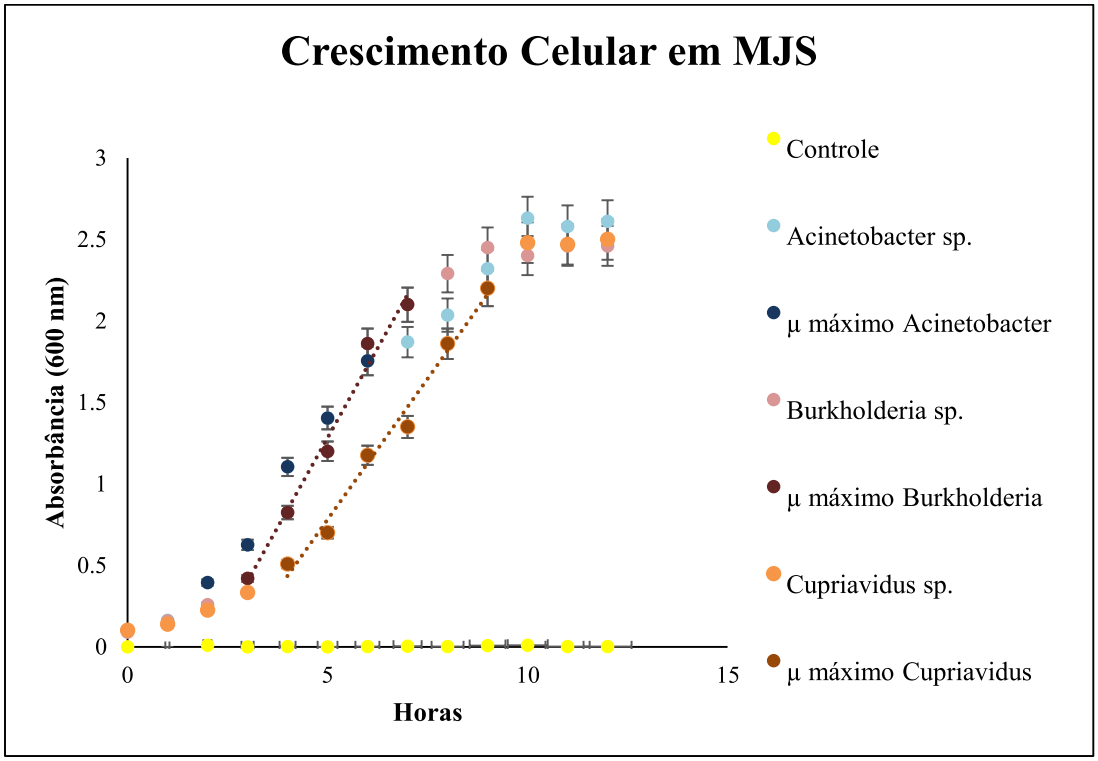


Figura 20 Curva de Crescimento dos isolados em meio MJS. O gráfico mostra as diferentes fases de crescimento das bactérias utilizadas para a adsorção de metais, Em pontilhado estão os pontos utilizados para o cálculo da velocidade máxima de crescimento (plotados na Figura a seguir).

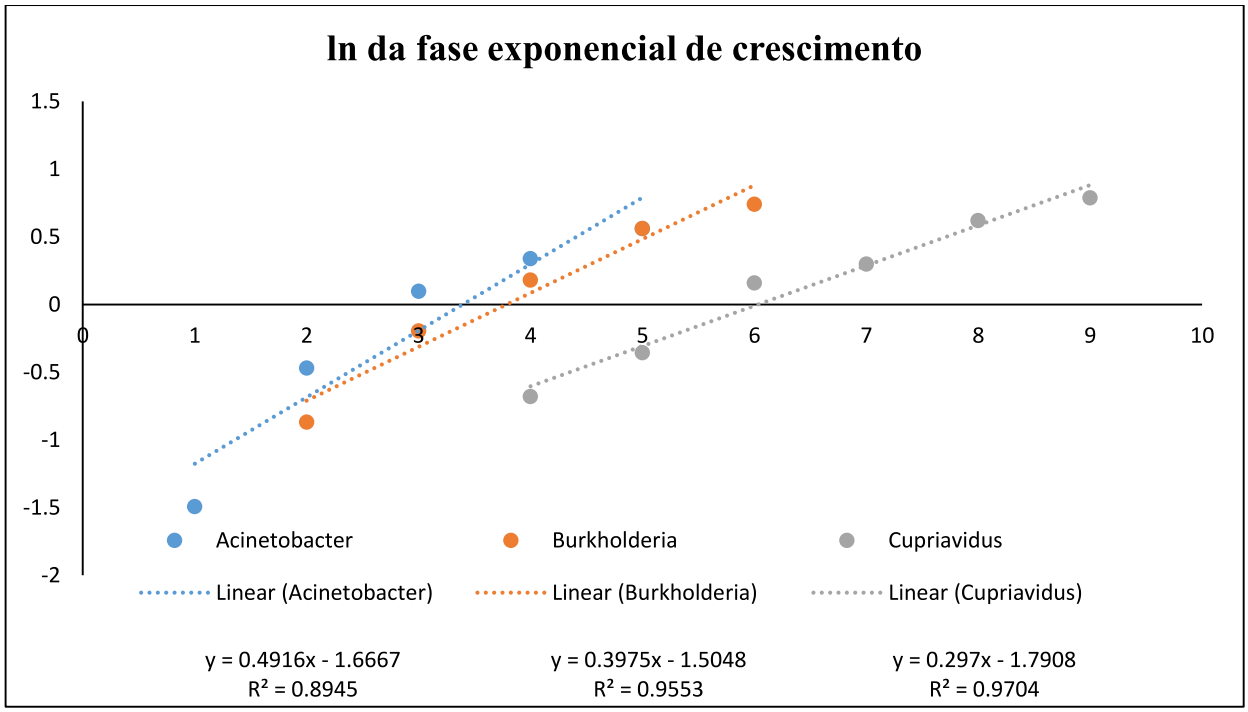


Figura 21 O gráfico mostra a equação utilizada para o cálculo da velocidade máxima de crescimento (µ máximo) de cada cepa isolada. O µ máximo é a inclinação da reta utilizando os pontos em fase exponencial (portanto se y=Ax + B, o valor referente ao µ máximo é o valor de A).

6.7 Teste de concentração inibitória mínima de metais tóxicos – (MIC)

Para estabelecer um perfil de resistência de todas as cepas isoladas, foi avaliada a mínima concentração inibitória de cobre em diferentes concentrações, numa mesma condição de cultivo, e os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Crescimento celular em diferentes concentrações de cobre, visualizados após 24, 48, 72 e 120 horas. O sinal (+) significa que houve crescimento celular. A coluna nomeada como "isolados", contém as seguintes informações: tipo de amostra que foi isolada (S) Solo ou (L) líquida, seguido do ponto de coleta; a quantidade de cobre que foi isolada previamente e o número de isolados com a mesma característica.

.

Número da Cepa	**Isolados**	**Concentração de $CuCl_2$ [mM]**					
		0	**1**	**2,5**	**5**	**7,5**	**10**
1	S4.10.1	+	+	+			
2	S6.2,5.2	+	+	+			
3	S11.10.1	+	+	+			
4	S13.7,5.1	+	+	+			
5	L14.7,5.1	+	+	+			
6	S15.7,5.1	+	+	+			
7	S15.5.1	+	+	+			
8	L16.5.1	+	+	+			
9	L16.7,5.2	+	+	+			
10	S17.5.1	+	+	+			
11	S17.7,5.1	+	+	+			
12	S18.10.1	+	+	+			
13	L1.5.1	+	+	+			
14	S5.10.1	+	+	+			
15	S5.10.2	+	+	+			
16	S5.10.3	+	+	+			
17	S5.10.4	+	+	+			
18	S6.2,5.1	+	+	+			
19	S12.10.1	+	+	+			
20	SBete1.5.1	+	+	+			
21	SBete1.5.3	+	+	+			

Número da Cepa	Isolados	Concentração de $CuCl_2$ [mM]					
		0	1	2,5	5	7,5	10
22	SBete1.2,5.1	+	+	+			
23	SBete1.2,5.2	+	+	+			
24	SBete2.2,5.1	+	+	+			
25	SBete2.2,5.2	+	+	+			
26	SBete2.2,5.3	+	+	+			
27	LBete3.5.1	+	+	+			
28	LBete3.5.2	+	+	+			
29	LBete3.2,5.1	+	+	+			
30	SBete4.7,5.1	+	+	+			
31	LN.2,5.1	+	+	+			
32	SO.2,5.1	+	+	+			
33	SO.1.1	+	+	+			
34	LP.2,5.1	+	+	+			
35	LP.1.1	+	+	+			
36	SQ.2,5.1	+	+	+			
37	SR.2,5.1	+	+	+			
38	SS.5.1	+	+	+			
39	ST.2,5.1	+	+	+			
40	LY.2,5.1	+	+	+			
41	LY.1.1	+	+	+			
42	L1.7,5.1	+	+	+			
43	L1.5.1	+	+	+			
44	S2.7,5.1	+	+	+			
45	S2.5.1	+	+	+			
46	S3.5.1	+	+	+			
47	L4.2,5.1	+	+	+			
48	S5.5.1	+	+	+			
49	L8.5.1	+	+	+			
50	S9.2,5.1	+	+	+			
51	L10.5.1	+	+	+			
52	L10.2,5.1	+	+	+			
53	L11.5.1	+	+	+	+	+	
54	S12.10.1	+	+	+			
55	S12.7,5.1	+	+	+			
56	L13.7,5.1	+	+	+			
57	S14.7,5.1	+	+	+	+		

Número da Cepa	Isolados	Concentração de $CuCl_2$ [mM]					
		0	1	2,5	5	7,5	10
58	L15.5.1	+	+	+			
59	S16.7,5.1	+	+	+	+		
60	L17.5.1	+	+	+			
61	L18.5.1	+	+	+	+	+	
62	L18.2,5.1	+	+	+	+	+	
63	L19.5,1	+	+	+	+	+	
64	S12.5.1	+	+	+	+		
65	S13.2,5.1	+	+	+	+	+	
66	S14.1.1	+	+	+	+	+	
67	S14.2,5.1	+	+	+	+		
68	S15.5.1	+	+	+	+		
69	S15.7,5.1	+	+	+	+	+	
70	S16.2,5.1	+	+	+			
71	S16.2,5.2	+	+	+			
72	S16.2,5.3	+	+	+	+	+	
73	L17.1.1	+	+	+	+		
74	L17.1.2	+	+	+			
75	L17.1.3	+	+	+			
76	L17.2,5.1	+	+	+			
77	L17.2,5.2	+	+	+			
78	S18.2,5.1	+	+	+			
79	S18.2,5.2	+	+	+			
80	S18.2,5.3	+	+	+			
81	S18.2,5.4	+	+	+			
82	L19.2,5.1	+	+	+			
83	L19.2,5.2	+	+	+			
84	L20.2,5.1	+	+	+			
85	L21.1.1	+	+	+			
86	L21.2,5.1	+	+	+			
87	S3.1.1	+	+	+	+		
88	S3.1.2	+	+	+	+		
89	S3.1.3	+	+	+	+		
90	S6.1.1	+	+	+	+		
91	S6.1.2	+	+	+	+	+	
92	L7.1.1	+	+	+	+		
93	L13.1.1	+	+	+	+		

Número da Cepa	Isolados	Concentração de $CuCl_2$ [mM]					
		0	**1**	**2,5**	**5**	**7,5**	**10**
94	S1.2,5.1	+	+	+	+		
95	S1.2,5.2	+	+	+	+		
96	S1.2,5.3	+	+	+	+		
97	S3.2,5.1	+	+	+	+		
98	L7.2,5.1	+	+	+	+		
99	L9.2,5.1	+	+	+	+		
100	L13.2,5.1	+	+	+	+		
101	S14.2,5.1	+	+	+	+		
102	S4.5.1	+	+	+	+	+	
103	S14.5.1	+	+	+	+		
104	S4.7,5.1	+	+	+	+	+	
105	S5.10.1	+	+	+	+	+	

Todas as cepas isoladas neste trabalho são resistentes a cobre em uma concentração de 2,5mM, não interferindo no seu crescimento em 24 h. A partir de uma concentração de 5 mM de cobre 31% das cepas são resistentes e conseguem crescer em 72h. Destas, apenas 11 % das cepas isoladas são capazes de crescer em uma concentração de 7,5 mM de cobre (cepas de números 53, 61, 62, 63, 65, 66, 69, 72, 91, 102, 104 e 105) (Figura 22).

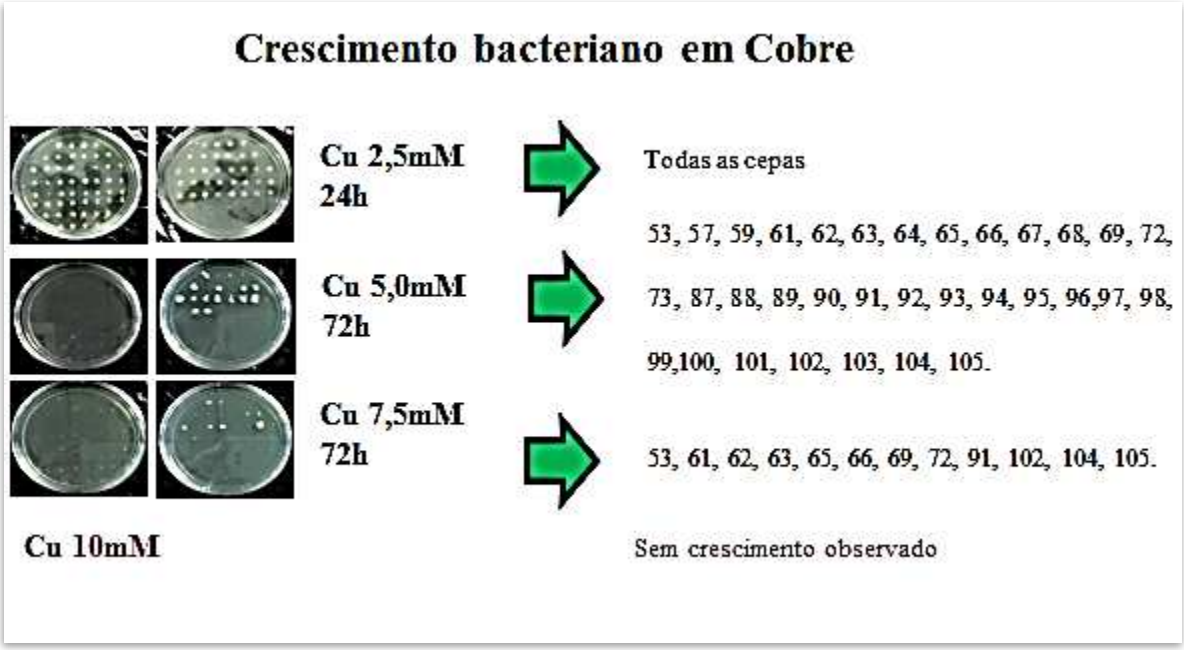


Figura 22 Crescimento celular em diferentes concentrações de cobre, visualizados após 24, 48, 72 e 120 horas. Os números ao lado direito são referentes as cepas que apresentaram crescimento em tais concentrações de cobre.

Comparando-se o MIC das bactérias isoladas no presente trabalho com as mínimas concentrações inibitórias obtidas de alguns micro-organismos vistos na literatura (Tabela 7), pode-se observar que a resistência ao cobre apresentada pelos isolados, encontra-se bastante acima daquelas obtidas para outros micro-organismos, evidenciando o elevado potencial para aplicação em processos de biossorção. O fato dessas linhagens serem isoladas do próprio meio-ambiente, possibilita sua aplicação em processos de biorremediação *in loco*, uma vez que não apresentam nenhum tipo de alteração genética e, portanto, apresentam menor risco à microbiota local quando reintroduzidas no meio ambiente.

Tabela 7 - Mínima concentração inibitória de cobre no crescimento microbiano de bactérias encontradas na literatura.

Micro-organismo	**MIC Cu^{+2}**
Pantoea stewartii DSM 30176	1.5
Sphingomonas panni DSM 15761	2.0
S. panni R65P	0.75
S. haemolyticus L70	2.0
Staphylococcus epidermidis DSM 20044	1.0

Micro-organismo	MIC Cu^{+2}
S. epidermidis L77	1.5
S. warnerii L47	2.0
Brachybacterium conglomeratum DSM 10241	0.5
B. conglomeratum N96	0.5
Micrococcus luteus DSM 20030	2.0
M. luteus L51	1.5
Kocuria marina JCM 13363	2.0
K. marina L73	2.0
K. palustris R40	0.75

*Fonte: Espírito.

Uma vez que as células podem crescer na presença de concentrações significativas de metais e, devido à elevada capacidade de biossorção de metais em condições aeróbias, estas bactérias podem ser potencialmente aplicáveis em biorremediação in situ de sistemas aquosos contaminados por metais tóxicos.

As cepas que cresceram em 7,5 mM de cobre passaram por uma seleção a fim de eleger as mais aptas para o estudo de biossorção quanto aos mecanismos de biossorção e dessorção de cobre, os efeitos do pH nestes mecanismos, além de serem testadas frente a outros metais tóxicos.

6.8 Teste de seleção prévia dos micro-organismos mais resistentes

As células que cresceram na presença de 7,5 mM de cobre nos testes de MIC tem maiores chances de serem bons biossorventes, porém é possível que a sua relação com o metal não seja quelante, mas apenas um mecanismo de resistência que faz com que o metal não cause danos ao metabolismo celular e a célula consiga se reproduzir.

Para selecionar as bactérias com maior potencial de adsorção, dentre as cepas que cresceram a 7,5 mM de cobre, foi montado um experimento contendo 100 ppm de cobre e depois re-adicionado o equivalente a 500 ppm do metal e medido a concentração de cobre no meio após 24 h (Figura 23).

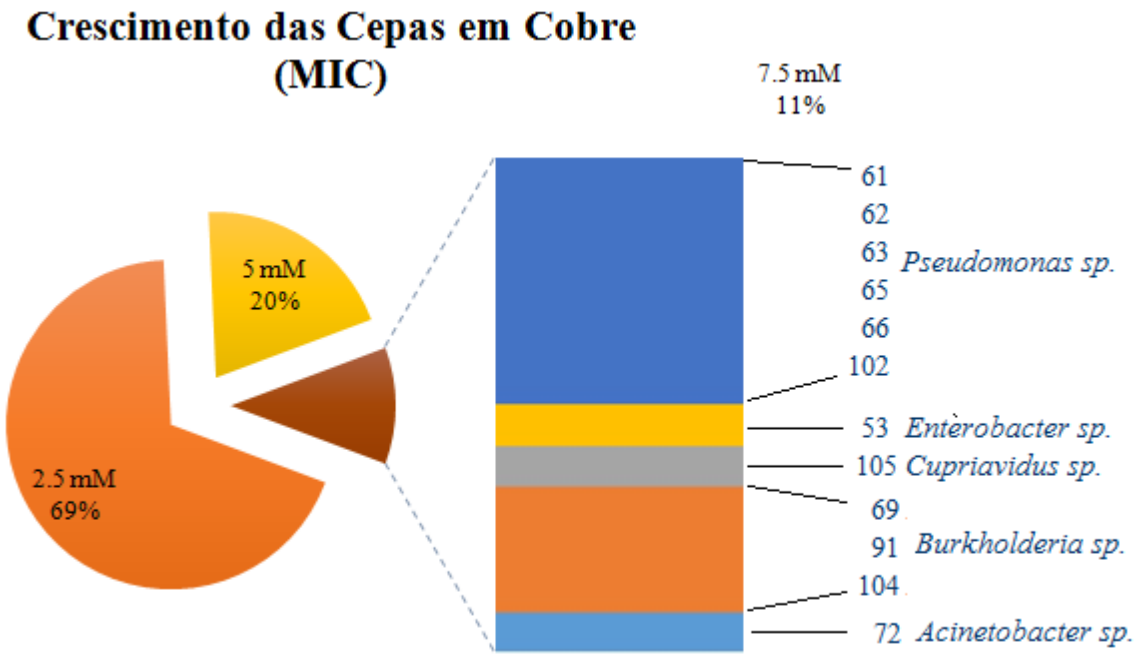


Figura 23 O gráfico mostra as porcentagens dos MIC das cepas em diferentes concentrações de cobre, e as cepas que compõem o seleto grupo das que são resistentes a 7,5 mM de cobre

A Figura 24 mostra os resultados de tais cepas frente ao metal. É possível verificar que as cepas da família *Burkholderiaceae* (104, 91 e 105) foram as mais eficientes na remoção de metal, seguido das *Pseudomonadaceae, Moraxellaceae* e *Enterobacteriaceae*. As famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, já foram amplamente estudadas em outros trabalhos e sua relação frente aos metais já é bem conhecida e seu mecanismos bem detalhados, por isso tais cepas não foram escolhidas para um estudo de adsorção.

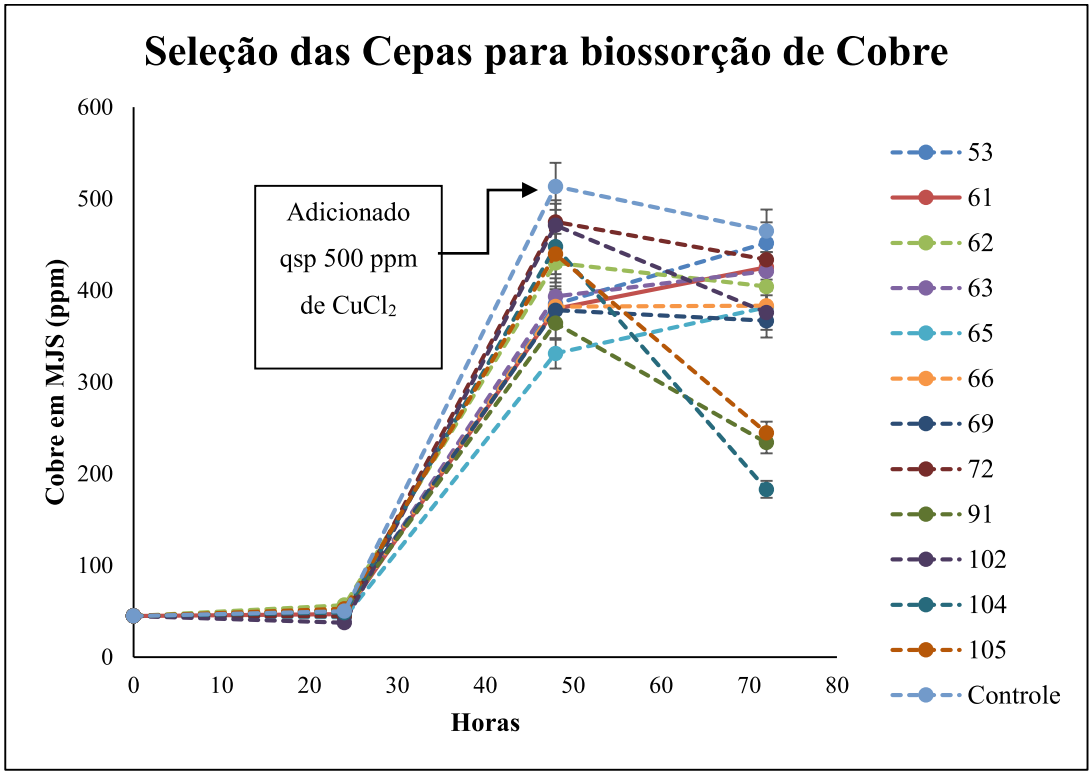


Figura 24 Teste para seleção de cepas mais eficientes na adsorção do cobre. O experimento foi feito em meio MJS e 100ppm de cobre, a 28 ºC e 180 rpm. Foram adicionados mais 500ppm do metal após 24h de experimento para verificação da capacidade de adsorção de cada uma das cepas testadas.

As cepas escolhidas foram a 104 (por ter a melhor adsorção de cobre) sendo pertencente à família *Burkholderiaceae* e gênero *Burkholderia*, a cepa de número 105 (por apresentar um bom desempenho), e apesar de ser da mesma família que a cepa anterior, é pertencente à um gênero diferente (*Cupriavidus*) e a cepa 72 por ser a única pertencente à família *Moraxellaceae* e gênero *Acinetobacter*.

Tais cepas foram estudadas quanto aos mecanismos de biossorção e dessorção de cobre, os efeitos do pH nestes mecanismos, além de uma delas (*Burkholderia sp,* cepa número104) ser testada frente a outros metais tóxicos (níquel e cádmio).

6.9 Determinação da Massa Seca das bactérias selecionadas para a biossorção

A fim de determinar o peso seco da cultura microbiana, as bactérias escolhidas para os experimentos de biossorção foram filtradas em um sistema de filtração a vácuo e o peso inicial e final de filtros de membranas de 0,22 µm foram secos em micro-ondas e pesados.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, e as médias aritméticas foram utilizadas para comparar o valor de massa seca de cada absorbância (600 nm), as figuras a seguir mostram a relação entre o peso seco de biomassa de *Acinetobacter sp.* (Figura 25), *Burkholderia sp.* (Figura 26) e *Cupriavidus sp.* (Figura 27) e a sua OD em 600 nm, e as equações de conversão.

A partir da massa seca é possível estimar o peso da amostra de bactérias, a partir de sua absorbância em espectrofotômetro. As equações de conversão foram utilizadas a fim de separar uma mesma quantidade (em gramas) de biomassa para os experimentos de adsorção com metais.

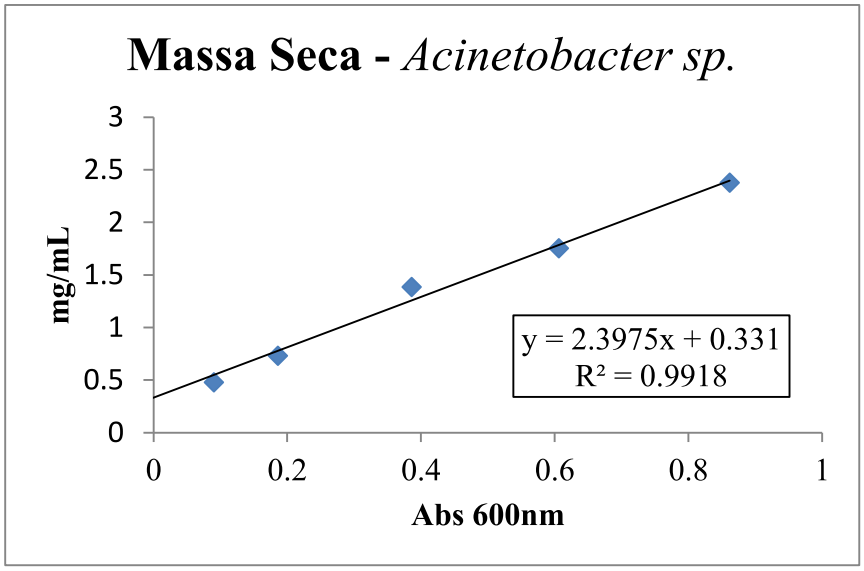


Figura 25 Relação entre o peso seco de biomassa de *Acinetobacter sp.* e a sua absorbância em 600 nm, e a equação de conversão.

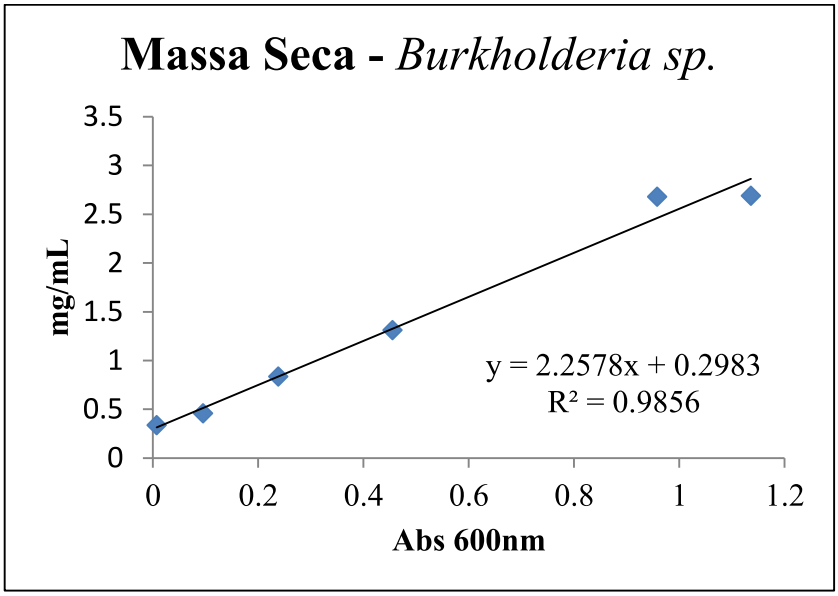


Figura 26 Relação entre o peso seco de biomassa de *Burkholderia sp.* e a sua absorbância em 600 nm, e a equação de conversão.

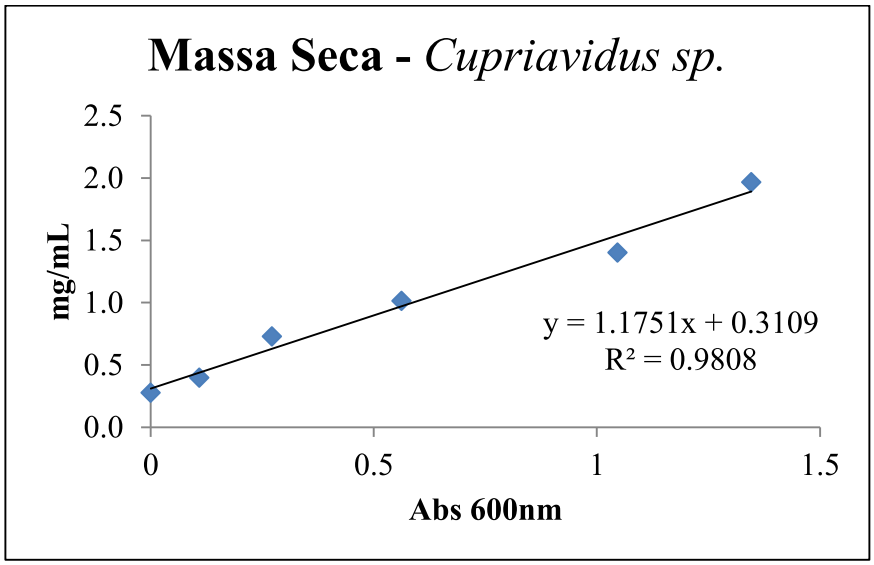


Figura 27 Relação entre o peso seco de biomassa de *Cupriavidus sp.* e a sua absorbância em 600 nm, e a equação de conversão

6.9.1 Influência do pH na biossorção de cobre

O ajuste do pH é uma condição necessária para a solubilização dos compostos metálicos (LEAHY; SCHWARZ, 2009). A maioria dos micro-organismos utilizados em processos de biolixiviação são acidófilos e, obviamente, dependentes do ambiente ácido para sua sobrevivência. Por isso, os experimentos foram estudados em pHs 7,5 e 2,0 (partindo de pH neutro a ácido, portanto experimentos em pH alcalino não foram feitos).

As figuras a seguir mostram a influência do tempo de contato em relação a biossorção de metal nos três pH estudados. Na Figura 28 verifica-se uma rápida adsorção de cobre logo na primeira hora de experimento, corroborando os experimentos feito por Salvadori et al. (2013). Após 7 horas de experimento as biomassas mortas de *Acinetobacter sp.*, *Burkholderia sp.* e *Cupriavidus sp.* demonstraram uma melhor adsorção de cobre quando comparadas às respectivas biomassas frescas. O estudo feito por Salvadori et al. (2013) demonstrou uma adsorção máxima de cobre por biomassa morta maior do que a comparada a biomassa fresca de *H. lixii (*19,9 $mg.g^{-1}$ e 7,2 $mg.g^{-1}$ respectivamente), tal fato pode ser explicado devido ao processo de adsorção em Tris-HCl ser estritamente físico-químico, não havendo fonte de carbono que favoreça a biomassa viva, favorecendo então a biomassa morta, pois tais amostras contém proteínas desnaturadas, que expõe uma maior superfície de contato, favorecendo assim, a adsorção.

Na literatura, o pH ótimo para a adsorção de metais gira em torno de 5,0. Experimentos feitos por Voss & Thomas (2001) mostraram que alteração do pH de 5,0 para 3,0 diminui a quantidade de cobre adsorvido por *Pseudomonas sp. e Bacillus sp.*. Este fato é observado também nos experimentos realizados neste trabalho (Figuras 28 e 29). Dentre os diferentes pH estudados, a melhor adsorção ocorre no pH 5,0 (Figura 29), onde 31,4 mg de cobre é adsorvido por grama de célula morta de *Burkholderia sp.* após 7 horas de experimento, demonstrando uma melhor adsorção quando comparada com os experimentos de pH 7,0 e 2,0 com adsorção de 18,9 mg. g^{-1} e 22,3 $mg.g^{-1}$ respectivamente (Figuras 28 e 30).

Um fato interessante observado nos experimentos de pH 5, é que as células vivas e mortas de *Cupriavidus* tiveram praticamente a mesma eficiência de adsorção de cobre após 7 horas de experimento, não havendo grande diferença entre os dois tipos de tratamentos de biomassa.

Em todos os pHs estudados, observa-se uma melhor adsorção da biomassa morta de *Burkholderia sp.*, seguido da cepa de *Acinetobacte*r *sp.* e *Cupriavidus sp.* (sendo que a eficiência de adsorção de cobre da biomassa morta de todas as cepas estudadas foi superior à biomassa fresca da mesma cepa). Para os experimentos com outros metais foi escolhida a cepa de *Burkholderia sp.* e seus diferentes tratamentos de biomassa, a fim de testar sua eficiência frente ao níquel e ao cádmio, tais resultados serão mostrados adiante, neste mesmo trabalho.

Dentre as cepas estudadas neste trabalho, a biomassa de *Cupriavidus sp.* obteve o pior desempenho na adsorção de cobre quando comparada as demais espécies em todos os pHs, porém o gênero *Cupriavidus* é conhecido na literatura pela sua resistência a íons metálicos (BIONDO, 2008). O que pode ter acontecido neste trabalho é a inadequação de condições ótimas de cultivo, pois o desenho experimental não inclui a otimização do processo (como por exemplo, complementação nutricional e ajuste da temperatura). Tais condições elevariam não apenas a produção de biomassa, mas também poderiam acarretar na elevação da adsorção dos íons de cobre pela célula.

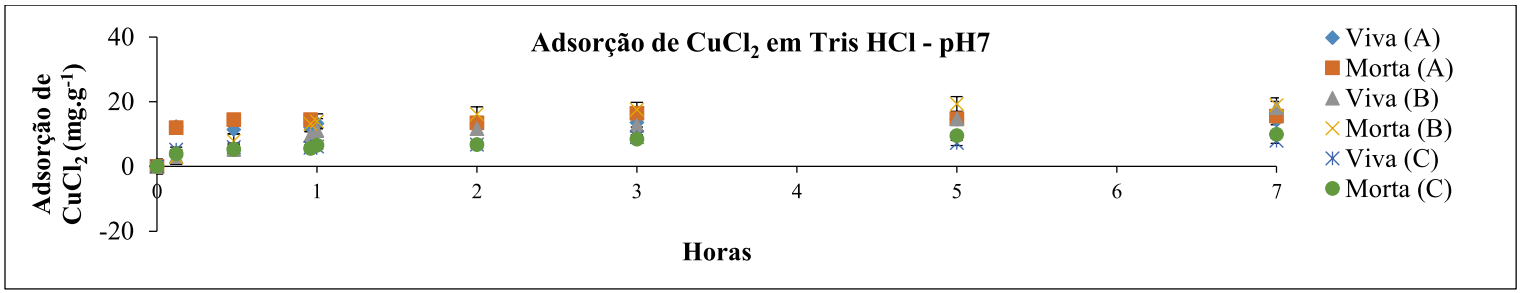


Figura 28

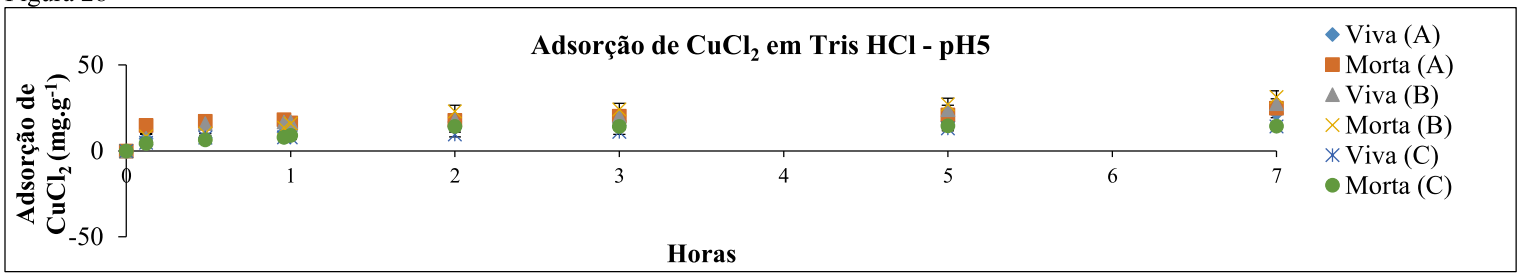


Figura 29

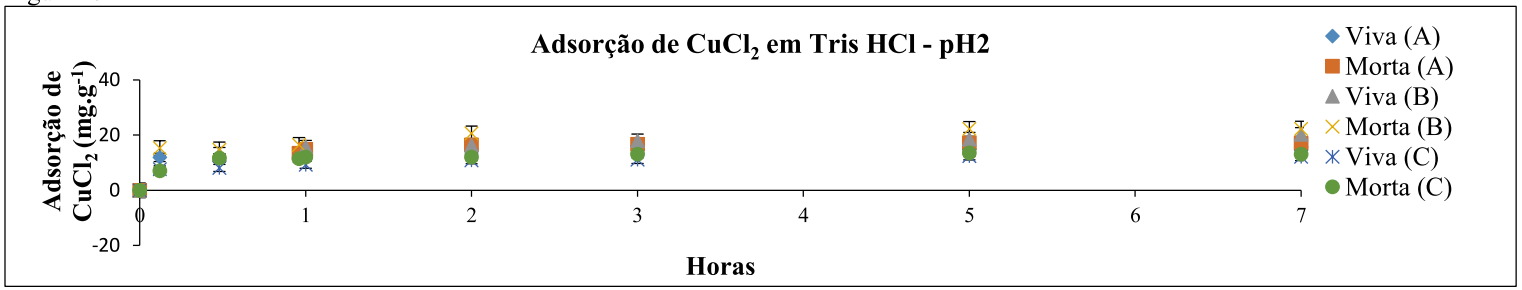


Figura 30

Figuras 28 a 30 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 100 $mg.L^{-1}$ de $CuCl_2$ em 10 mM de Tris-HCl pH 7,0 (Figura 28); pH 5,0 (Figura 29) e pH 2,0 (Figura 30). As biomassas vivas e mortas das células de *Acinetobacter sp.* (A), *Burkholderia sp.* (B) e *Cupriavidus sp.* (C) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES.

A Figura 31 mostra a influência do pH nos diferentes experimentos de adsorção de cobre. Como falado anteriormente, o pH mostra ser uma variável importante no processo de adsorção de cobre, e foi verificado que nos experimentos com Tris-HCl, o pH 5,0 é o ideal para a adsorção, corroborando assim, experimentos feitos por Voss & Tomas (2011).

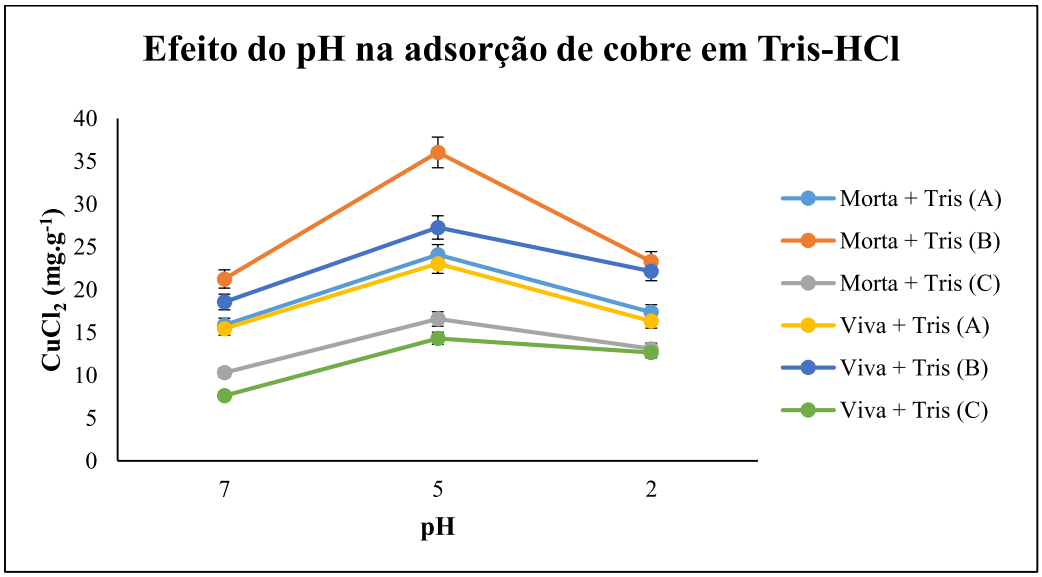


Figura 31 Efeito do pH na adsorção de cobre. Os experimentos foram feitos em Tris-HCl e em diferentes pHs (7,0; 5,0 e 2,0) a uma concentração de 100 $mg.L^{-1}$. As biomassas vivas e mortas das células de *Acinetobacter sp.* (A), *Burkholderia sp.* (B) e *Cupriavidus sp.* (C) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES após 24 horas de tempo de contato.

A fim de testar a eficiência de adsorção de cobre pelas células vivas e viáveis das cepas estudadas, foi montado um experimento em meio TSM (meio mínimo contendo fonte de carbono). Em geral, todas as espécies em meio TSM (Figura 32) foram melhores biossorventes que os experimentos com Tris-HCl, não importando o pH. O resultado deve-se as cepas estarem metabolicamente ativas e assim ocorre o aumento da sua biomassa, colocando este grupo a frente dos demais estudados (células vivas e mortas em Tris-HCl).

A melhor eficiência de adsorção de cobre em TSM observada foi em pH 7,0 (Figura 32). Este fato se deve porque o pH ótimo de crescimento das bactérias selecionadas no trabalho (*Acinetobacter sp.*, *Burkholderia sp.* e *Cupriavidus sp.*) gira em torno de tal pH (MAGRI et al., 2013). Neste experimento novamente é visualizado uma melhor adsorção das cepas de *Burkholderia sp.* (pH 7,0) fato já esperado devido ao seu bom desempenho nos experimentos de resistência (MIC), adsorção prévia e adsorção em Tris HCl (em todos os pHs).

Diferente dos experimentos em Tris-HCl, após 7 horas de experimento com TSM, as cepas de *Cupriavidus sp.* mostraram melhor eficiência de adsorção do que as cepas de *Acinetobacter sp.* Em *Acinetobacter sp.* verifica-se uma diminuição da eficiência de adsorção após atingir seu máximo, fato melhor observado em pH 5,0 (quadrado laranja da Figura 32) mas que se repete em outros pHs (ver pH 7,0 e 2,0 de *Acinetobacter sp.*, na Figura 32). Tal fato deve-se ao mecanismo de resistência desta bactéria ao metal, que transforma a forma do cobre em uma forma menos tóxica à bactéria e assim ocorre a dessorção espontânea (MONCHY et al., 2006).

As cepas em geral tiveram uma melhor eficiência de adsorção, em meio TSM pois tais bactérias, por serem isoladas de uma área de processamento de cobre, possuem uma grande probabilidade de terem genes de resistência a metais. Em geral, são admitidos seis mecanismos envolvidos na resistência a metais: exclusão de metais por barreira de permeabilidade, transporte ativo de metais através da célula/organismo; sequestro intracelular de metais por proteínas de ligação; sequestro extracelular; detoxificação enzimática do metal para forma menos tóxica; redução da sensibilidade dos metais de alvos celulares (Rouch *et al.* 1995; Perpetuo *et al.* 2011).

Segundo Rensing & Grass, (2003) e Monchy et al. (2006), o mecanismo básico de resistência a cobre por *Cupriavidus sp.,* comum a várias bactérias, é composto pelos genes copSR copABCD. Os genes copS e copR codificam uma histidina quinase e um regulador de resposta, respectivamente, que controlam a expressão dos genes copABCD. Quando há falta de cobre e a CopA (captação de cobre) é ativada, ou quando há excesso de cobre e a CopB (extrusão de cobre) é ativada (Odermatt & Solioz, 1995). O gene de resistência ao cobre é codificado pelos *cop* genes (*cop*A, *cop*B, *cop*C e *cop*D) no gênero *Cupriavidus*. O gene *cop*A que codifica uma oxidase multi-cobre é um dos genes determinantes envolvidos no mecanismo de resistência ao cobre em bactérias *Gram* negativas. Ele é responsável por codificar uma oxidase que oxida o cobre I para uma forma menos tóxica, o cobre II (RADEMACHER; MASEPOHL, 2012). As proteínas CopB e CopC estão envolvidas na ligação de íons livres Cu^{+1}/Cu^{+2} no periplasma. CopD forma um canal na membrana interna, permitindo o transporte de íons Cu^{+2} para o citoplasma.

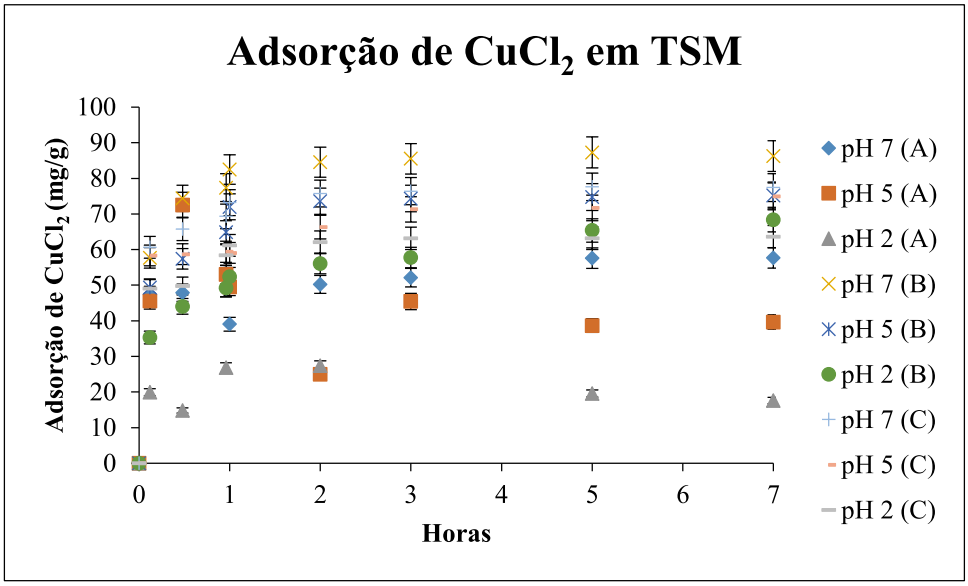


Figura 32 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 100 mg.L^{-1} de $CuCl_2$ em TSM nos diferentes pHs estudados. As células viáveis de *Acinetobacter sp.* (A), *Burkholderia sp.* (B) e *Cupriavidus sp.* (C) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram digeridas e analisadas em ICP-OES.

A Figura 33 mostra a influência do pH nos experimentos de adsorção de cobre de massas vivas em TSM após 24 horas de experimento. Diferente dos experimentos em Tris-HCl, discutido anteriormente, o pH ótimo para a adsorção de cobre foi 7,0 enquanto para os experimentos em Tris-HCl o pH ótimo foi 5,0. A diferença entre os dois experimentos é que a bactéria se encontra metabolicamente ativa e, portanto, sua maquinaria celular se mostra mais eficiente no pH ótimo de crescimento bacteriano.

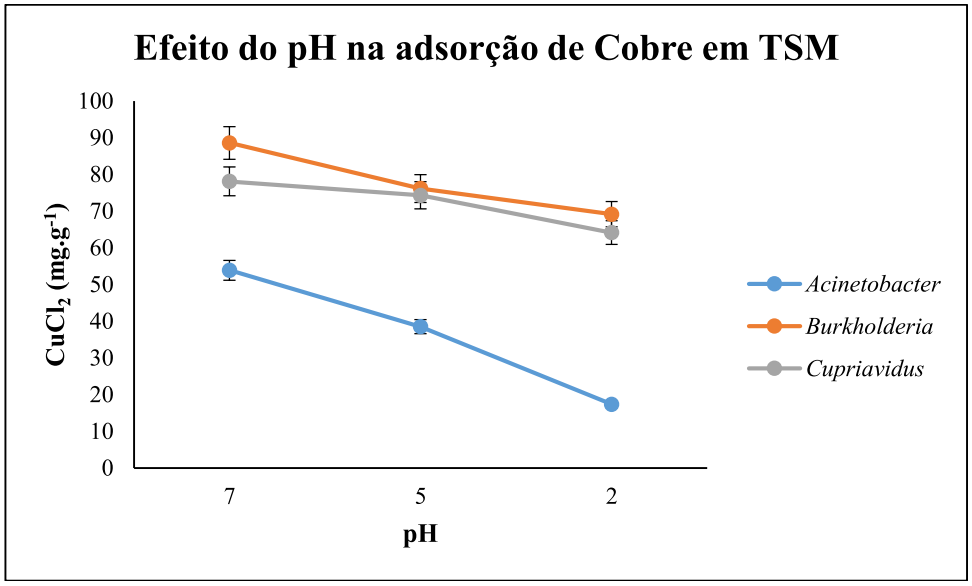


Figura 33 Efeito do pH na adsorção de cobre. Os experimentos foram feitos em TSM e diferentes pHs (7,0; 5,0 e 2,0) e concentração de 100 mg.L^{-1}. As biomassas vivas das células de *Acinetobacter sp.*, *Burkholderia sp.* e *Cupriavidus sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES após 24 horas em solução.

6.10 Teste de adsorção, dessorção e ressorção de cobre

Para os experimentos de adsorção e dessorção, as células das cepas selecionadas (*Acinetobacter sp, Burkholderia sp e Cupriavidus sp*) foram crescidas em meio MJS até sua fase exponencial. Tais culturas foram divididas em 2 conjuntos de subculturas idênticas: massa morta e viva (testada em Tris-HCl e TSM). Assim, 1 g.L^{-1} de biomassa foi utilizada para adsorver 100 ppm de $CuCl_2$ e sua adsorção foi analisada em ICP-OES após 24 horas. As Figuras 34, 35 e 36 mostram a eficiência de adsorção (colunas amarelas) e o reaproveitamento da mesma massa celular na ressorção do metal (colunas azuis), das diferentes cepas em 3 condições de pH, em 180 rpm de agitação e temperatura de 28 °C após 24 horas de experimento.

É notável a diminuição da eficiência de adsorção após a dessorção. Todos os experimentos feitos com *Acinetobacter sp.* tiveram diminuição da eficiência de adsorção durante a ressorção (Figura 34), porém em pH 2,0 nota-se uma completa ineficácia em readsorver o metal após a dessorção utilizando as células vivas em TSM. Tal fato, foi também visualizado em todos os pHs na cepa de *Burkholderia sp.* viva e morta em Tris (Figura 35), durante a dessorção ocorre uma alteração abrupta de pH (pois trata-se de um tratamento contendo ácido – água – base) para que haja a liberação do metal das células, o que pode ter ocorrido é que o método utilizado, descrito por Chen et al. (2005), não tenha sido eficiente e o metal continue retido a célula, não havendo superfície de contato para uma reabsorção.

Após 24 horas de experimento, a Figura 35 mostra que a *Burkholderia sp.* teve melhor eficiência de adsorção (barras amarelas) em qualquer pH estudado, quando comparado com as outras cepas estudadas no trabalho (Figura 34 -, *Acinetobacter sp.* e Figura 36- *Cupriavidus sp.),* porém essa eficiência não se repete nos experimentos de ressorção, onde tal cepa não se mostrou apta a ressorver o cobre em qualquer dos experimentos com Tris-HCl (Figura 35 barras azuis nos tratamentos de biomassa viva ou morta), apenas houve ressorção nos experimentos com TSM, e ainda assim verifica-se uma diminuição da eficiência (Figura 35, barras azuis).

Nos experimentos com *Cupriavidus sp.* (Figura 36), nota-se uma perda da capacidade de adsorção após a dessorção (como nas demais cepas que tiveram algum tipo de adsorção após este procedimento), porém esta cepa é a única que possui alguma capacidade de readsorver metal em qualquer pH e em qualquer tratamento de biomassa, tornando esta cepa a melhor no quesito "ressorção". Este fato deve ser levado em conta ao implantar um método de biorremediação "*in situ"* pois a mesma biomassa pode ser utilizada várias vezes, tornando o processo economicamente viável.

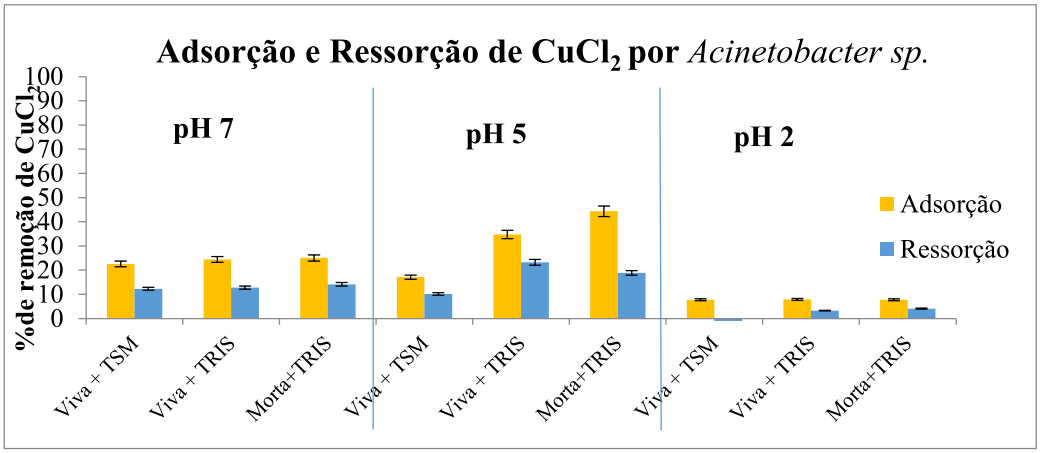


Figura 34

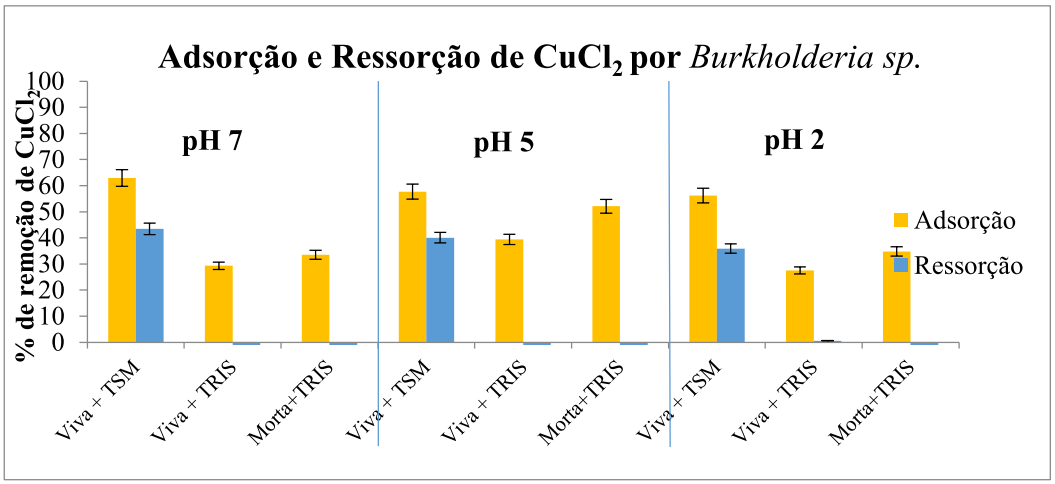


Figura 35

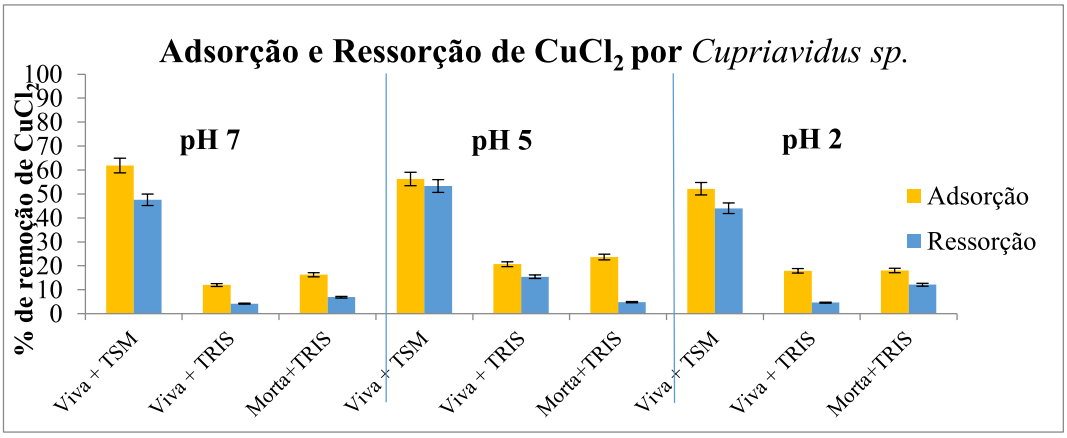


Figura 36

Figura 34 a 36 Eficiência de biossorção do metal antes e depois da dessorção, utilizando-se da mesma massa celular. As células de Acinetobacter sp. (Figura 34), Burkholderia sp. (Figura 35) e *Cupriavidus sp.* (Figura 36) foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram retiradas após 24h de incubação e analisadas em ICP-OES.

6.11 Experimentos de biossorção com outros metais

Afim de testar a eficiência da biossorção de outros metais tóxicos pela cepa isolada de área de mineração de cobre, foi feito um experimento com a biomassa da cepa mais eficiente na adsorção de cobre só que agora contendo níquel e cádmio. Para isto, a cepa *Burkholderia sp.* foi crescida em MJS e sua biomassa colhida para experimentos de adsorção com tais metais.

As Figuras 37 e 38 mostram as curvas de padrões de quantificação dos metais estudados em ICP-OES. A metodologia de digestão utilizada foi a mesma escolhida para os experimentos com cobre (Metodologia 2, Digestão com Ácido Nítrico em micro-ondas, descrita anteriormente).

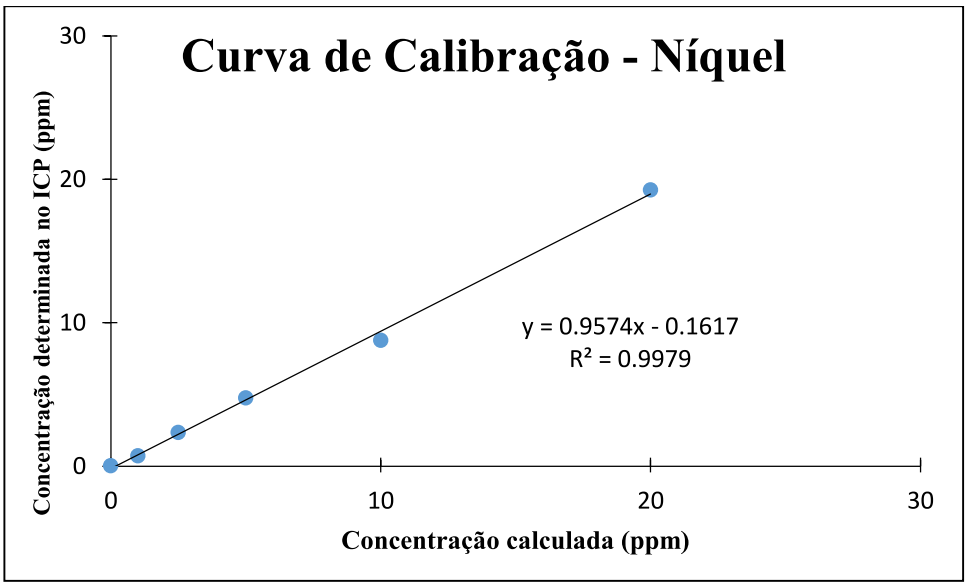


Figura 37 Curva de Calibração de níquel (pontos de 0 a 20 ppm) para ICP-OES.

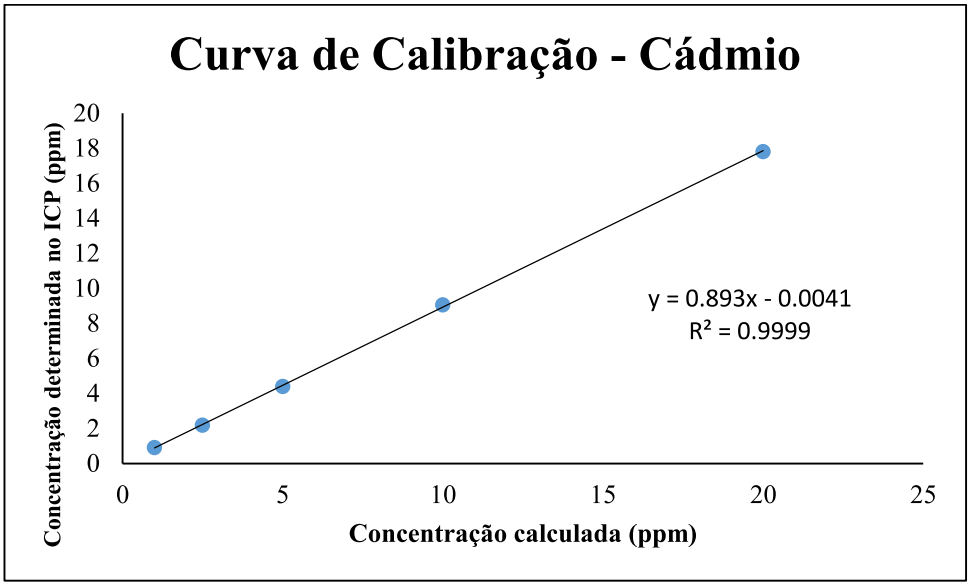


Figura 38 Curva de calibração de cádmio (pontos de 0 a 20 ppm) para ICP-OES.

6.11.1 Adsorção de níquel por *Burkholderia sp.*

Para os experimentos de adsorção, as células de *Burkholderia sp.* foram crescidas em meio MJS e foram divididas em 3 conjuntos de subculturas idênticas: massa morta, seca e viva (esta testada em Tris-HCl e TSM). Assim, 1 $g.L^{-1}$ de biomassa bacteriana foi colocada para adsorver 50 ppm de $NiCl_2$ em diferentes pHs (2,0; 5,0 e 7,0). As figuras a seguir mostram a influência do tempo de contato em relação a biossorção de metal nos três pHs estudados.

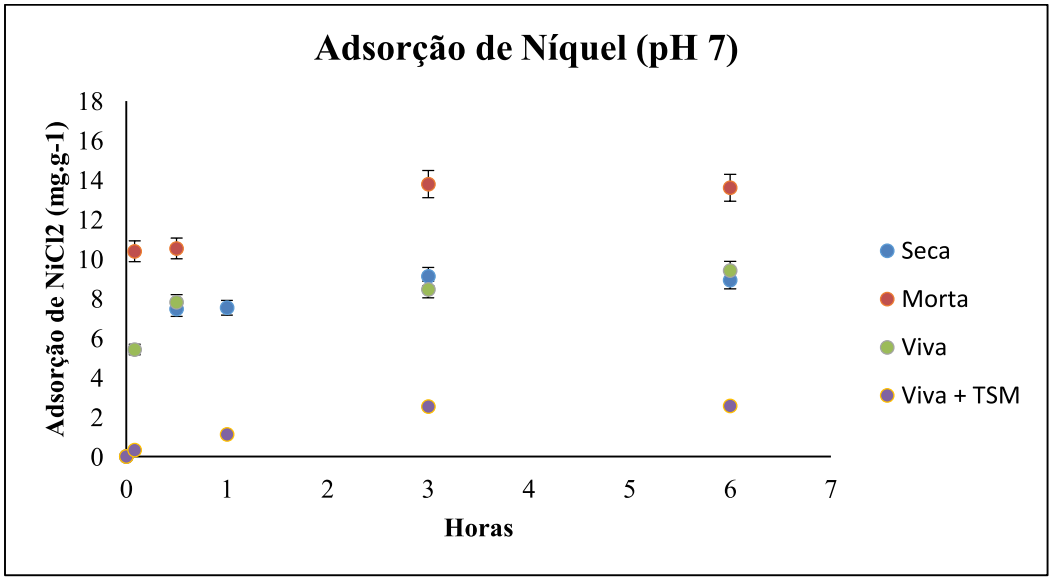


Figura 39 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 mg.L^{-1} de $NiCl_2$ em pH 7,0. As biomassas vivas (em Tris-HCl 10 mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10 mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES.

A Figura 39 mostra uma melhor adsorção de níquel pela biomassa morta em pH 7,0 (fato que se repete em pHs 5,0 e 2,0 - Figuras 40 e 41), a biomassa morta apresenta uma biossorção inespecífica de metal, o que explicaria uma adsorção a qualquer metal (não somente o cobre). Porém, quando comparamos os experimentos em meio TSM (meio mínimo com fonte de carbono), nota-se que a bactéria não se mostra tão eficiente na adsorção do níquel quanto com o cobre (onde foram obtidas as melhores taxas de adsorção com *Burkholderia sp.* utilizando os mesmos parâmetros).

O mesmo perfil de adsorção de níquel segue os demais pHs estudados: massa morta com melhor adsorção, a biomassa viva e seca seguindo o mesmo padrão e a biomassa viva em TSM tendo a pior performance.

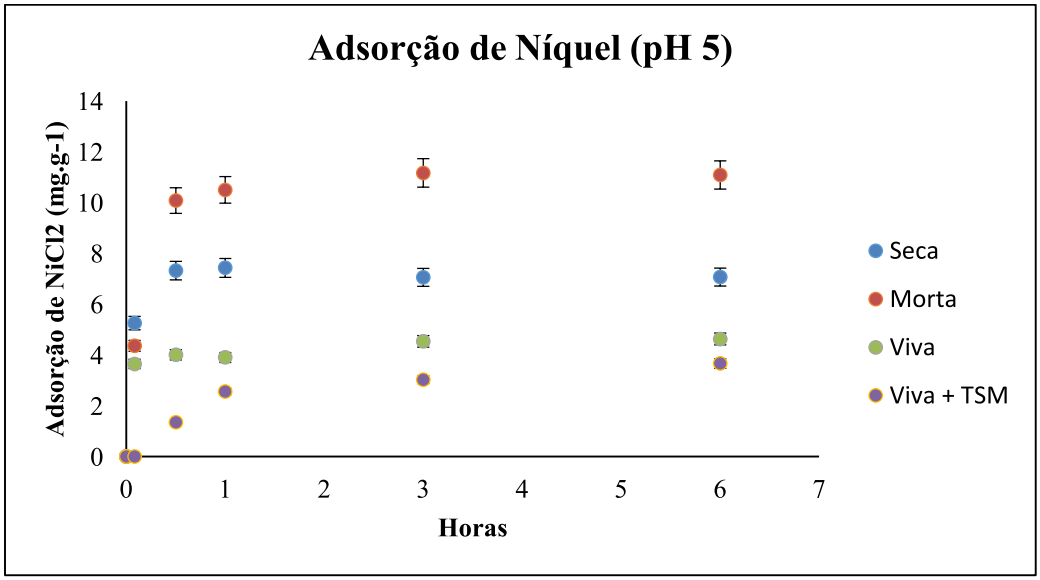


Figura 40 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 $mg.L^{-1}$ de $NiCl_2$ em pH 5,0. As biomassas vivas (em Tris-HCl 10 mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10 mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES.

Em pH 2,0 a biomassa viva com TSM mostra-se completamente incapaz de adsorver Níquel com resultados baixíssimos que ficam próximos de 1 $g.mg^{-1}$ (Figura 41).

A cepa *Burkholderia sp.* é citada na literatura como uma cepa resistente a níquel, Dourado et al., (2015) estudou a atividade de enzimas de duas cepas de *Burkholderia cenocepacia* e comparou seus estudos com experimentos de adsorção contendo concentrações altas de níquel (4 mM), onde a maior taxa adsorção visualizada foi de apenas 2 $mg.g^{-1}$ de células. Taxa considerada baixa quando comparamos com os resultados do presente trabalho, mas altas devido a toxicidade do metal.

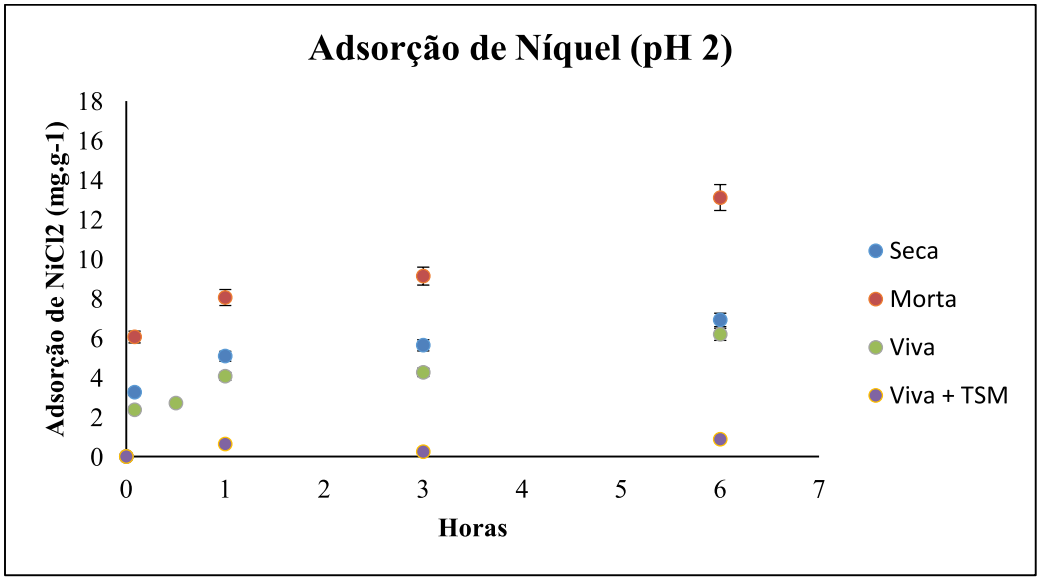


Figura 41 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 mg.L^{-1} de $NiCl_2$ em pH 2,0. As biomassas vivas (em Tris HCl 10 mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10 mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28 °C. As amostras foram analisadas em ICP-OES.

6.11.2 Adsorção de cádmio por *Burkholderia sp.*

Para os experimentos de adsorção, as células de *Burkholderia sp.* foram crescidas em meio MJS e foram divididas em 3 conjuntos de subculturas idênticas: massa morta, seca e viva (esta testada em Tris-HCl e TSM). Assim, 1 g.L^{-1} de biomassa bacteriana foi colocada para adsorver 50 ppm de $CdCl_2$ em diferentes pHs (7,0, 5,0 e 2,0). As figuras a seguir mostram a influência do tempo de contato em relação a biossorção de metal nos três pHs estudados.

Diferente dos experimentos com níquel, a Figura 42 mostra que ocorre uma melhor adsorção de cádmio pela biomassa seca e não morta em pH 7,0 (e este fato também se repete nos demais pH estudados). Como a biomassa morta, a biomassa seca é responsável pela adsorção inespecífica de metal. Após a secagem da biomassa, esta apresentou uma consistência

sólida (como uma rede porosa), tal característica otimiza a captação do metal e melhora a capacidade de adsorção inespecífica.

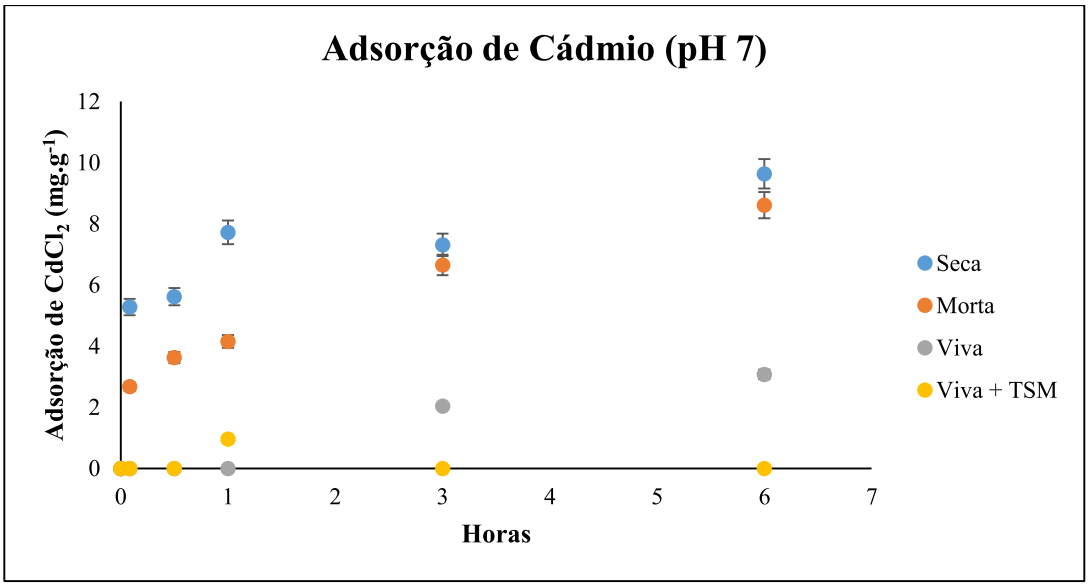


Figura 42 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 mg. L-1 de $CdCl_2$ em pH 7. As biomassas vivas (em Tris HCl 10mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180rpm e 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES.

Nos experimentos com Tris-HCl, a biomassa viva só demonstra alguma afinidade ao cádmio em pH 7,0 (marcadores cinzas, na Figura 42) e nos demais pHs não há nenhuma adsorção (marcadores cinzas das Figuras 43 e 44). A biomassa viva com TSM possui valores baixos de adsorção em qualquer pH mostrando apenas uma pequena adsorção (menor que $2mg.g^{-1}$) em pH 5,0 e 2,0 (Figuras 43 e 44).

Comparando-se os diferentes pH estudados, nota-se uma diminuição na capacidade de adsorção em pH 2,0. A Figura 44 mostra a melhor eficiência de adsorção de cádmio por biomassa seca após 24 horas de experimento em tal pH (e mesmo assim, os valores são menores que 4 $mg.L^{-1}$).

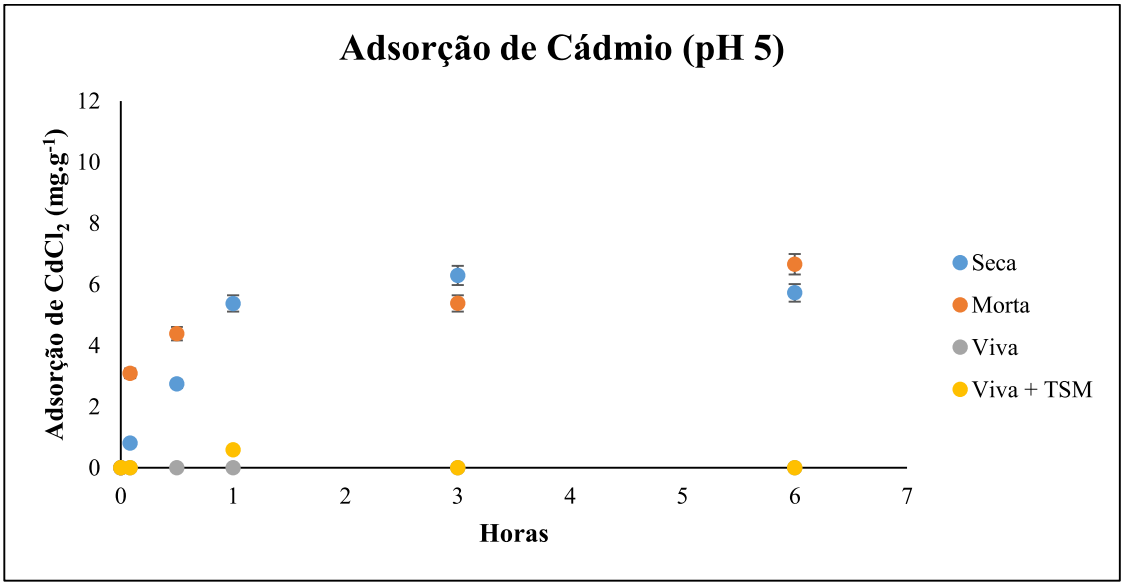


Figura 43 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 mg.L-1 de $CdCl_2$ em pH 5. As biomassas vivas (em Tris HCl 10mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180rpm e 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES.

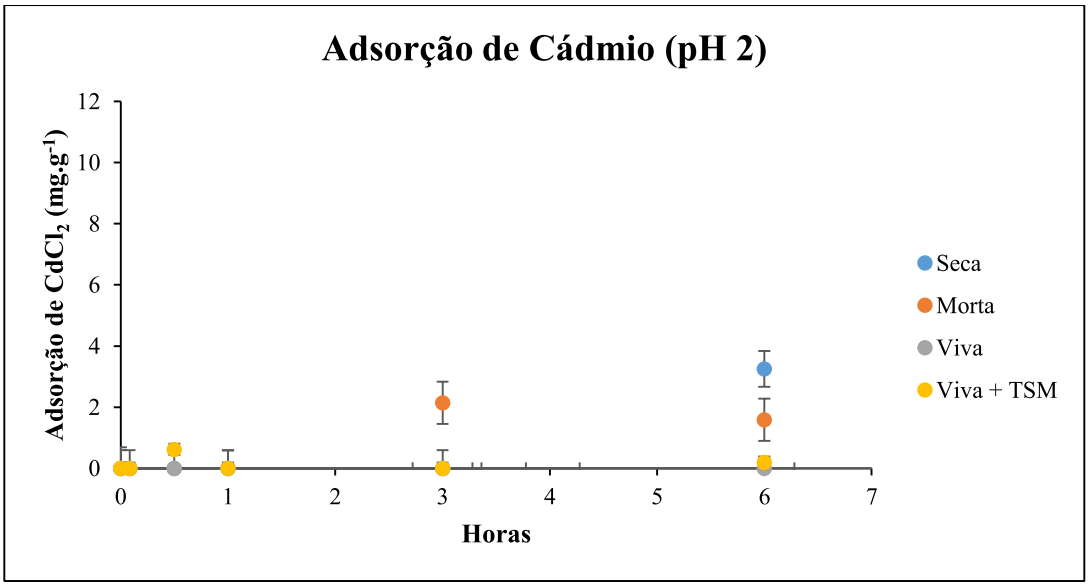


Figura 44 Efeito do tempo de contato durante a biossorção de 50 mg.L-1 de $CdCl_2$ em pH 2. As biomassas vivas (em Tris HCl 10mM e TSM), secas e mortas (apenas em Tris-HCl 10mM) das células de *Burkholderia sp.* foram mantidas sob agitação a 180rpm e 28 °C e as amostras foram analisadas em ICP-OES.

Em se tratando de biorremediação de cádmio, a *Burkholderia* sp. é citada como um simbionte de plantas usadas na fitorremediação de metais. A presença da bactéria no solo faz com que a planta consiga adsorver grandes concentrações do metal, mas no estudo feito por Ribeiro (2013), a maior eficiência de adsorção pela célula de *Burkholderia sp.* foi em pH neutro

(assim como neste trabalho), mas muito menor do que descrito aqui atingindo cerca de 0,7 $mg.g^{1}$ (679,54 µg de metal por grama de biomassa). No presente estudo foi observado uma eficiência de adsorção de cádmio maior que 10 $mg.g^{-1}$ em pH 7,0.

7 CONCLUSÃO

Esse trabalho visou o estudo da microbiota de uma área de mineração, o isolamento dos micro-organismos resistentes ao cobre, a identificação por dois métodos diferentes, o estudo da biossorção do metal utilizando tais micro-organismos e o estudo da biossorção com outros metais tóxicos. Estes dados poderão viabilizar estudos posteriores de remediação de locais contaminados por minas, ou efluentes industriais contendo metais tóxicos.

Neste estudo, foi demonstrado que as amostras de material coletado em Sossego, mina de exploração de cobre em Canaã dos Carajás-PA, apresenta uma rica diversidade de micro-organismos com grande resistência a altas concentrações de cobre. Foi observado e constatado também nesse estudo que as bactérias isoladas e estudadas possuem potencial para a uso em processos de biorremediação devido a resistência e adsorção a altas concentrações de cobre, quando comparadas à bactérias reportadas na literatura disponível.

Estudos bibliográficos mostraram que a calcopirita é praticamente o único minério da Mina do Sossego e ocorre tanto na forma de microcristais quanto como cristais maiores. Foram medidas concentrações de até 710 $mg.L^{-1}$ de cobre na lagoa de rejeitos utilizada como local e coleta das amostras para o isolamento de micro-organismos resistentes.

Obtivemos através de isolamento, 105 cepas resistentes ao cobre nos 5 eventos de coleta diferentes. Foi observado que o método de identificação das cepas isoladas por espectrometria de massas mostrou-se eficiente, porém não completo, para a identificação das espécies de bactérias. Para uma identificação completa e que possa ser utilizada como método único de identificação, é necessário a construção de um banco de dados próprio com base nas sequências de rDNA16S das amostras ambientais, pois o banco de dados do equipamento Biotyper é baseado em amostras laboratoriais que diferem das isoladas do meio ambiente.

A técnica de digestão escolhida para submeter as amostras no ICP-OES foi a metodologia baseada na EPA 3015, utilizando o ácido nítrico em micro-ondas, que mostrou melhor desempenho e curto prazo de digestão quando comparada com os outros 2 métodos estudados neste trabalho.

Comparando-se a MIC das bactérias isoladas no trabalho com as mínimas concentrações inibitórias obtidas de alguns micro-organismos vistos na literatura (todas cresceram a 2,5 mM $CuCl_2$), pôde-se observar que a resistência ao cobre apresentada pelos isolados encontra-se bastante acima daquelas obtidas para outros micro-organismos, evidenciando potencial para aplicação em biorremediação. O fato dessas linhagens serem isoladas do próprio meio-ambiente possibilita sua aplicação em processos de biorremediação *in situ*, uma vez que não apresentam nenhum tipo de alteração genética e, portanto, apresentam pouco risco à microbiota local quando reintroduzidas no meio ambiente.

Das 12 cepas que tiveram maior resistência ao cobre (MIC de 7,5 mM) 3 delas foram escolhidas para serem estudadas frente ao cobre em diferentes pHs e tratamento de biomassa: Cepa 72 (*Acinetobacter sp.*), Cepa 104 (*Burkholderia sp.*) e Cepa 105 (*Cupriavidus sp.*)

Concluímos que as células mortas tiveram uma melhor taxa de adsorção de cobre em experimentos relacionados a biossorção em Tris-HCl, utilizando células vivas e mortas em diferentes pHs (quando comparadas às células frescas da mesma cepa). Tal fato pode ser explicado devido ao processo de adsorção em Tris-HCl ser estritamente físico-químico, não havendo fonte de carbono que favoreça a biomassa viva. Nesse caso existe o favorecimento da biomassa morta já que tais amostras contêm proteínas desnaturadas que expõem uma maior superfície de contato, favorecendo assim, a adsorção.

A cepa *Burkholderia sp.* foi mais eficiente na adsorção de cobre que as demais estudadas em qualquer pH. Foi verificado também que, de uma maneira geral, o pH 5,0 é o melhor para a adsorção de cobre nos experimentos com Tris-HCl e concentração de 100 $mg.L^{-1}$ de cobre. Este resultado corrobora as observações feitas por outros autores anteriormente (SALVADORI et al., 2013).

Verificamos também uma grande perda da eficiência de adsorção após a dessorção do metal utilizando as cepas isoladas. Baseado nesses resultados, podemos concluir que a massa celular de *Cupriavidus sp.* (vivas em TSM ou Tris HCl e mortas) pode sim ser aproveitada após a adsorção para um novo ciclo de captação do metal, porém com perda de eficiência. Já a cepa *Burkholderia sp.* (que demonstrou os melhores resultados na adsorção do cobre) não se mostrou eficiente na ressorção de metal, portanto, a mesma biomassa não pode ser reutilizada em um novo processo de biossorção. O estudo dos mecanismos envolvidos com a adsorção e ressorção

de cobre pelos sistemas biológicos é importante a fim de determinar dados ainda mais confiáveis e reprodutíveis para a biossorção de cobre.

A cepa *Burkholderia sp.* foi testada frente ao níquel e ao cádmio pois se mostrou mais eficiente nos experimentos com cobre. Esta cepa é citada na literatura como uma cepa resistente a níquel e conseguiu adsorver até 16 $mg.g^{-1}$ (em pH 7,0 e utilizando biomassa morta). Na literatura verificou-se uma taxa de adsorção de apenas 2 $mg.g^{-1}$ (8 vezes menor que no trabalho), mas ainda assim considerada alta por Dourado, et al (2013) devido a toxicidade do metal.

A melhor adsorção de cádmio ocorreu em pH neutro (7,0) assim como nos experimentos realizados por Ribeiro (2013). A maior eficiência de adsorção de cádmio visto pelos autores foi aproximadamente 0,7 $mg.g^{-1}$ (679,54µg de metal por grama de biomassa) e neste estudo foi observado uma eficiência de adsorção de cádmio maior que 10 $mg.g^{-1}$ em pH 7,0.

O desenvolvimento das técnicas de exploração dos minerais no decorrer dos séculos e o aumento da escala de produção trouxeram como consequência, significativos impactos inerentes à atividade mineral, como a poluição, acidentes ambientais e escassez de alguns recursos naturais. É neste âmbito, que a procura de métodos de reaproveitamento de rejeitos se enquadra, com o objetivo de evitar tais desastres e implementar o desenvolvimento sustentável da mineração com o uso consciente de água e mitigação de acidentes.

Finalmente, é importante ressaltar que, este trabalho faz parte de um projeto muito maior, o qual já está sendo implantado na Mina do Sossego, a nova tecnologia é de extrema importância devido ao baixo custo de sistemas de remediação utilizando micro-organismos já adaptados à altas concentrações do contaminante, aumentando significativamente as chances de sucesso de uma remediação da área. Além disso, dependendo do mecanismo de biossorção utilizado pelo micro-organismo, existirá a possibilidade de concentração e reaproveitamento do metal, o que torna o processo extremamente interessante do ponto de vista econômico.

REFERÊNCIAS

ADAMIS, P. D. B.; PANEK, A. D.; LEITE, S. G. F.; ELEUTHERIO, E. C. A. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of Saccharomyces cerevisiae. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 55–60, abr. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 12 maio. 2016.

ALBERTINI, S.; CARMO, L. F.; PRADO FILHO, L. G. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE CÁDMIO POR Saccharomyces cerevisiae. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 21, n. 2, p. 134–138, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v21n2/7455.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2016.

ALLOWAY, B. J. Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability. In: BRAIN J. ALLOWAY (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. 22. ed. Whiteknights, Reading, UK: Springer Berlin Heidelberg, 1995. p. 565–577.

ALVES, J. M. P. **Caracterização e filogenia moleculares de acanthamoeba.** 2001. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-01112001-123050/>. Acesso em: 27 ago. 2016.

ANDRADE, L. M. de. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protêica e lipídica via espectrometria de massas.** 2015. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-11082015-152508/pt-br.php>. Acesso em: 4 jul. 2016.

ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. de O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127–136, 2013.

ASCARRUNZ, S. D. M.; NATSUAKI, T.; HONJO, H.; FUKUI, R. Quick adaptation of Ralstonia Solanacearum to copper stress to recover culturability and growth in water and soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 576–591, jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000200023&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 8 jan. 2017.

ASHUTOSH, A. Chasnala mine disaster victims remembered. **The Times of India**, 28 dez. 2012. Disponível em: <http://timesofindia.indiatimes.com/city/ranchi/Chasnala-mine-disaster-victims-remembered/articleshow/17792691.cms>.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA NA CLASSIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344–355, 2011.

ASSIS, H. F. S.; BARBOSA, J. A. A.; MOTA, T. de S. Ambiental Avaliação dos impactos ambientais provocados pela atividade mineradora no município de. **Âmbito Jurídico**, p. 1–6, jul. 2011. Disponível em: <http://www.ambitojuridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=9925&revista_caderno=5>.

ATSDR. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR COPPER. 2004.

AVANZI, I. R.; GRACIOSO, L. H.; BALTAZAR, M. dos P. G.; KAROLSKI, B.; PERPETUO, E. A.; NASCIMENTO, C. A. O. Aerobic Biodegradation of Gasoline Compounds by Bacteria Isolated from a Hydrocarbon-Contaminated Soil. **Environmental Engineering Science**, v. 32, n. 12, p. 990–997, dez. 2015. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ees.2015.0122>. Acesso em: 4 jul. 2016.

AZEVEDO, S. M. de; CARDOSO, M. das G.; PEREIRA, N. E.; RIBEIRO, C. de F. S.; SILVA, V. de F.; AGUIAR, F. da C. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 618–624, jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542003000300017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 maio. 2016.

BABU, B. R.; PARANDE, A. K.; BASHA, C. A. Electrical and electronic waste: a global environmental problem. **Waste Management & Research**, v. 25, n. 4, p. 307–318, 2007. Disponível em: <http://wmr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0734242X07076941>.

BALL, M.; CARRERO, P.; CASTRO, D.; YARZÁBAL, L. Mercury Resistance in Bacterial Strains Isolated from Tailing Ponds in a Gold Mining Area Near El Callao (Bolívar State, Venezuela). **Current Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 149–154, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-006-0347-4>.

BECKER, K.; HARMSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of Staphylococcus species. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4988–95, nov. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528685>. Acesso em: 4 jul. 2016.

BELLEN, H. M. Van. Indicadores de Sustentabilidade: Uma Análise Comparativa. In: Encontro da Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração (EnANPAD), **Anais**...2004. Disponível em: <http://www.anpad.org.br/diversos/trabalhos/EnANPAD/enanpad_2004/GSA/2004_GSA569.pdf>.

BEZERRA, C. W. B. **Caracterização química da aguardente de cana-de-açúcar:**

determinação de álcoois, esteres e dos íons li+ , ca2+, mg2+, cu2+ e hg2+ . 1995. Universidade de São Paulo, 1995.

BIONDO, R. **Engenharia genética de cupriavidus metallidurans ch34 para a biorremediação de efluentes cupriavidus metallidurans ch34 para a**. 2008. Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: <http://pct.capes.gov.br/teses/2008/33002010156P0/TES.pdf>.

BIONDO, R.; DA SILVA, F. A.; VICENTE, E. J.; SOUZA SARKIS, J. E.; SCHENBERG, A. C. G. Synthetic phytochelatin surface display in cupriavidus metallidurans CH34 for enhanced metals bioremediation. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 15, p. 8325–8332, 2012.

BOON, M. E.; KOK, L. P. Microwave Cookbook of Pathology: The art of microscopic visualization. **Cytometry**, v. 9, n. 5, p. 513–514, set. 1988. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.990090520>. Acesso em: 27 ago. 2016.

BUCHAREST, S.; MISKOLC, T.; BUDAPEST, S.; MARE, B. B. The Cyanide Spill at Baia Mare, Romania BEFORE, DURING AND AFTER. 2000.

CAILLE, O.; ROSSIER, C.; PERRON, K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4561–4568, 2007.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 104–109, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000991201000305X>.

CARDOSO, L. M. .; CHASIN, A. M. **Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos**. 1. ed. Salvador: Centro de Recursos Ambientais-CRA, 2001.

CASTRO-SILVA, M. A.; DE SOUZA LIMA, A. O.; GERCHENSKI, A. V.; JAQUES, D. B.; RODRIGUES, A. L.; DE SOUZA, P. L.; R??RIG, L. R. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 45–47, 2003.

CENSO. **IBGE Censo 2010**. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/>.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 2, p. 330–9, maio 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391789>. Acesso em: 4 jul. 2016.

CHAMBERS, N.; SIMMONS, C.; WACKERNAGEL, M. **Sharing nature's interest: ecological footprints as an indicator of sustainability**. [s.l.] The University of Chicago Press, 2000. v. 78

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica Ilustrada. **Uma ética para quantos?**, v. XXXIII, n. 2, p. 544, 2006.

CHEN, W.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309503/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309503/pdf/nar00058-0232.pdf>.

CHEN, X. C.; WANG, Y. P.; LIN, Q.; SHI, J. Y.; WU, W. X.; CHEN, Y. X. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by Pseudomonas putida CZ1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 46, n. 2, p. 101–107, 2005.

CONAMA. Resolução n 430, 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, p. 8, 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>.

CRU GROUP. **Copper Market Outlook**. Disponível em: <http://www.minexconsulting.com/publications/CRU Copper Conf Brisbane March 2011 FINAL 24 March 2011.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2016.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R. H. S. F. Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4270–7278, 2000.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E. L.; LARSEN, N.; PICENO, Y. M.; PHAN, R.; ANDERSEN, G. L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W394-9, 1 jul. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845035>. Acesso em: 4 jul. 2016.

DHAKEPHALKAR, P. K.; CHOPADE, B. a. High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of Acinetobacter. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 7, n. 1, p. 67–74, 1994.

DIELS, L.; VAN DER LELIE, N.; BASTIAENS, L. **New developments in treatment of heavy metal contaminated soilsReviews in Environmental Science and Biotechnology**, 2002. .

DNPM, D. N. de P. M. **Sumário mineral 2014**. 2. ed. Brasilia: DNPM/MME, 2015.

DOBSON, S. **Cadmium- Environmental aspects**. Geneva: United Nations Environment Programme, 1992. . Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc135.htm>. Acesso em: 29 jun. 2016.

DOURADO, M. N.; FRANCO, M. R.; PETERS, L. P.; MARTINS, P. F.; SOUZA, L. A.; PIOTTO, F. A.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes activities of Burkholderia spp. strains—oxidative responses to Ni toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19922–19932, 21 dez. 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-5204-1>. Acesso em: 21 ago. 2016.

DPNM. **Cobre - Sumário Mineral 2001 —Departamento Nacional de Produção Mineral**. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/balanco-mineral/arquivos/balanco-mineral-brasileiro-2001/view>. Acesso em: 28 maio. 2016.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J. P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P. O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. Identification of a variety of Staphylococcus species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 941–5, mar. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032251>. Acesso em: 24 ago. 2016.

EPA, E. P. A. **METHOD 3015A - MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF AQUEOUS SAMPLES AND EXTRACTS**. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3015a.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2016.

ERICKSON, B. Standardizing the world with microwaves. 2011.

Explosão de mina de carvão mata centenas de trabalhadores na Turquia. Disponível em: <http://operamundi.uol.com.br/conteudo/noticias/35256/explosao+de+mina+de+carvao+mata+centenas+de+trabalhadores+na+turquia.shtml#>. Acesso em: 28 jun. 2016.

FELLER, G. V. **Correlação entre os níveis salivares e sanguíneos de níquel em indivíduos saudáveis e portadores de carcinoma de células escamosas bucais – estudo piloto**. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/127202/TCC GEORGIA VOLTOLINI FELLER Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 jun. 2016.

FERREIRA, P. A. A. **Tolerância de cupriavidus necator a cádmio e zinco e sua eficiência simbiótica em leguminosas**. 2011. Universidade Federal de Lavras, 2011. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1650/1/TESE_Toler%25C3%25A2ncia de Cupriavidus necator a c%25C3%25A1dmio e zinco e sua efici%25C3%25AAncia simbi%25C3%25B3tica em leguminosas.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2016.

FOSTER, J. A. COMPUTATIONAL GENETICS: EVOLUTIONARY COMPUTATION. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 6, p. 428–436, jun. 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35076523>. Acesso em: 27 ago. 2016.

GADD, G. M. Metals and microorganisms: A problem of definition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, n. 1–3, p. 197–203, 1992.

GAVRILESCU, M. **Removal of heavy metals from the environment by biosorptionEngineering in Life Sciences**, 2004. .

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspéctos Biológicos e Técnicos da Biorremediação de Xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 36–43, 2005. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/biorremediacao_34.pdf>.

GUIMARÃES, M. de A.; SANTANA, T. A. de; SILVA, E. V; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Cadmium toxicity and tolerance in plants (Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas). v. 1, n. 3, p. 58–68, 2008.

HARDI, P.; ZDAN, T. **Assessing sustainable development: principles in practice**. Winnipeg: International Institute for Sustainable Development, 1997.

HERTEL, R. F.; MAASS, T.; MÜLLER, V. R. **Nickel - ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA**. Geneva: United Nations Environment Programme, 1991. . Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc108.htm>. Acesso em: 29 jun. 2016.

HORNIK, K. R. **Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

HUANG, G.-H.; TIAN, H.-H.; LIU, H.-Y.; FAN, X.-W.; LIANG, Y.; LI, Y.-Z. Characterization of plant-growth-promoting effects and concurrent promotion of heavy metal accumulation in the tissues of the plants grown in the polluted soil by Burkholderia strain LD-11. **International journal of phytoremediation**, v. 15, n. 10, p. 991–1009, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819291>. Acesso em: 4 ago. 2016.

HUSSEIN, H.; IBRAHIM, S. F.; KANDEEL, K.; MOAWAD, H. Biosorption of heavy metals from waste water using Pseudomonas sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 45–53, 2004.

IBRAM. **Gestão para a sustentabilidade na mineração**. [s.l: s.n.]

IDESP. **Estatística Municipal - Canaã dos Carajás**. Disponível em: <http://seicom.pa.gov.br/kitmineracao/estatistica-municipal/regiao-do-carajas/CanaaCarajas.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2016.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British medical bulletin**, v. 68, p. 167–82, jan. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757716>. Acesso em: 28 maio. 2016.

JOHRI, N.; JACQUILLET, G.; UNWIN, R. **Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidneyBioMetals**, 2010. .

KANG, Y. J.; CHENG, J.; MEI, L. J.; HU, J.; PIAO, Z.; YIN, S. X. Multiple copies of 16s rRNA gene affect the restriction patterns and DGGE profile as revealed by analysis of genome database. **Mikrobiologiia**, v. 79, n. 5, p. 664–71, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21090508>. Acesso em: 4 jul. 2016.

KINGSTON, H. M.; HASWELL, S. J. Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation and Applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 19, p. 4729–4729, maio 1999. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja9856046>. Acesso em: 27 ago. 2016.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. **Introduction to microwave sample preparation:**

theory and practice. [s.l: s.n.]

KOPEZINSKI, I. **Mineração x meio ambiente: considerações legais, principais impactos ambientais e seus processos modificadores**. [s.l: s.n.]

LACERDA, L. **Logística Reversa Uma visão sobre os conceitos básicos e as práticas operacionais**. Disponível em: <http://www.ecodesenvolvimento.org/biblioteca/artigos/logistica-reversa-uma-visao-sobre-os-conceitos>. Acesso em: 8 jan. 2017.

LAZARIDIS, N. K.; JEKEL, M.; ZOUBOULIS, A. I. Removal of Cr(VI), Mo(VI), and V(V) ions from single metal aqueous solutions by sorption or nanofiltration. **Separation Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 2201–2219, 2003.

LEAHY, M. J.; SCHWARZ, M. P. Modelling jarosite precipitation in isothermal chalcopyrite bioleaching columns. **Hydrometallurgy**, v. 98, n. 1, p. 181–191, 2009.

LEHNINGER, N. D.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de LehningerPrinc{'i}pios de bioqu{'i}mica de Lehninger**, 2011. .

LIESACK, W.; JANSSEN, H. P.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. p. 712.

LOPES, M. **Acidentes na Mineração causam desastres e perdas humanas**. Disponível em: <http://tecnicoemineracao.com.br/acidentes-na-mineracao-causam-desastres-e-perdas-humanas/>. Acesso em: 28 jun. 2016.

LU, W. Bin; SHI, J. J.; WANG, C. H.; CHANG, J. S. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 134, n. 1–3, p. 80–86, 2006.

MACASKIE, L. E. An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. **Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)**, v. 49, n. 4, p. 357–379, 1990.

MAGRI, A.; MINUCELLI, T.; DA ROCHA, C. B.; PAN, N. C.; PEDRINE COLABONE CELLIGOI, M. A. Efeito do pH sobre a produção de lipase e biomassa de Acinetobacter calcoaceticus. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 277, 7 ago. 2013. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/15811>. Acesso em: 27 ago. 2016.

MARIANO-DA-SILVA, S.; BASSO, L. C. Efeitos do cádmio sobre o crescimento das leveduras Saccharomyces cerevisiae PE-2 e Saccharomyces cerevisiae IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 16–22, mar. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-

20612004000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 jul. 2016.

MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHLEGEL, H. G.; GERITS, J.; CHARLES, P.; VAN GIJSEGEM, F. Alcaligenes eutrophus CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. **Journal of bacteriology**, v. 162, n. 1, p. 328–34, abr. 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3884593>. Acesso em: 20 jul. 2016.

MINGOS, D. M. P.; BAGHURST, D. R. Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1, 1991. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=cs9912000001>. Acesso em: 27 ago. 2016.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, M. MINÉRIO DE NÍQUEL -Perfil do Níquel. PRODUTO 38, Relatório Técnico 64. v. 315517, 2007. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256652/P38_RT64_Perfil_do_Nxquel.pdf/5a012ef8-9247-407c-a188-30cb2efeb241>. Acesso em: 28 jun. 2016.

MONCHY, S.; BENOTMANE, M. A.; WATTIEZ, R.; AELST, S. van; AUQUIER, V.; BORREMANS, B.; MERGEAY, M.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. van der; VALLAEYS, T. Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in Cupriavidus metallidurans strain CH34. **Microbiology**, v. 152, n. 6, p. 1765–1776, 1 jun. 2006. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28593-0>. Acesso em: 17 ago. 2016.

MORAGA, R.; MERINO, C.; MONDACA, M. A. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. **Investigaciones marinas**, v. 31, n. 1, p. 91–95, 2003.

MOURA, F. A. L. De; SANTELLI, D. R. E. Avaliação Da Digestão De Amostras De Piche Assistida Por Radiação De Microondas E Determinação De Metais Por Icp-Oes. **Pós-Graduação em Química, IQ-UFF**, v. Mestrado, p. 92, 2006. Disponível em: <http://www.uff.br/posquim/frmprincipal/producoes/dissertacoes/fernandomoura/fernandomoura.pdf>.

MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1513–30, jun. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192968>. Acesso em: 4 jul. 2016.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's biochemistry**. [s.l: s.n.]v. 91

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 8, p. 796–802, 2009.

NOLTE, F. S.; CALIENDO, A. M. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H. P. M. A.; YOLKEN R.H (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. p. 234–

256.

ODERMATT, A.; SOLIOZ, M. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of Enterococcus hirae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4349–4354, 1995.

OLIVEIRA, J. A. DE; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvínia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 329–341, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-31312001000300008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 jul. 2016.

OLSSON, L.; NIELSEN, J. **On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivationsTrends in Biotechnology**, 1997. .

OWENS, P. M. Environmental Chemistry (Baird, Colin). **J. Chem. Educ.**, v. 73, n. 11, p. A276, 1996. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed073pA276.2>.

PEREIRA, R. S. POLUIÇÃO HIDRICA: CAUSAS E CONSEQUENCIAS. FONTES DE POLUIÇÃO. **Revista Eletronica de Recursos Hidricos**, v. 1, n. 1, p. 20–36, 2004. Disponível em: <http://www.vetorial.net/~regissp/pol.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2017.

PERPETUO, E.; BARBIERI, C.; OLLER NASCIMENTO, C. A. Engineering Bacteria for Bioremediation. In: **Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications**. [s.l.] InTech, 2011. p. 1–29.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 8, p. 1108–14, 15 abr. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17366460>. Acesso em: 4 jul. 2016.

RADEMACHER, C.; MASEPOHL, B. **Copper-responsive gene regulation in bacteriaMicrobiology (United Kingdom)**, 2012. .

RENSING, C.; GRASS, G. Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 197–213, jun. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829268>. Acesso em: 27 ago. 2016.

RIBEIRO, M. N. D. **Burkholderia sp. cadmium tolerance mechanism and its influence in phytoremediation**. 2013. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11151/tde-17122013-144639/>. Acesso em: 21 ago. 2016.

ROANE, T. M.; JOSEPHSON, K. L.; PEPPER, I. L. Dual-Bioaugmentation Strategy to Enhance Remediation of Cocontaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3208–3215, 2001.

ROANE, T. M.; KELLOGG, S. T. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 6, p. 593–603, 1996.

ROCIO, M. A. R.; SILVA, M. M. da; CARVALHO, P. S. L. de; CARDOSO*, J. G. da R. **Perspectivas atuais da indústria de cobre no Brasil - BNDES**. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta_Expressa/Tipo/BNDES_Setorial/201209_11.html>. Acesso em: 28 maio. 2016.

RODRIGUES, V. D. **Avaliação da biodiversidade de bactérias associadas a ambientes de mina**. 2014. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

RODRIGUES DA SILVA ENRÍQUEZ, M. A. Mineração e desenvolvimento sustentável - é possível conciliar? **Revibec : revista de la Red Iberoamericana de Economia Ecológica**, v. 12, p. 051–066, 2009. Disponível em: <http://ddd.uab.cat/record/52749>. Acesso em: 14 mar. 2016.

ROSENFELD, M.; RAMSEY, B. W.; GIBSON, R. L. Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 9, p. 492–497, 2003.

ROUCH, D. A.; LEE, B. T.; MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. **Journal of industrial microbiology**, v. 14, n. 2, p. 132–41, fev. 1995.

SALVADORI, M. R.; LEPRE, L. F.; ANDO, R. A.; NASCIMENTO, C. A. O.; CORREA, B. Biosynthesis and Uptake of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of Hypocrea lixii Isolated from the Metal Mine in the Brazilian Amazon Region. v. 8, n. 11, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 3th Editio, 2001.

SANTOS, V. S. dos. **Acidente em Mariana (MG) e seus impactos ambientais**. Disponível em: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/acidente-mariana-mg-seus-impactos-ambientais.htm>. Acesso em: 27 jun. 2016.

SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do Metabolismo do Cobre no Homem. **Quimica Nova**, v. 19, n. 3, p. 290–293, 1996. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=4104>. Acesso em: 28 maio. 2016.

SHIMIZU, V. K. **Classificação e caracterização de tipos de minérios de cobre da mina do sossego - região de carajás**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012.

SILVA, D. A.; RIBEIRO, H. Certificação ambiental empresarial e sustentabilidade: desafios da comunicação. **Saúde e Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 52–67, abr. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902005000100007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 13 jan. 2017.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins

for toxic inorganic ions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 32, n. 11–12, p. 587–605, dez. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133099>. Acesso em: 28 maio. 2016.

SINHA, S.; MUKHERJEE, S. K. Pseudomonas aeruginosa KUCd1, a possible candidate for cadmium bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 655–662, set. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000300030&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 4 jul. 2016.

SORENSEN, E. M. B. **Metal poisoning in fish**. [s.l.] CRC Press, 1991.

SOUZA, R. O processo de formação de novos territórios na Amazônia : O Caso de Canaã dos Carajás. p. 1–11, 2010.

SZE, K. F.; LU, Y. J.; WONG, P. K. Removal and recovery of copper ion (Cu2+) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of Pseudomonas putida 5X. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, n. 1–4, p. 175–193, nov. 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344996011767>. Acesso em: 28 maio. 2016.

THÉVENOD, F. **Nephrotoxicity and the proximal tubule: Insights from CadmiumNephron**, 2003. .

VALLS, M.; ATRIAN, S.; LORENZO, V.; FERNANDES, L. A. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of Ralstonia eutropha CH34 for immobilization of heavy metals in soil. **Nat. Biotechnol.**, v. 18, p. 661–665, 2000.

VALLS, M.; DE LORENZO, V. **Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollutionFEMS Microbiology Reviews**, 2002a. .

VALLS, M.; DE LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 327–38, nov. 2002b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413663>. Acesso em: 28 maio. 2016.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57923, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460914>. Acesso em: 4 ago. 2016.

VIANA, M. B. **Avaliando minas : índice de sustentabilidade da mineração (ism)**. 2012. UnB, 2012.

VOSS, M.; THOMAS, R. W. S. P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 947–951, dez. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

84782001000600004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 ago. 2016.

WAGGONER, D. J.; BARTNIKAS, T. B.; GITLIN, J. D. The role of copper in neurodegenerative disease. **Neurobiology of disease**, v. 6, n. 4, p. 221–30, ago. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448050>. Acesso em: 28 maio. 2016.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 427–51, jan. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975006000401>. Acesso em: 28 maio. 2016.

WATANABE, M. E. Phytoremediation on the brink of commericialization. **Environmental science & technology**, v. 31, n. 4, p. 182A–6A, 1 abr. 1997. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/51199672_Phytoremediation_on_the_brink_of_commercialization_Environ_Sci_Technol_31A182-A186>. Acesso em: 11 abr. 2016.

WCED. **Our common future**. [s.l: s.n.]v. Report of

WUYTS, J. The European ribosomal RNA database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 90001, p. 101D–103, 2004. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkh065>.

YILMAZ, E. I. Metal tolerance and biosorption capacity of Bacillus circulans strain EB1. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 409–415, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – Identificação das Bactérias Isoladas por MALDI-TOF e 16S

	Nº da Cepa	Nome Padronizado	Maldi	Score	16 S (gênero)	Similaridade (%)
1°Coleta	1	S4.10.1	*Bacillus cereus 4080 LBK*	1.765	Bacillus	95
	2	S6.2,5.2	*Bacillus cereus 4080 LBK*	1.852	Bacillus	95
	3	S11.10.1	*Enterobacter cloacae MB11506_1 CHB*	1.803	Pseudomonas	92
	4	S13.7,5.1	*Bacillus cereus 4080 LBK*	1.839	Bacillus	95
	5	L14.7,5.1	*Bacillus cereus 4080 LBK*	1.761	Bacillus	95
	6	S15.7,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.985	Pseudomonas	92
	7	S15.5.1	*Bacillus cereus 994000168 LBK*	2.082	Enterobacter	94
	8	L16.5.1	*Bacillus cereus 994000168 LBK*	1.955	Enterobacter	97
	9	L16.7,5.2	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.375	Pseudomonas	97
	10	S17.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.212	Pseudomonas	92
	11	S17.7,5.1	*no reliable identification*	1.287	Pseudomonas	94
	12	S18.10.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.225	Pseudomonas	92
	13	L1.5.1	*Burkholderia cepacia DSM 11737 DSM*	2.046	Burkholderia	96
	14	S5.10.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.199	Pseudomonas	92
	15	S5.10.2	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.27	Pseudomonas	97
	16	S5.10.3	*no reliable identification*	1.481	Pseudomonas	93
	17	S5.10.4	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.27	Pseudomonas	92
	18	S6.2,5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.611	Pseudomonas	93
	19	S12.10.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.353	Pseudomonas	97
2°Coleta	20	SBete1.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.403	Pseudomonas	97

	Nº da Cepa	Nome Padronizado	Maldi	Score	16 S (gênero)	Similaridade (%)
	21	SBete1.5.3	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.615	Enterobacter	95
	22	SBete1.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.388	Pseudomonas	93
	23	SBete1.2,5.2	*Enterobacter cloacae 20105_2 CHB*	1.606	Enterobacter	95
	24	SBete2.2,5.1	*Bacillus cereus 4080 LBK*	1.783	Enterobacter	94
	25	SBete2.2,5.2	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.688	Enterobacter	94
	26	SBete2.2,5.3	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.424	Pseudomonas	94
	27	LBete3.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.237	Pseudomonas	92
	28	LBete3.5.2	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.323	Pseudomonas	97
	29	LBete3.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.342	Pseudomonas	97
	30	SBete4.7,5.1	*Bacillus cereus 4080 LBK*	1.829	Enterobacter	92
	31	LN.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.333	Pseudomonas	92
	32	SO.2,5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.815	Enterobacter	94
	33	SO.1.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.21	Pseudomonas	92
	34	LP.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.224	Pseudomonas	92
	35	LP.1.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.242	Pseudomonas	94
	36	SQ.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.218	Pseudomonas	93
	37	SR.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.301	Pseudomonas	93
	38	SS.5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.67	Enterobacter	93
	39	ST.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.165	Pseudomonas	92
	40	LY.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.179	Pseudomonas	93
	41	LY.1.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.152	Pseudomonas	92
3°Coleta	42	L1.7,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.2	Pseudomonas	92
	43	L1.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.254	Pseudomonas	92

	Nº da Cepa	Nome Padronizado	Maldi	Score	16 S (gênero)	Similaridade (%)
	44	S2.7,5.1	*Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 DSM*	2.284	Pseudomonas	92
	45	S2.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.175	Pseudomonas	94
	46	S3.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.364	Pseudomonas	92
	47	L4.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.185	Pseudomonas	94
	48	S5.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.947	Pseudomonas	92
	49	L8.5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.6	Enterobacter	93
	50	S9.2,5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.645	Enterobacter	96
	51	L10.5.1	*Enterobacter cloacae DSM 6234 DSM*	1.626	Enterobacter	95
	52	L10.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.19	Pseudomonas	92
	53	L11.5.1	*Enterobacter cloacae ssp cloacae DSM 30054T HAM*	1.595	Enterobacter	93
	54	S12.10.1	*Enterobacter cloacae MB11506_1 CHB*	1.798	Enterobacter	95
	55	S12.7,5.1	*Enterobacter cloacae MB11506_1 CHB*	1.894	Sem sequência	-
	56	L13.7,5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.716	Pseudomonas	93
	57	S14.7,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.362	Pseudomonas	92
	58	L15.5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.565	Enterobacter	92
	59	S16.7,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.608	Pseudomonas	93
	60	L17.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	2.126	Pseudomonas	96
	61	L18.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.883	Brachyspira	baixa similaridade
	62	L18.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T HAM*	1.914	Pseudomonas	95
	63	L19.5,1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.9	Sem sequência	-
4°Coleta	64	S12.5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.63	Pseudomonas	92
	65	S13.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB*	1.982	Pseudomonas	97

	Nº da Cepa	Nome Padronizado	Maldi	Score	16 S (gênero)	Similaridade (%)
	66	S14.1.1	*Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 DSM*	1.6	Pseudomonas	97
	67	S14.2,5.1	*Acinetobacter pittii Serovar 26 DSM 9321 DSM*	2.217	Acinetobacter	98
	68	S15.5.1	*Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 DSM*	2.294	Pseudomonas	94
	69	S15.7,5.1	*Burkholderia cenocepacia LMG 12614 HAM*	2.005	Citrobacter	85
	70	S16.2,5.1	*Enterobacter cloacae DSM 30062 DSM*	1.653	Pseudomonas	86
	71	S16.2,5.2	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.725	Enterobacter	97
	72	S16.2,5.3	*Acinetobacter pittii Serovar 25 DSM 9343 DSM*		Acinetobacter	95
	73	L17.1.1	*Acinetobacter pittii Serovar 21 DSM 9342 DSM*	2.17	Acinetobacter	95
	74	L17.1.2	*Enterobacter cloacae 20105_2 CHB*	1.712	Enterobacter	95
	75	L17.1.3	*Enterobacter cloacae 20105_2 CHB*	1.667	Enterobacter	95
	76	L17.2,5.1	*Enterobacter cloacae 20105_2 CHB*	1.761	Enterobacter	96
	77	L17.2,5.2	*Enterobacter cloacae 20105_2 CHB*	1.714	Enterobacter	96
	78	S18.2,5.1	*Acinetobacter pittii Serovar 13 DSM 9312 DSM*	2.187	Acinetobacter	94
	79	S18.2,5.2	*Enterobacter cloacae MB11506_1 CHB*	1.784	Pantoea	96
	80	S18.2,5.3	*Enterobacter cloacae DSM 46348 DSM*	1.761	Pantoea	96
	81	S18.2,5.4	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.719	Enterobacter	97
	82	L19.2,5.1	*Acinetobacter pittii Serovar 26 DSM 9321 DSM*	2.285	Acinetobacter	95
	83	L19.2,5.2	*Acinetobacter pittii Serovar 21 DSM 9342 DSM*	2.23	Acinetobacter	94
	84	L20.2,5.1	*Acinetobacter pittii Serovar 21 DSM 9342 DSM*	2.294	Acinetobacter	94
	85	L21.1.1	*Acinetobacter pittii Serovar 26 DSM 9321 DSM*	2.24	Acinetobacter	98
	86	L21.2,5.1	*Enterobacter cloacae 13159_1 CHB*	1.638	Enterobacter	95
5°Coleta	87	S3.1.1	*no reliable identification*	1.543	Cupriavidus	99
	88	S3.1.2	*Bacillus cereus*	1.851	Bacillus	97

Nº da Cepa	Nome Padronizado	Maldi	Score	16 S (gênero)	Similaridade (%)
89	S3.1.3	*Stenotrophomonas acidaminiphila*	1.78	Stenotrophomonas	99
90	S6.1.1	*Bacillus cereus*	2.03	Bacillus	99
91	S6.1.2	*Burkholderia cenocepacia + Burkholderia gladioli*	2.363	Burkholderia	99
92	L7.1.1	*Pseudomonas otitidis*	1.991	Pseudomonas	96
93	L13.1.1	*Pseudomonas aeruginosa*	2.099	Pseudomonas	98
94	S1.2,5.1	*Klebsiella pneumoniae + Enterobacter aerogenes*	2.233	Klebsiella	99
95	S1.2,5.2	*no reliable identification*	1.502	Citrobacter	99
96	S1.2,5.3	*Pseudomonas aeruginosa + Pseudomonas jinjuensis*	2.24	Pseudomonas	98
97	S3.2,5.1	*Stenotrophomonas_maltophilia (Pseudomonas_hibiscicola_#)*	1.966	Stenotrophomonas	99
98	L7.2,5.1	*Acinetobacter pittii*	2.043	Acinetobacter	99
99	L9.2,5.1	*Acinetobacter pittii*	2.016	Acinetobacter	99
100	L13.2,5.1	*Pseudomonas aeruginosa*	2.033	Pseudomonas	97
101	S14.2,5.1	*Burkholderia cenocepacia*	2.02	Pseudomonas	97
102	S4.5.1	*Pseudomonas aeruginosa + Pseudomonas jinjuensis*	2.37	Pseudomonas	97
103	S14.5.1	*Ralstonia pickettii*	1.731	Ralstonia	99
104	S4.7,5.1	*Burkholderia pyrrocinia + Burkholderia cepacia_Group*	1.902	Burkholderia	98
105	S5.10.1	*Cupriavidus necator*	1.952	Cupriavidus	99

ANEXO B – Cálculo de Massa Seca das bactérias escolhidas para experimentos de biossorção de metais

Massa Seca - Acinetobacter

D.O. Calculada	D.O observada	Filtrado (mL)	Peso inicial (g) 1	Peso Final (g) 1	Peso inicial (g) 2	Peso Final (g) 2	Variação de peso (g) 1	Variação de peso (g) 2	(g/mL) 1	(g/mL) 2	Média (g/mL)	Média (mg/mL)
0	-0.006	20	0.11234	0.11979	0.11295	0.1195	0.00745	0.00655	0.00037	0.00033	0.00035	0.4
0.1	0.09	20	0.10919	0.11875	0.10919	0.11875	0.00956	0.00956	0.00048	0.00048	0.00048	0.5
0.2	0.186	15	0.10913	0.12012	0.10913	0.12012	0.01099	0.01099	0.00073	0.00073	0.00073	0.7
0.4	0.386	10	0.1094	0.12167	0.10006	0.11552	0.01227	0.01546	0.00123	0.00155	0.00139	1.4
0.6	0.606	5	0.09993	0.10846	0.10006	0.10906	0.00853	0.009	0.00171	0.0018	0.00175	1.8
0.8	0.862	5	0.09981	0.1117	0.09981	0.1117	0.01189	0.01189	0.00238	0.00238	0.00238	2.4

Massa Seca - Burkholderia

D.O. Calculada	D.O observada	Filtrado (mL)	Peso inicial (g) 1	Peso Final (g) 1	Peso inicial (g) 2	Peso Final (g) 2	Variação de peso (g) 1	Variação de peso (g) 2	(g/mL) 1	(g/mL) 2	Média (g/mL)	Média (mg/mL)
0	0.007	20	0.1088	0.11538	0.10825	0.11516	0.00658	0.00691	0.00033	0.00035	0.00034	0.3
0.1	0.095	20	0.10803	0.11689	0.1078	0.1173	0.00886	0.0095	0.00044	0.00048	0.00046	0.5
0.25	0.238	15	0.10809	0.11889	0.10814	0.1224	0.0108	0.01426	0.00072	0.00095	0.00084	0.8
0.5	0.455	10	0.10811	0.11931	0.10823	0.12329	0.0112	0.01506	0.00112	0.00151	0.00131	1.3
1	0.958	5	0.10831	0.12113	0.10835	0.12232	0.01282	0.01397	0.00256	0.00279	0.00268	2.7
1.2	1.136	5	0.10811	0.12173	0.10844	0.12171	0.01362	0.01327	0.00272	0.00265	0.00269	2.7

Massa Seca - Cupriavidus

D.O. Calculada	D.O observada	Filtrado (mL)	Peso inicial (g) 1	Peso Final (g) 1	Peso inicial (g) 2	Peso Final (g) 2	Variação de peso (g) 1	Variação de peso (g) 2	(g/mL) 1	(g/mL) 2	Média (g/mL)	Média (mg/mL)
0	0	20	0.09969	0.10441	0.09916	0.1055	0.00472	0.00634	0.00024	0.00032	0.00028	0.3
0.1	0.109	20	0.09909	0.10734	0.1001	0.10772	0.00825	0.00762	0.00041	0.00038	0.0004	0.4
0.25	0.272	15	0.10036	0.11126	0.09926	0.11025	0.0109	0.01099	0.00073	0.00073	0.00073	0.7
0.5	0.562	10	0.0996	0.10869	0.0997	0.1109	0.00909	0.0112	0.00091	0.00112	0.00101	1.0
1	1.046	10	0.0996	0.11623	0.0997	0.11109	0.01663	0.01139	0.00166	0.00114	0.0014	1.4
1.2	1.346	10	0.0998	0.11888	0.0996	0.11984	0.01908	0.02024	0.00191	0.00202	0.00197	2.0

ANEXO C – Mínima Concentração Inibitória

Cepa	Crescimento em cobre															
	2,5mM				5 mM				7,5 mM				10 mM			
	24h	48h	72h	120h	24h	48h	72h	120h	24h	48h	72h	120h	24h	48h	72h	120h
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
54	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
58	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
62	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
63	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
64	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
65	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
66	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
67	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
68	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

69	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
70	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
73	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
74	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
88	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
89	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
90	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
91	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
92	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
93	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
94	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
95	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
96	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
97	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
98	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
99	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
101	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
102	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
103	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
104	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
105	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-

ANEXO D – Resultados das análises de metais encontrados na Lagoa de Rejeitos de cobre, em Canaã dos Carajás, realizadas pelo ICP-OES

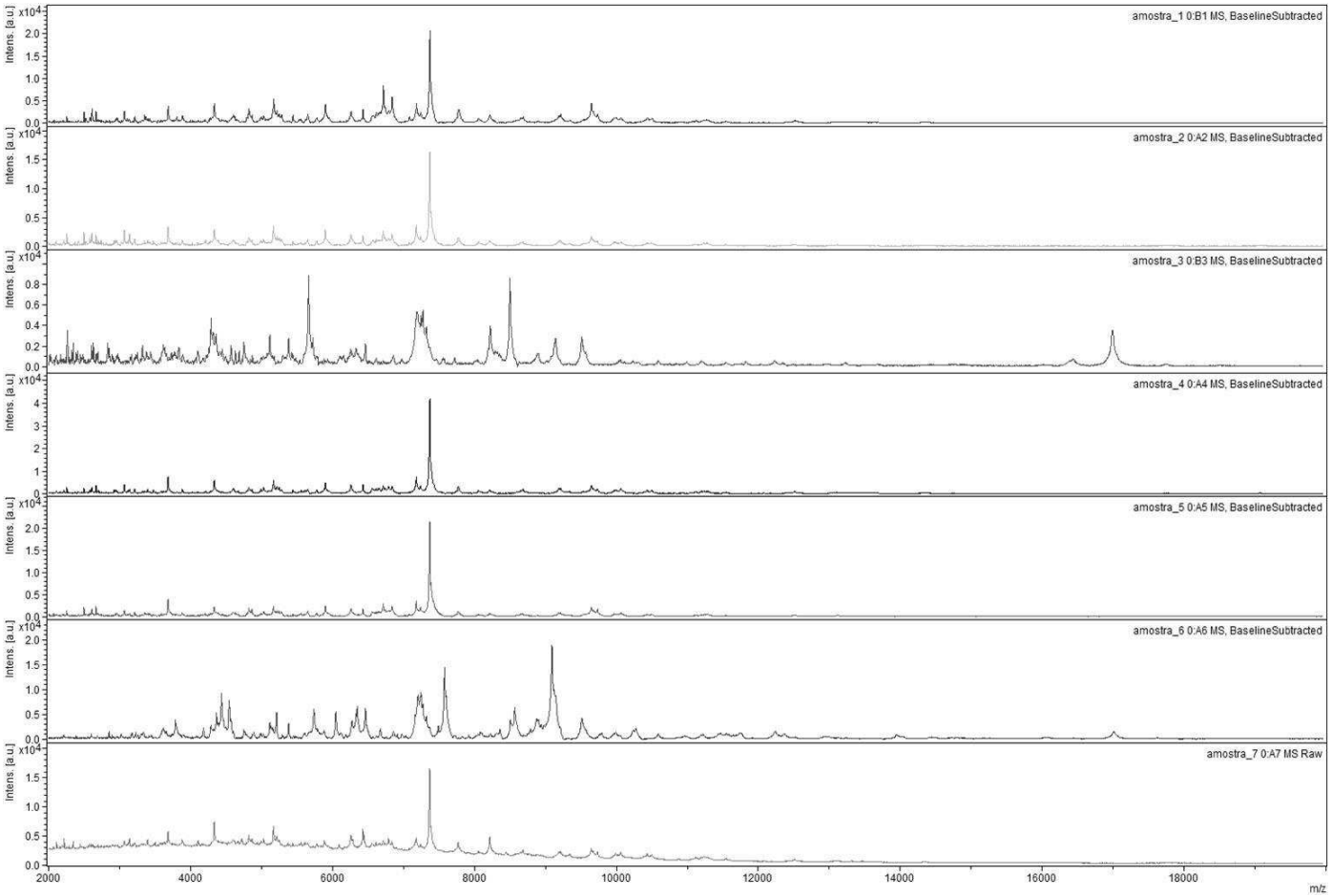
Amostras líquidas (ppm)

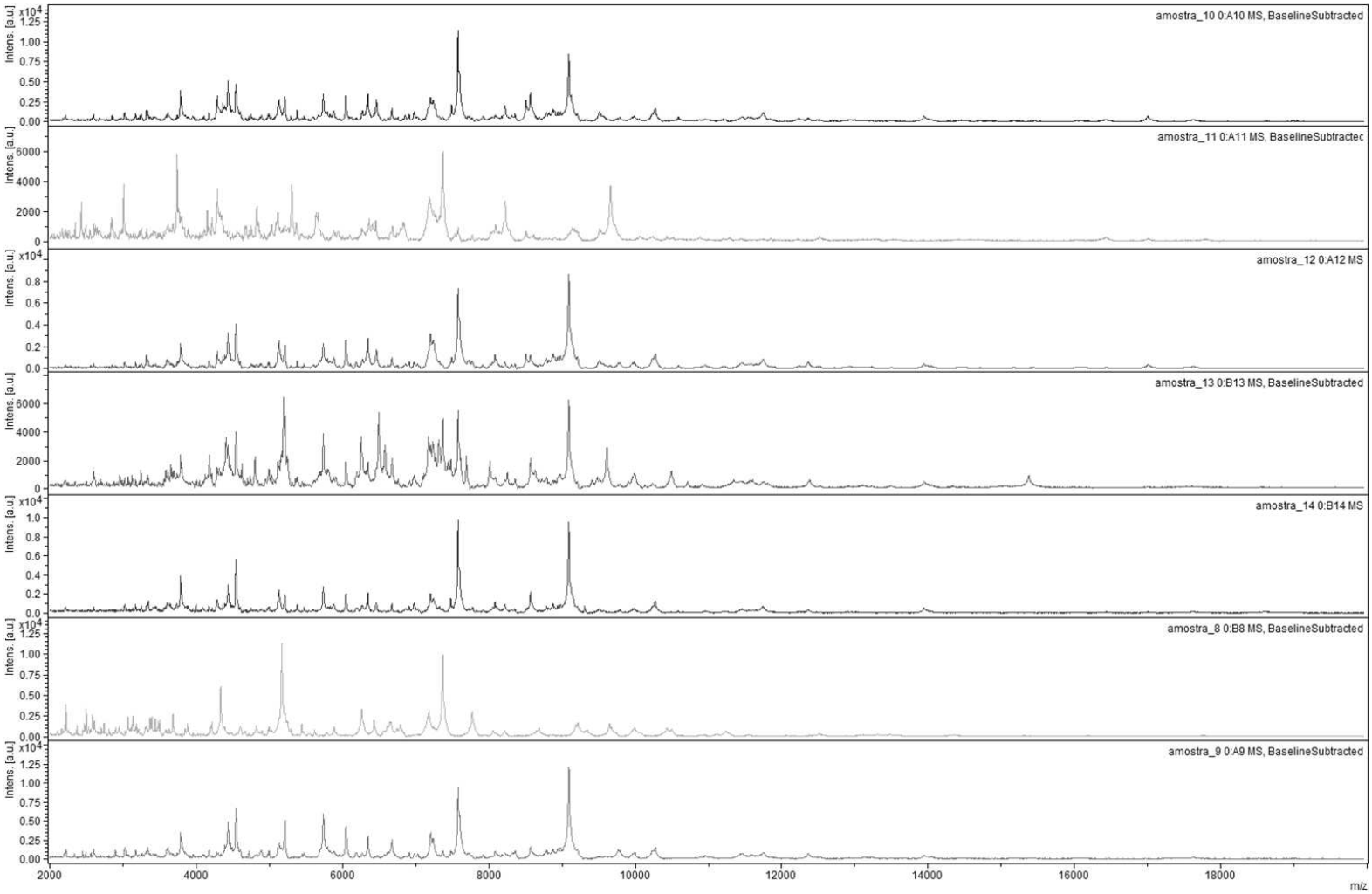
Amostras	**Cd**	**Cr**	**Cu**	**Fe**	**Mn**	**Ni**	**Zn**
Padrão 5 ppm	4,95	4,76	5,06	4,95	4,85	4,75	4,59
9 L	0,9	0,48	0,44	0,47	0,47	0,54	0,99
13 L	0,9	0,48	0,64	0,5	0,56	0,55	0,78
15 L	0,9	0,48	1,43	1,63	0,49	0,56	0,86
Branco digerido	0,9	0,48	0,45	0,48	0,47	0,54	1,58

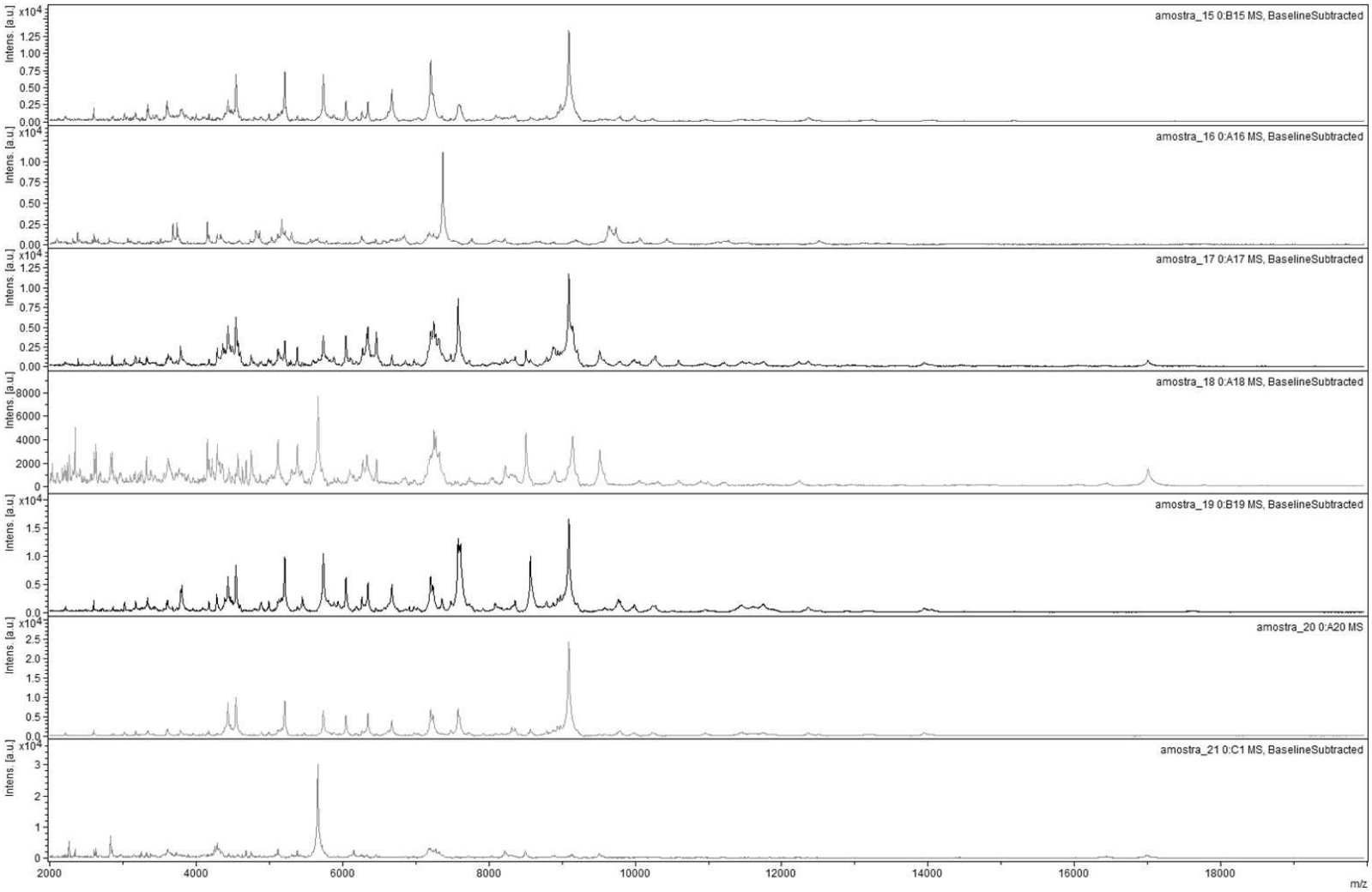
Amostras sólidas (ppm)

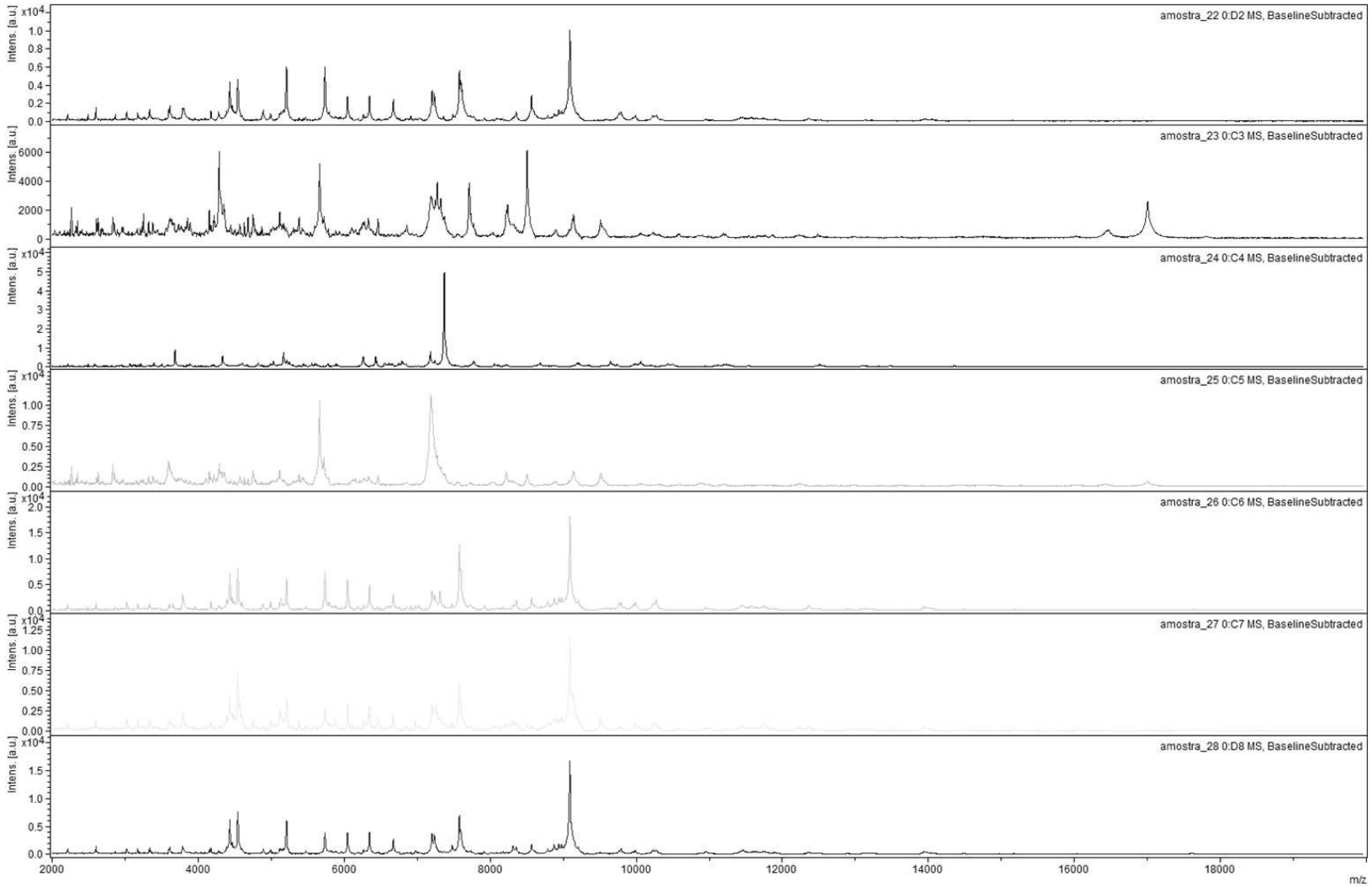
Amostras	**Cd**	**Cr**	**Cu**	**Fe**	**Mn**	**Ni**	**Zn**
1S	11,2	1491,72	32,79	335,09	13,21	20,53	23,31
2S	11	1521,71	31,01	431,14	13,64	20,96	25,7
3S	11,2	1546,51	41,73	593,69	13,81	23,25	22,97
6S	11,3	1508,37	24,76	541,12	13,24	22,6	22,88
8S	11,1	1475,91	20,62	271,85	17,91	19,12	23,82
10S+L	11,2	1488,73	678,99	276,47	15,92	21,59	22,22
13S	11,3	1547,21	207,22	1070,77	20,67	23,58	22,55
14S	11	1509,64	709,68	457,58	16,2	21,1	22,2

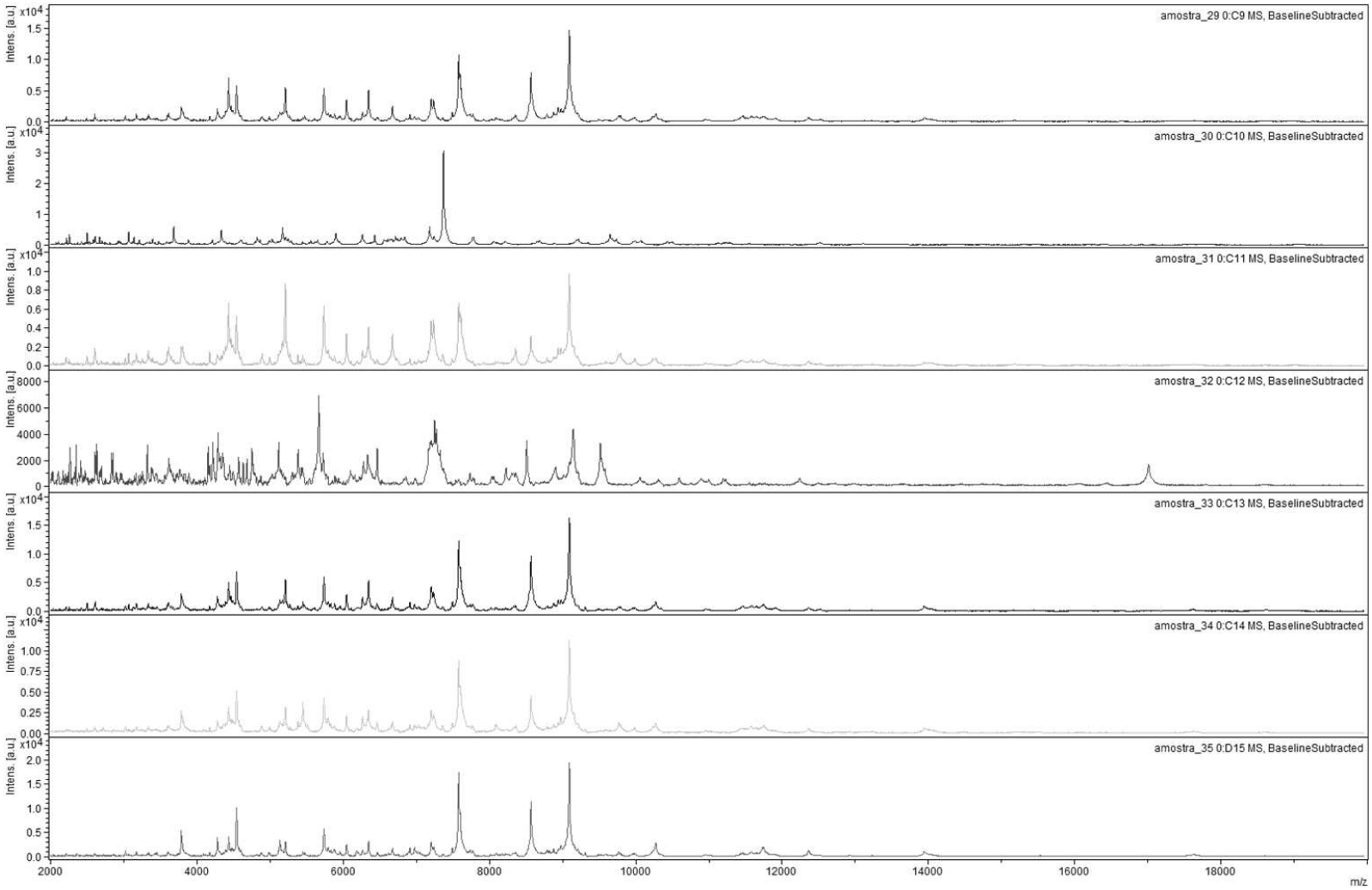
ANEXO E - Espectros de Identificação no MALDI TOF

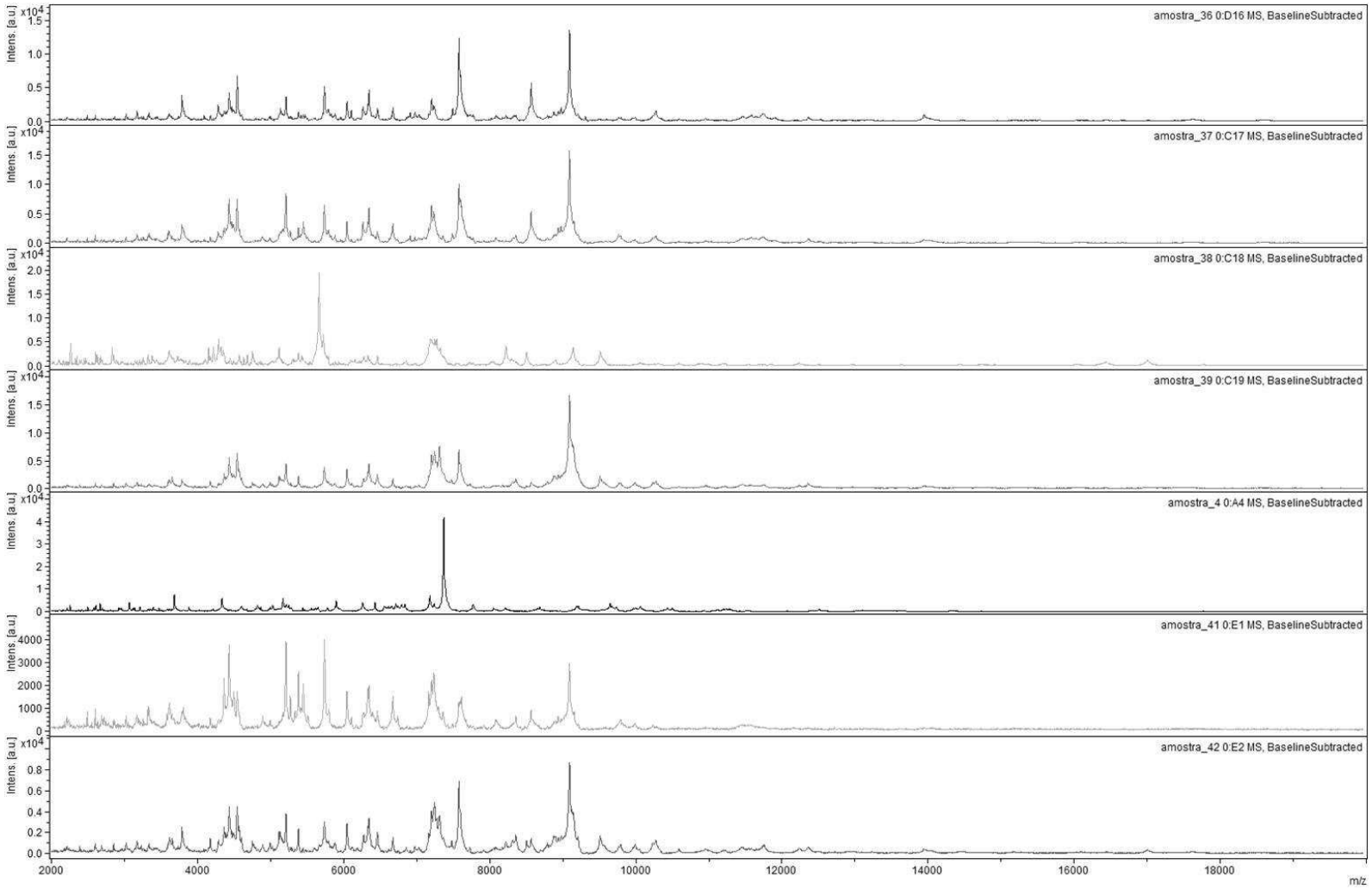


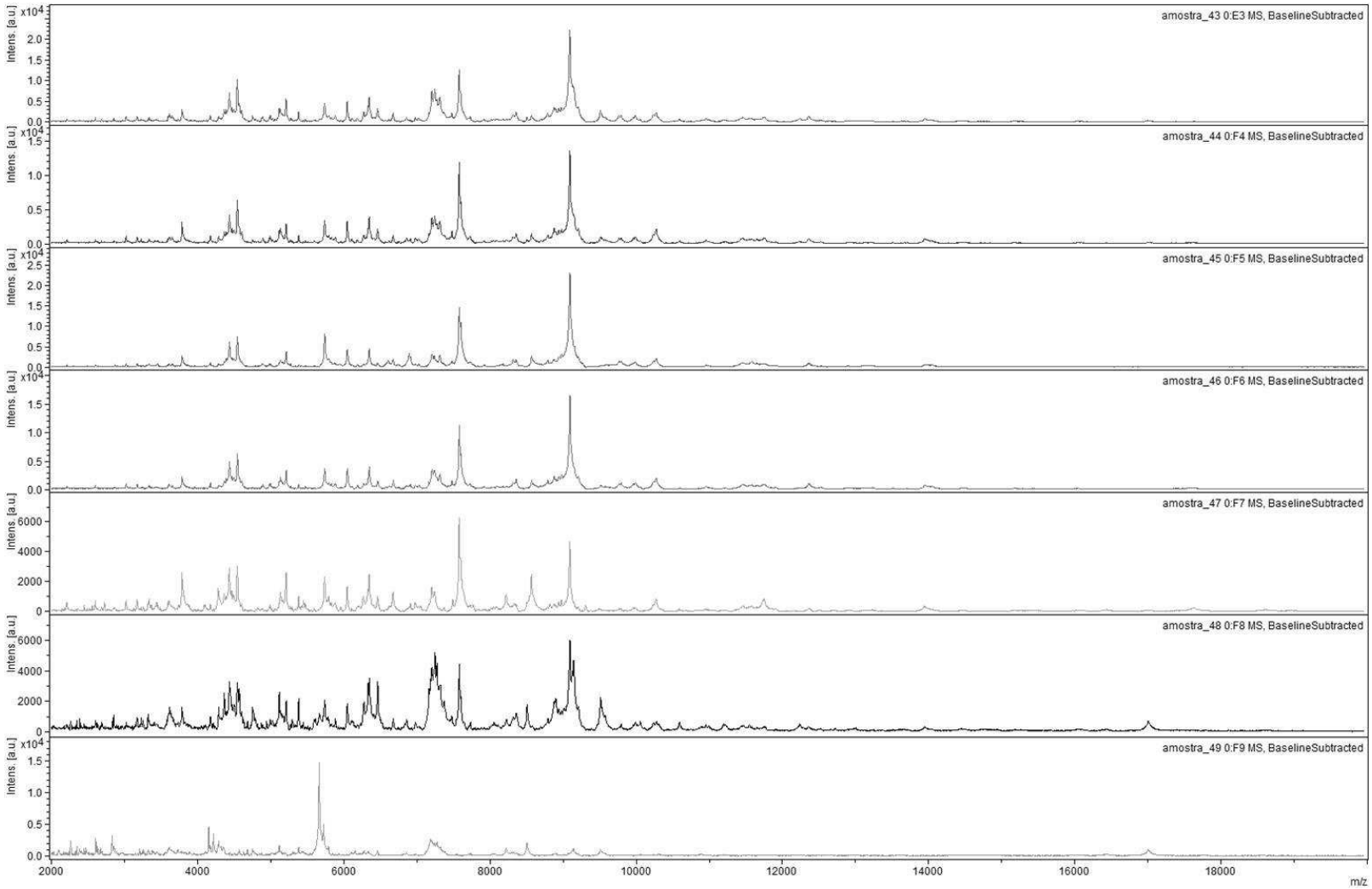

amostra_10 0:A10 MS, BaselineSubtracted
amostra_11 0:A11 MS, BaselineSubtractec
amostra_12 0:A12 MS
amostra_13 0:B13 MS, BaselineSubtracted
amostra_14 0:B14 MS
amostra_8 0:B8 MS, BaselineSubtracted
amostra_9 0:A9 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
m/z

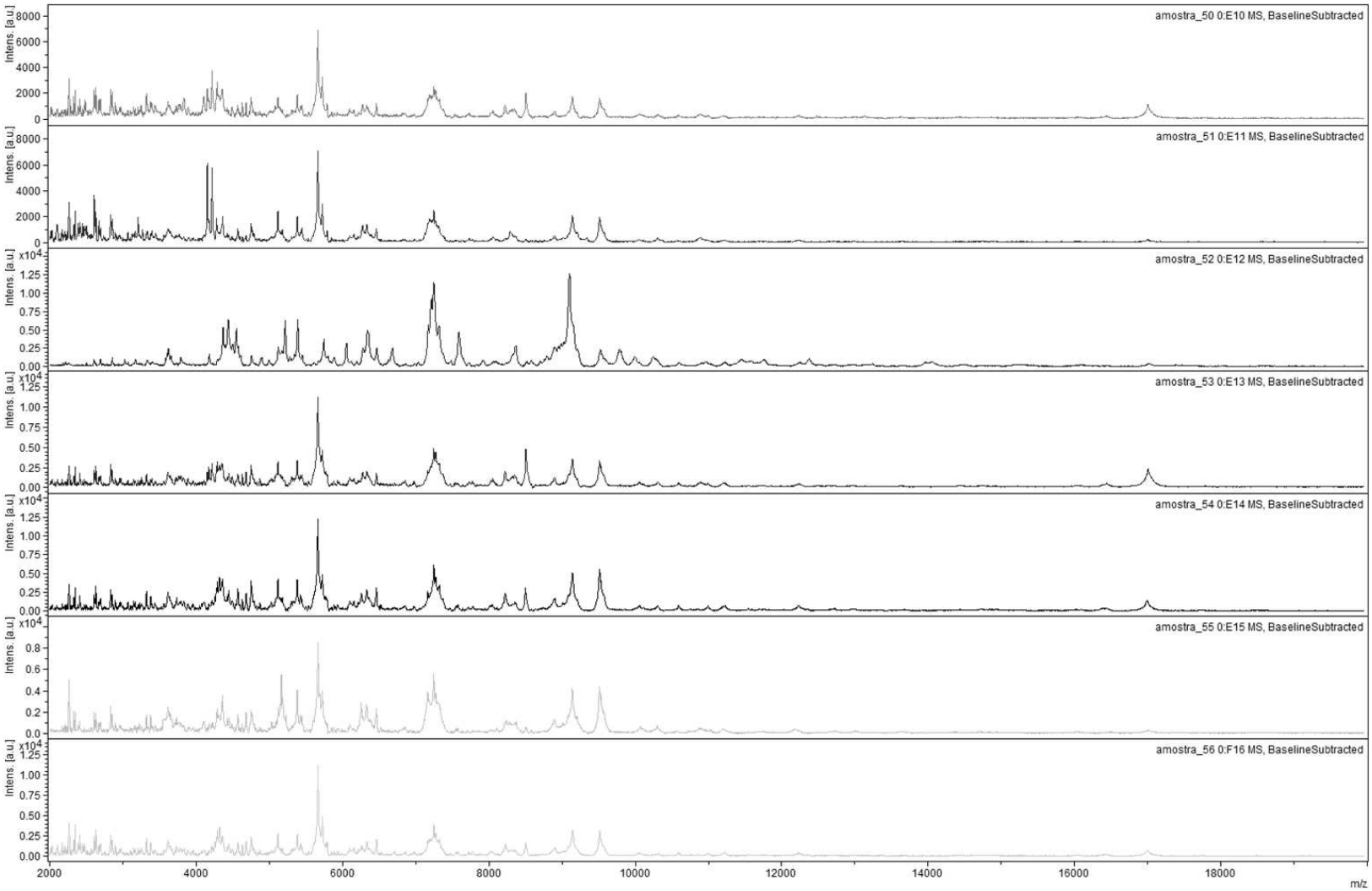

amostra_15 0:B15 MS, BaselineSubtracted
amostra_16 0:A16 MS, BaselineSubtracted
amostra_17 0:A17 MS, BaselineSubtracted
amostra_18 0:A18 MS, BaselineSubtracted
amostra_19 0:B19 MS, BaselineSubtracted
amostra_20 0:A20 MS
amostra_21 0:C1 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

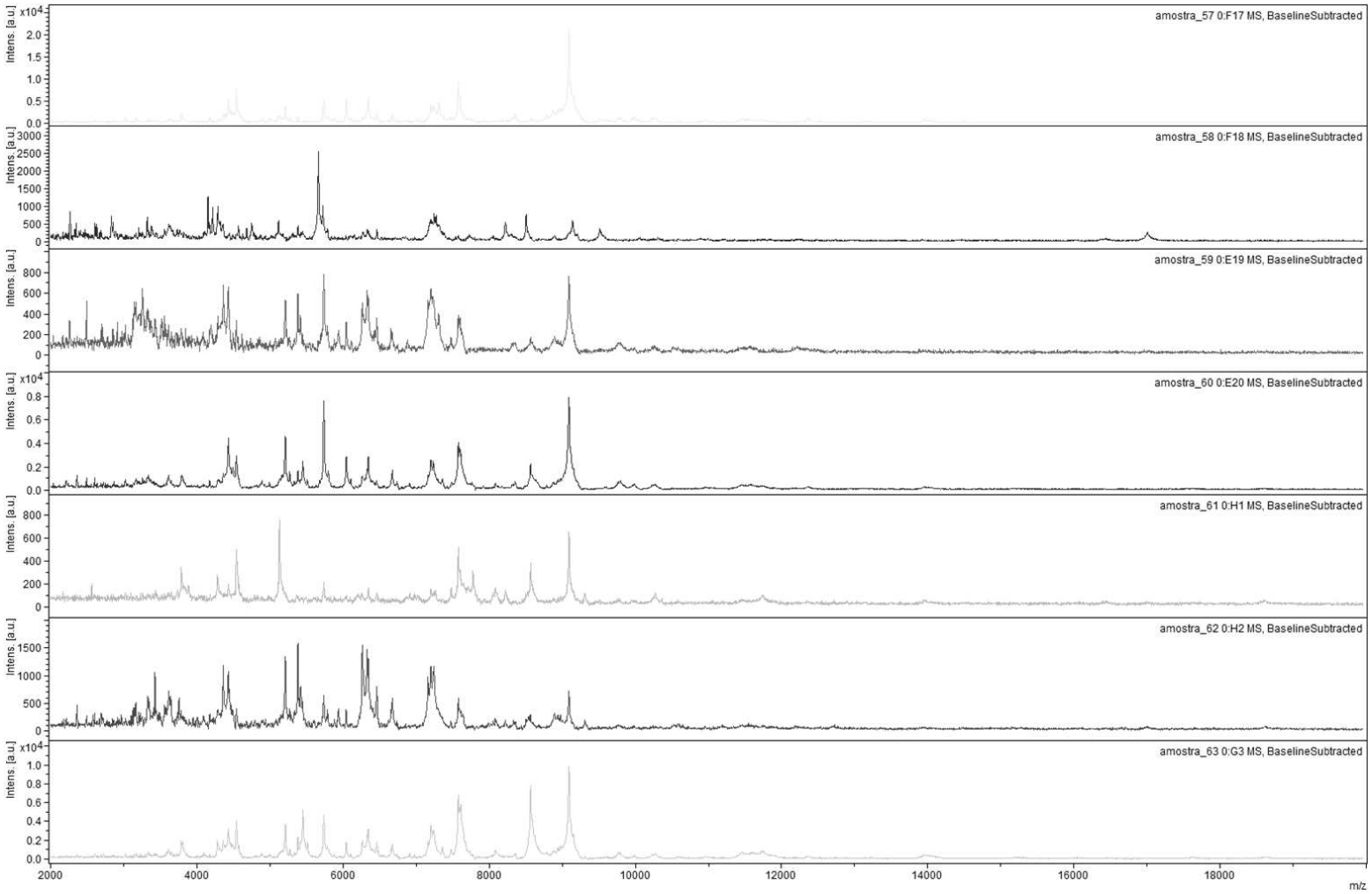

amostra_22 0:D2 MS, BaselineSubtracted
amostra_23 0:C3 MS, BaselineSubtracted
amostra_24 0:C4 MS, BaselineSubtracted
amostra_25 0:C5 MS, BaselineSubtracted
amostra_26 0:C6 MS, BaselineSubtracted
amostra_27 0:C7 MS, BaselineSubtracted
amostra_28 0:D8 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
m/z

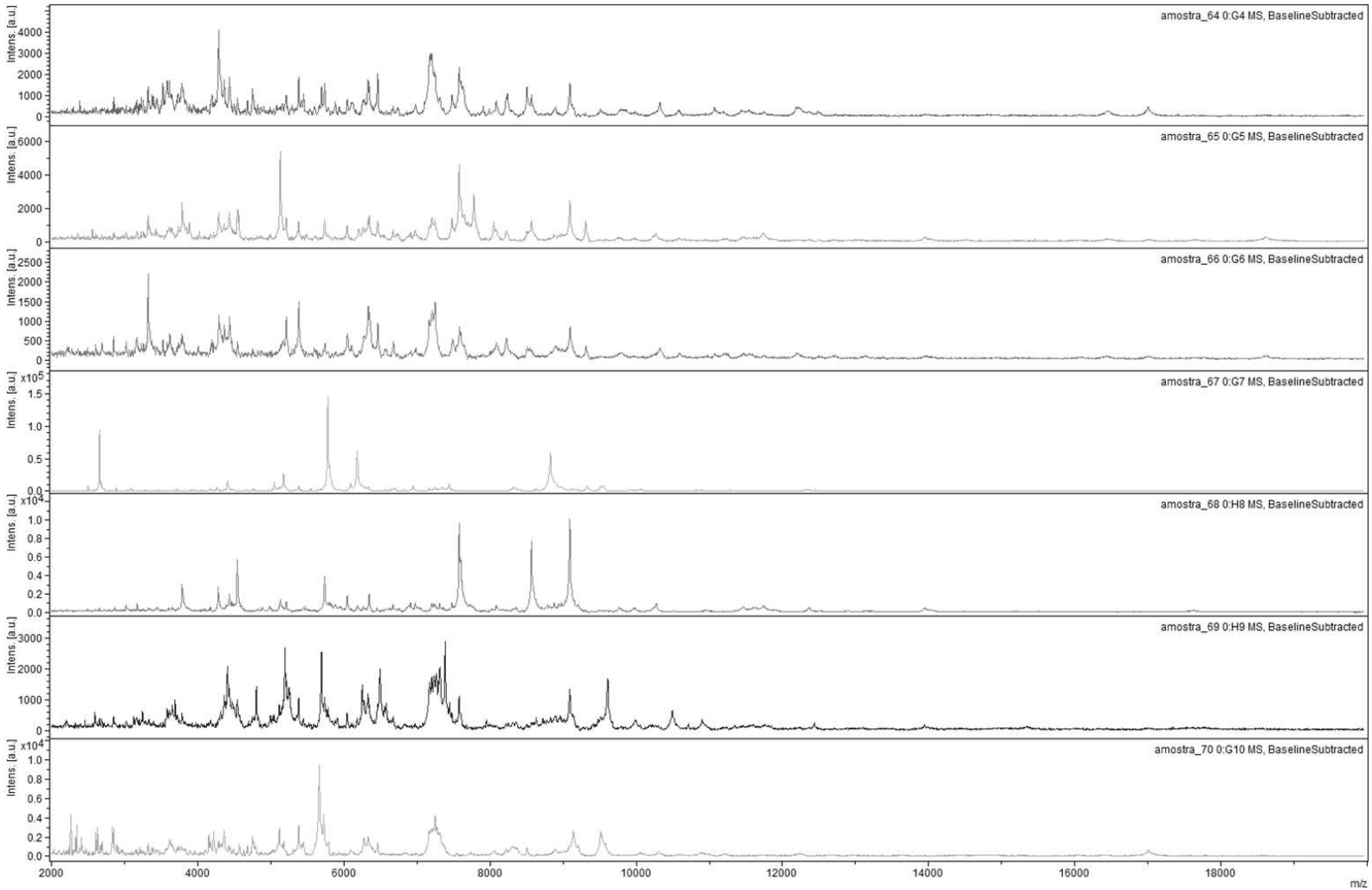

amostra_29 0:C9 MS, BaselineSubtracted
amostra_30 0:C10 MS, BaselineSubtracted
amostra_31 0:C11 MS, BaselineSubtracted
amostra_32 0:C12 MS, BaselineSubtracted
amostra_33 0:C13 MS, BaselineSubtracted
amostra_34 0:C14 MS, BaselineSubtracted
amostra_35 0:D15 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

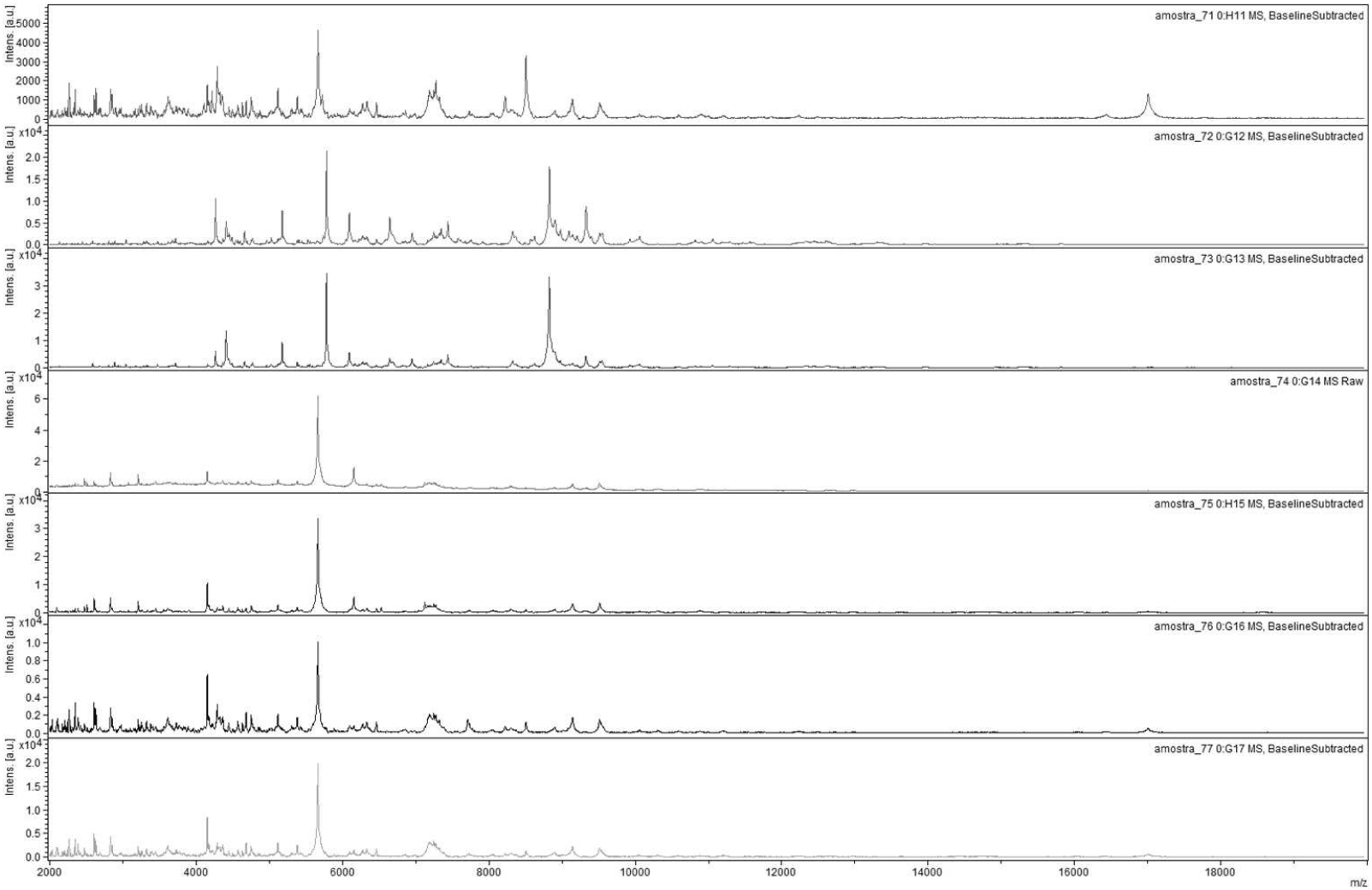

amostra_36 0:D16 MS, BaselineSubtracted
amostra_37 0:C17 MS, BaselineSubtracted
amostra_38 0:C18 MS, BaselineSubtracted
amostra_39 0:C19 MS, BaselineSubtracted
amostra_4 0:A4 MS, BaselineSubtracted
amostra_41 0:E1 MS, BaselineSubtracted
amostra_42 0:E2 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
m/z

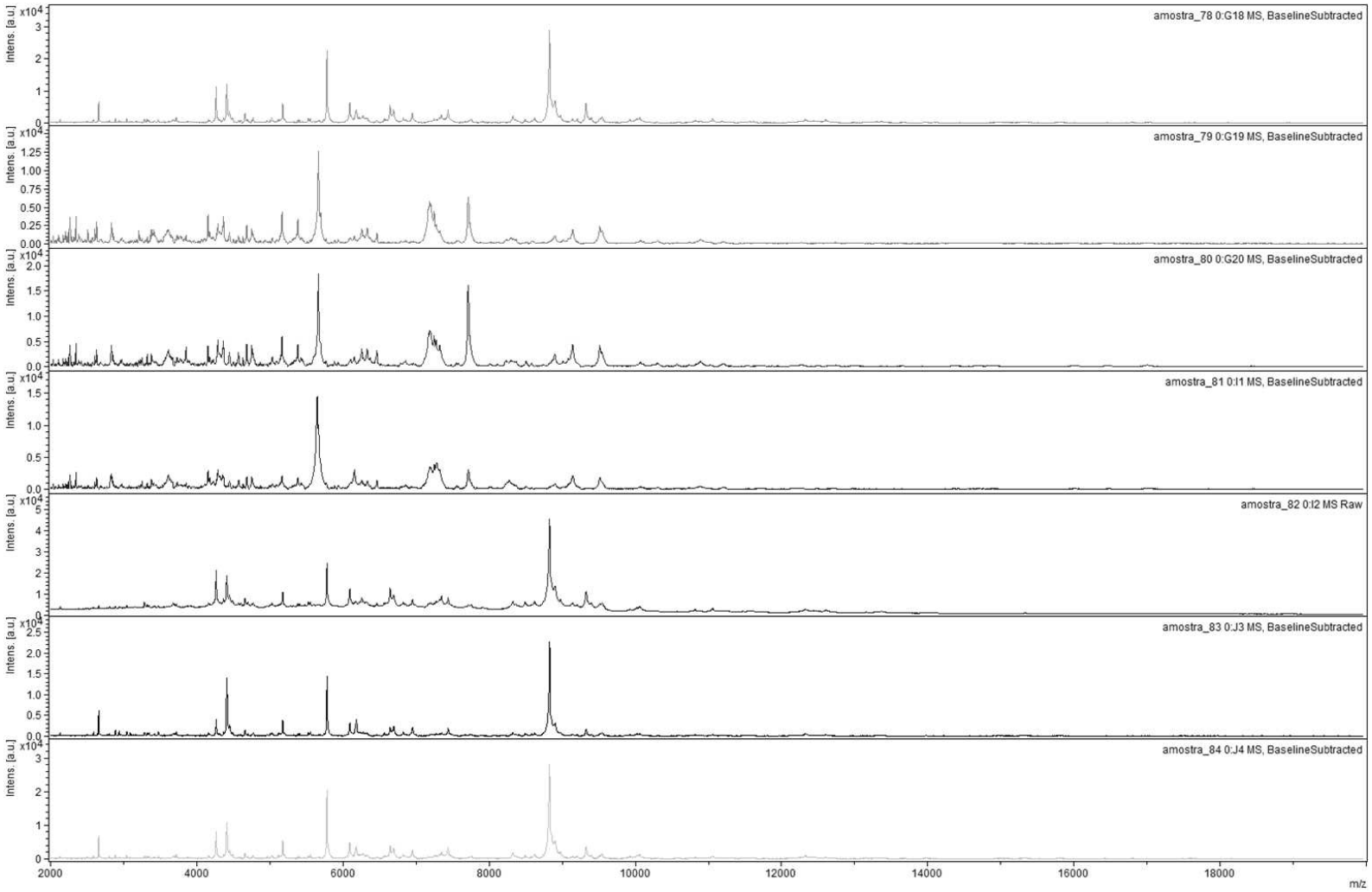

amostra_43 0:E3 MS, BaselineSubtracted
amostra_44 0:F4 MS, BaselineSubtracted
amostra_45 0:F5 MS, BaselineSubtracted
amostra_46 0:F6 MS, BaselineSubtracted
amostra_47 0:F7 MS, BaselineSubtracted
amostra_48 0:F8 MS, BaselineSubtracted
amostra_49 0:F9 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

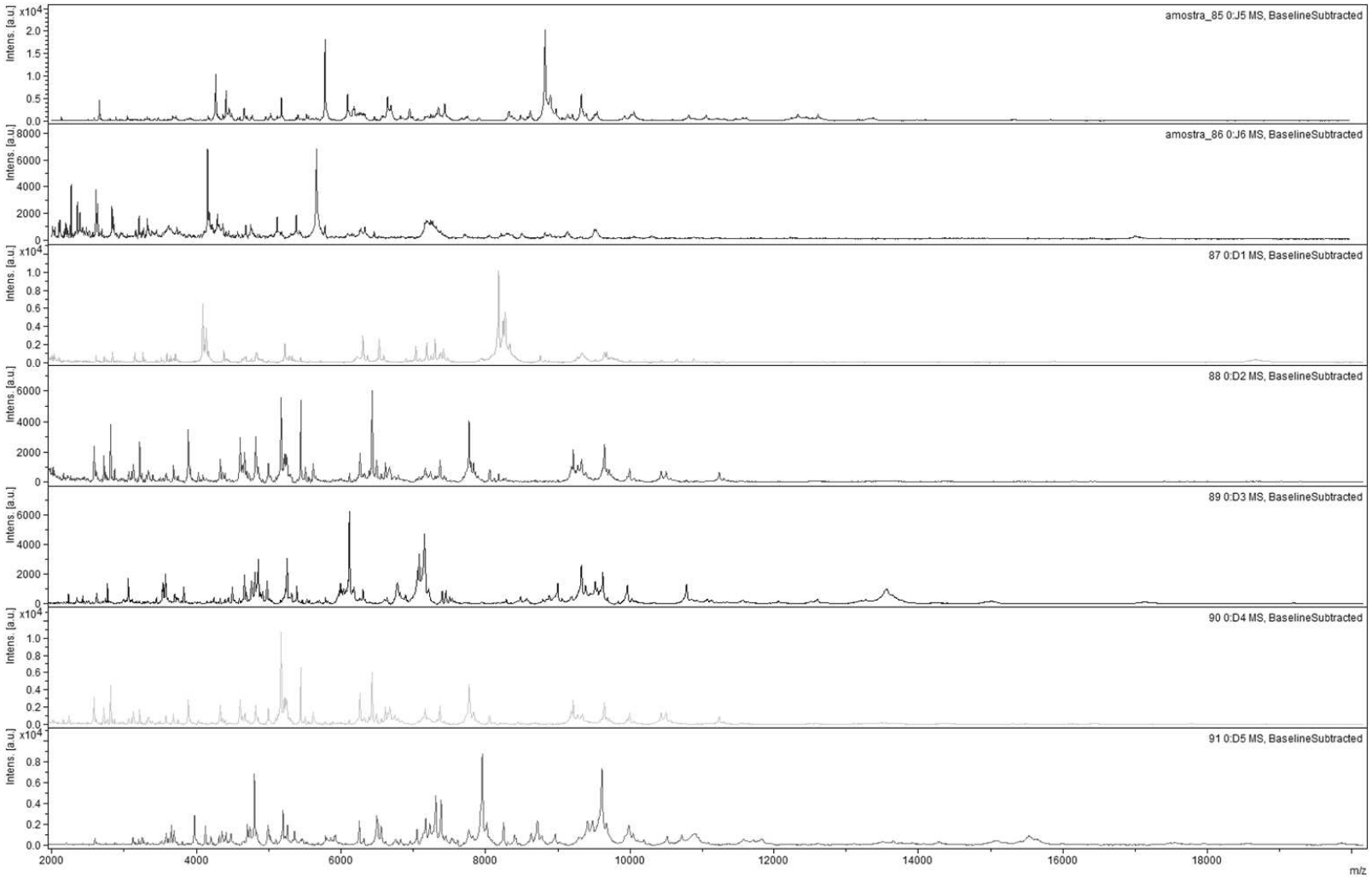

amostra_50 0:E10 MS, BaselineSubtracted
amostra_51 0:E11 MS, BaselineSubtracted
amostra_52 0:E12 MS, BaselineSubtracted
amostra_53 0:E13 MS, BaselineSubtracted
amostra_54 0:E14 MS, BaselineSubtracted
amostra_55 0:E15 MS, BaselineSubtracted
amostra_56 0:F16 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

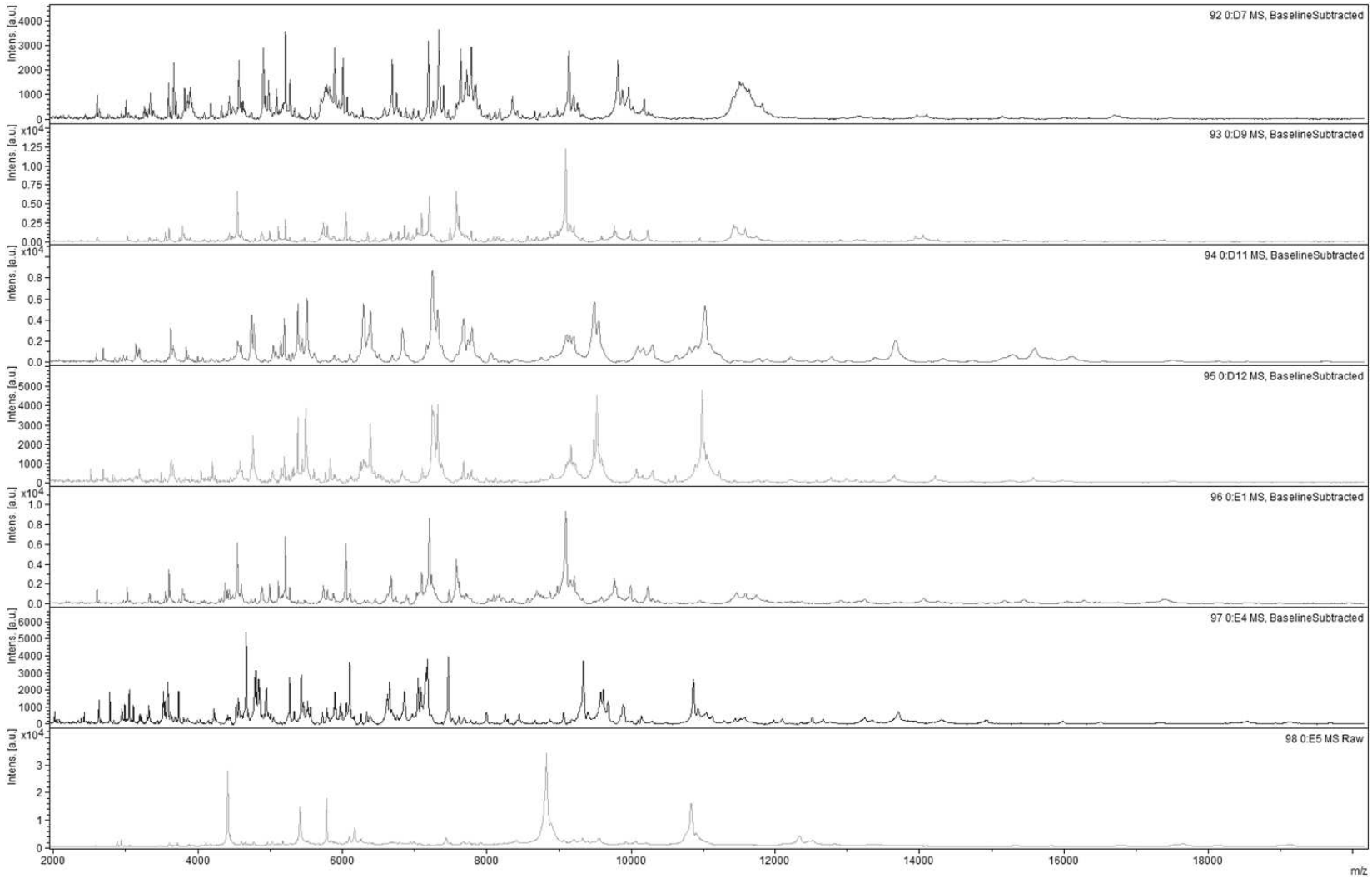

amostra_57 0:F17 MS, BaselineSubtracted
amostra_58 0:F18 MS, BaselineSubtracted
amostra_59 0:E19 MS, BaselineSubtracted
amostra_60 0:E20 MS, BaselineSubtracted
amostra_61 0:H1 MS, BaselineSubtracted
amostra_62 0:H2 MS, BaselineSubtracted
amostra_63 0:G3 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

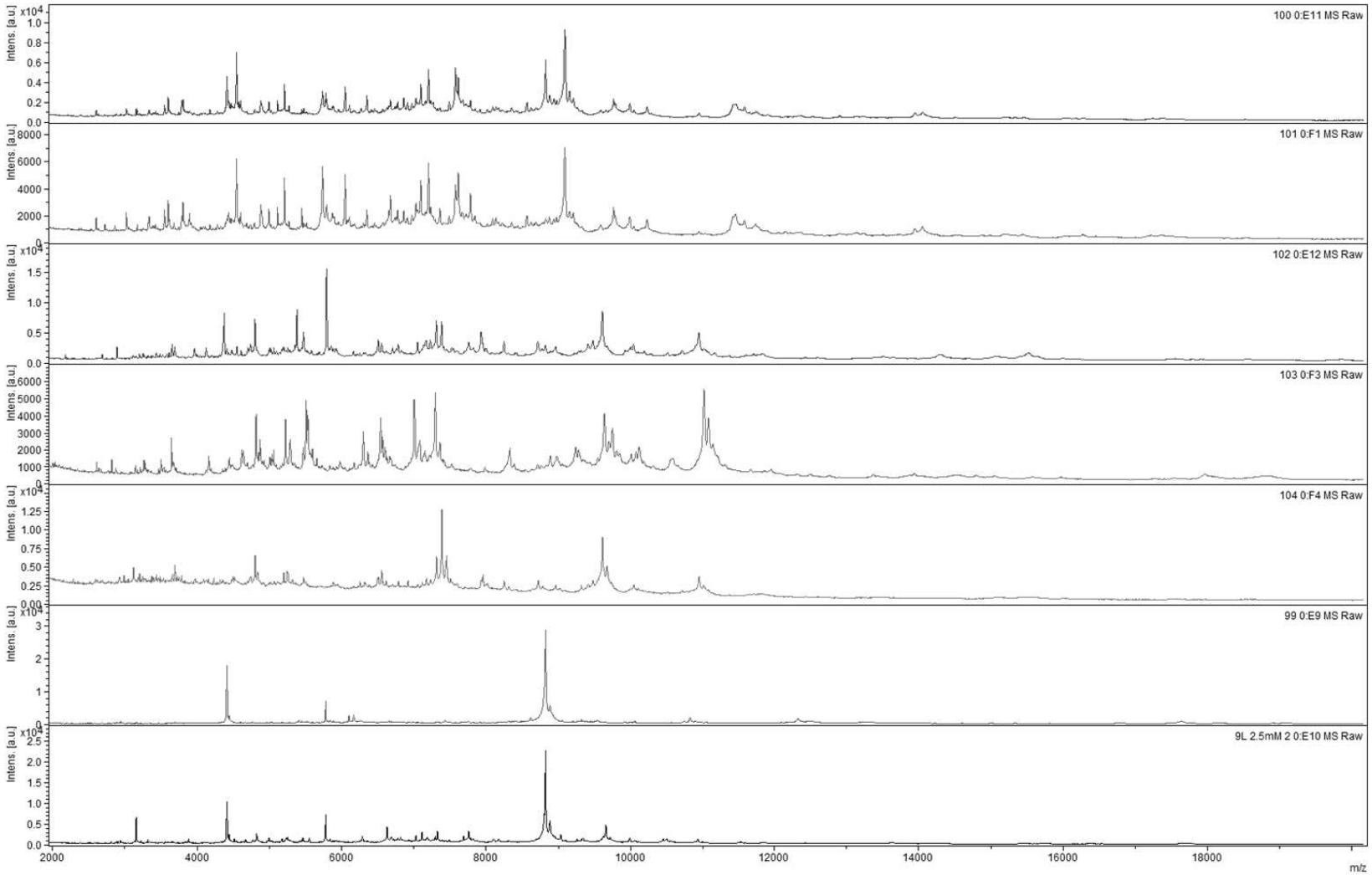

amostra_64 0:G4 MS, BaselineSubtracted
amostra_65 0:G5 MS, BaselineSubtracted
amostra_66 0:G6 MS, BaselineSubtracted
amostra_67 0:G7 MS, BaselineSubtracted
amostra_68 0:H8 MS, BaselineSubtracted
amostra_69 0:H9 MS, BaselineSubtracted
amostra_70 0:G10 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^5
x10^4
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
m/z


amostra_71 0:H11 MS, BaselineSubtracted
amostra_72 0:G12 MS, BaselineSubtracted
amostra_73 0:G13 MS, BaselineSubtracted
amostra_74 0:G14 MS Raw
amostra_75 0:H15 MS, BaselineSubtracted
amostra_76 0:G16 MS, BaselineSubtracted
amostra_77 0:G17 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
m/z


amostra_78 0:G18 MS, BaselineSubtracted
amostra_79 0:G19 MS, BaselineSubtracted
amostra_80 0:G20 MS, BaselineSubtracted
amostra_81 0:I1 MS, BaselineSubtracted
amostra_82 0:I2 MS Raw
amostra_83 0:J3 MS, BaselineSubtracted
amostra_84 0:J4 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
m/z


amostra_85 0:J5 MS, BaselineSubtracted
amostra_86 0:J6 MS, BaselineSubtracted
87 0:D1 MS, BaselineSubtracted
88 0:D2 MS, BaselineSubtracted
89 0:D3 MS, BaselineSubtracted
90 0:D4 MS, BaselineSubtracted
91 0:D5 MS, BaselineSubtracted
Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000


92 0:D7 MS, BaselineSubtracted
93 0:D9 MS, BaselineSubtracted
94 0:D11 MS, BaselineSubtracted
95 0:D12 MS, BaselineSubtracted
96 0:E1 MS, BaselineSubtracted
97 0:E4 MS, BaselineSubtracted
98 0:E5 MS Raw
Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000


100 0:E11 MS Raw
101 0:F1 MS Raw
102 0:E12 MS Raw
103 0:F3 MS Raw
104 0:F4 MS Raw
99 0:E9 MS Raw
9L 2.5mM 2 0:E10 MS Raw
Intens. [a.u.]
m/z

ANEXO F

Sequências FASTA do gene ribossomal 16 S das Bactérias Isoladas

>Cu_6_10_12_14_17_27_39_42_43_44_46_48_52_56
CTGATCGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGAGTCCCATTAATACCTTG
CTGTTTTGACGTTACCAACAGAAAACACCTGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTTTCCAGTAAAGGAAAGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
CACCAG
>Cu_3_56
CTGATCGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGATAAAGCACTTTAAGTTGGGAGAGGACTGTTAATACCTT
GCGTTTTGACGTTACCAAAGAAAGGCGCCTTGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAACGAAAACGAGAAAAGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG
AACACC
>Cu_32_68
TGATGCGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGAGGCACTGGTTAATAACC
ACAGCAATTGACGTTACCCGCAGAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTATACTGACGAGGAAAGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG
GAATAC
>Cu_54
GCCTGAGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGATAAAGTACTTTCAGCGGGAGGGGAGGCCCTCTTAA
TAACCGCAGCAATTGACGTTACCCAGAAGAGAGCACCAGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCAGCGGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGTCTATGCAGGAAGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TCTGGA
>Cu_71
CCTGATCGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGAGGGCCCTCTTAATAAC
CATAGCAATTGACGTTACCCGAGAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTTTACTGATCGAAAGAGGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
TGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATA
>Cu_73_74
GCCTGAGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGGGGGCCTGGTTAAT
AACCACAGCAATTGACGTTACCCGGAAGAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT

TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGAACTTAACGAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG
AGGAAT
>Cu_76_77
CCCTGAGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGAGGGGGCTTCCATAATAA
CCTCAGAGATTGAAGTTACCCGGAAAAAGGCATCGGGTAAATTCTTTGCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGGAAGGG
TTAATCGGAATTACTGGGGGTTTTCCACCTAAAAGAGGGGGCTGTCAAGTCGGAAGGGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTCCAAACTGGGAGGCTAGGTCTTGTAAAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATCT
GGAGGA
>Cu_64
CTGCTGTTGGTACACGCTATTTCGCAGTAGATTCCTCACTGCTGCCTCCATTAGGAGAGGGGGCACGTATACCATAAAGG
ACTTCCGAAAAACACCAAGCTATTTCGCGCCGATCGAGGGAAGGTAACGGATTACTGGGGTATGCATACAGACGAAAGGG
CTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGA
TGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCTTTGGCCTAACAC
TGACGT
>Cu_69_70
TGCTGCTGGTCACGCTTTTCGCAGTAAATCTCCGTGCTGCCTCCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCACCTTAATACCTAGAG
ATAGTGGACGTTACTCGAGAAAAACACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGATTTACTGGGCGTACAGCTCAAAGGAAAACGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGC
ATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA
ATACCG
>Cu_75_80_81_82
TATGCTCTGTGGTCACGCTATTGGCAGTAAATCCTCACTGCTGCCTCCACTTTAAGCGAGGAGGGGGCTTTAGTTAACCT
AGAGAAGGGAGTTCTGAAAAAAGGCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
TTTACTGGGCACAAACAAAGGCGGAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTC
GATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGATGG
>Cu_26_35_45_47_65
CGAGCGGGCACTGTATTGAGGTGAGTAGCTTACAAGCACCCCCCTAACTGCGTTGAGGGC
ACGGAAACAAGGTGAAGCGTAATCGGAATACTGGGCGAAAAAAGGGGGGAGGGTCAGCAA
GTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAG
TACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACCACTTGTGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGAGTGGG
GAGCAA
>Cu_79
CTGATCGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTATGAGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGAGGGCTTTCTTAATACCT

AGAGATAGTGGACGTTACTGAGAAACCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGATTTACTGGGCGCAAAGATAAAGAGAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTG
CATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG
AATACC
>Cu_1_2_4_5
GACGGACACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAGGGTATTGAATAAGCTG
GCACCTTGACGGTACCTAACAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGAATTATTGGGCGTTAAATCCGAAGAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
CACCAG
>Cu_7
CTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGAGGGGCAGGTTAATAAC
CTCAGCAATTGACGTTACCCGAGAAAAGGAGCGGGTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTATCTGCGACAGCAAAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG
AGGAAT
>Cu_8
TGCAGCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAGGGGGTGGTTAATAACCAC
AGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA
ATACCG
>Cu_24
GGCCTGTGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGAGGGGCCTTGGTTA
ATAACCTCAGCAATTGACGTTACCGAGAAAAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTTCAAAAGCACAGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
CTGGAG
>Cu_30
GCCCTGTGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGGGGCCTTGGTTAAT
AACTTCAGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAGGCGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGTTTCCAGCTAGAGAGGGAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
CTGGAG
>Cu_13
ATCAGCTGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAGCACTCCTAATATGGCCGG

GGGATGACGGTACCGGAAGAAAAACACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTTTAGCATGCGAAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT
ACCGAT
>Cu_66
CCAAGCGAGGCCTGATCAGCCATGCCGCGTGTATGAGAAGGCCTTCTGGTTGTAAAGTAC
TTTCAGCGGGGAGGAGGGCCCTGCTTCATACCCATAGAAATTGACGTTACCTGGAGAAAA
AGGGCGGGTAAATTCTTTGCAGGAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGGAAGGGTTAATCGGA
ATTACTGGGGGTTTTTCGACTCAAGAAGGGGGCTGTCAAGTCGGAAGGGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTCCAAACTGGGAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGAGAAT
TCCAGGGGTAGCGGTGAAAAAGCGTAGAAGTCTGGAGGGAACACGGTGGGCAAAGGGGCC
CCCTGGACCCAAACTGACCCTCAGGTGCGAAAGCGAGGGGAGCAAACAGGATTAGATACA
CCCGGAGAGA
>Cu_11
TGATCACCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAGGAGGGTTAATACCTTGC
TGTTTTGACGTTACCAACAGAAAACACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTCAAAAAAGAAGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCA
>Cu_16
GCTGATAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTGAGATTAGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGAGGCCTTAGTTAATACC
TGCTGTTTTGACGTTACCAAAGAAAGGAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCCCAAAGCGAAGAAAAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA
AGGAAC
>Cu_9_19_20_28_29
GATCAGCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAGCCGTTTAATACCTTGCT
GTTTTGACGTTACCAACAGAAAAACACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTATCGCGTCCCGATGAGGGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCA
>Cu_18
GCCCTGATCAGCCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTTTCGGTATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGAGGGGGGCCTAGTTAATA
CCTTGCTGTTTTGACGTTACCAAAAAAGGGGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGTGTAAAGACGCACGAAGGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA

GGAAGG
>Cu_21
GCCTGAGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGGCCGTGGTTAAT
AACCGCAGCAATTGACGTTACCCGGAAAAAGCGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTCGAACGGAGGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGA
>Cu_23
CTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGTGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGGGAAGGGACGAGGTTAAT
AACCTCAGCAATTGACGTTACCCGGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTTCAGAGTCGAGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGATCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAA
>Cu_25
CCTGATCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGCGACGTGGTTAA
TAACCACAGCAATTGACGTTACCCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTTTCAAGCAAGAGAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGA
>Cu_38
GCCCTGTGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGGACCTCCTTAA
TAACCGCAGCAATTGACGTTACCCAGAAGAAGCGCCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTTCAGAGTAGAGAAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC
TGGAGG
>Cu_49
TGATGCGCCATGCCGCGTGTATGAGAAGGCCTTGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGGATACTTTAATAACCGCAG
CAATTGACGTTACCCGAGAAAAACCAGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGATCAAGGAAAAGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATT
CGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA
CCGGTG
>Cu_50
CTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGGACCTGGTTAATAACC
ACAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAAACGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGAGAGAGAAGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
TGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA

GGAATA
>Cu_51
TGATGCGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGATAAAGTACTTTCAGCGGGGAGTGAGTCCTGGTTAATAA
CCACAGCAATTGACGTTACCCGAGAGAAGCGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTTACGACTCGCAAAGAAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGA
>Cu_53
CCTGATCAGCCATGCCGCGCTGTATGAAGAAGGCCTTGGGATTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGCCTTTAATAACC
ACAGCAATTGACGTTACCCGAGAAAAGCCCTAACTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTTCCGAGACTAGAGGACAGCAGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGATCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAA
>Cu_57
CTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTCGGGATTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGAACCTCCCTAATAACTA
CAGCAATTGACGTTACCGAAAAGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGTTCCAAAAATGATGGGGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT
ACCGGT
>Cu_22_36_37_41_60
GCCTGACCGCCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTCTTCGGTATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGGGAAGGCCTAAGTTAATA
CCTTGCTGTTTTGACGTTACCAAAAAAGGGGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCTTAAAGTCAAAAGAGAGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG
GAAGGA
>Cu_58
CTGTTCGCCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTATTCGGTATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGGGGCCCTCCCAATCACC
TTGCTGTATGACGTTACCAAAGATGCACCGTCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTTTAAAACTAAGGAAGGCGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG
AACACC
>Cu_61
CTGATCGCCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTCTTCGGGATTGTAAAGCACTTTAAGGTTGGGAGGAGCCTGACCTAATATG
TTGGGGTTATGACGTTACCAAAAAAAGCAGGGGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTCAAGATACGAAAAAGGTGGTTCAGCAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGATGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA

AGGAAC
>Cu_63
ACTGCCAACCTAGTGATGACTTACCAAAGAAACTCCTCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGATACGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGAAAGAGGGCGTGAGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGAA
TACCCC
>Cu_67
CTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAGGCCTTCTGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGAAGGCCCCTCCTTAATAA
CTTCAGAATTGAATTCCCGAAAAAAAAAAACGGGTAAATTCTTGGCAGCAGCCGCGGTAATACCGAAGGGGGAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCTTTCACTTCAAAAGGGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGGGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATTCCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAAAGGGGGGTAGAATTCCAGGGGTAGCGGGGAAATGGGTAAAGATTTGGAG
GAAAAC
>Cu_72
CTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGGGCCTAGTTAATAACC
TCAGCAATTGACGTTACCCGAGAAGGCCCAGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTATACAACTCAAAAGGGAGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG
AATACC
>Cu_78
CCTGATCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGGGAAGCGAGGGGTTAATA
ACCTCAGCGATTGACGTTACCCGAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTTAAGTGAACAGAGAAGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG
AGGAAT
>Cu_83
GCCTGAGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGGGCTGTTAATAA
CCACAGCAATTGACGTTACCCGAGAAAAGCGCCCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTTTACAGTCAAAGGAAGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
TGCATTCGAAACTGGGAGGCTAGAGTTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATA
>Cu_84
GGACTGTCAGCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAGGCTCTGGCTAATA
CCCGGGGTCGATGACGGTACCGGAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGATAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ATGGCGCTTGTGACTGTCAGGCTAGATGCGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTG

GAGGAA
>Cu_85
CTCGAGTGAGGACACGCCGCGTGAGTGATGAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAGAAAAGTGCTAGTTGAA
TAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG
GAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA
TGGAGG
>Cu_86
CCGCTGTCAGCCATACCGCGTGGTGAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTTGGGAAAAAAACAGCCGGTTAATAC
CCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCG
TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTGTTTAAGTCTGTCGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAA
TGGCGATGGAAACTGGGCGACTAGAGGTGGCAGAGGGTAGTGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGG
AGGAAC
>Cu_5_65
GCCACTCCTAATACGGTGGGTAGACGTTACCAAGAGAAAAGCCCTGCTAACTTCGTGTTAGCGCCGGGTAATACGAAGGG
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGAGGGAAGGGGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
CTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTA
>Cu_87
GCAGCTCGACACGCCGCGTGAGTGATGAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAAACAGTGCTAGTTGAATA
AGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGATGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATG
GAGGAA
>Cu_88
CAGCTGTCAGCATGCCGCGTGTGTGAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAAAATCTTGGCTCTAATAC
AGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAAT
>Cu_89
ACAGTGTGCCGCGTGTGTGAGATGTCTTCGGAGCGGAATGACTGTAGTGGGGAGGAAGGGTATAAGTAATACCTTGCGGT
GTTGACATTACCAACAGAATAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATCC
AAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC

CAGTGG
>Cu_90
ACAGCCTGCCGCGTGTGTGAGATGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAGTGGGGAGGAAGGGCATAAGTAATACCTTGCGGT
TTTGACATTACCAACAGAATAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCC
AAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGG
>Cu_91
GATGCACATGCCGCGTGTATGAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGCGATAGGTTAATAACCTT
GTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGA
GTCTTTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA
ATACCG
>Cu_92
TGCAGCATGCCGCGTGTATGAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGTTAGGTTAATAACCTTAGCCATTGACGTTACCCGCAGAA
GAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA
TACCGG
>Cu_93
ATCAGTATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGTGGGGAGGAAGGCAGAAGTTAATACCTTG
CTGTTTTGACATTACCAACAGAATAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTCCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGAAGGA
ACACCA
>Cu_94
GGCGCTATCAGCATACCGCGTGGGTGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCCCTTTTGTTGGGAAGAAACCAGCTGGCTAATA
CCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
GTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAG
GAGGAA
>Cu_95
GGCAGCGATCAGCATGCCGCGTGTGTGAGAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGGGAGCTACTTTAGTTAAT
ACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGG
GAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC

TGGAGG
>Cu_96
GGCGCTATCAGCATGCCGCGTGTGTGAAGAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGGGAGCTACTTTAGTTAAT
ACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGG
GAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC
TGGAGG
>Cu_31_33_34_40
GCTGATAGCCTGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGCGGCCTCCTTAATACCTT
GCTGTTTTGACGTTACCAAAGAAAGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCTTCTAGACTCGAGAGGGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG
AACACC
>Cu_97
CAGTGAGCCGCGTGTGTGACGATGTCTTCGGATTGGAATGACTGTATGTGGGTAGGAAGGGTGTAATTAATACCTTGTGG
TGTTTCCATTACCAACAGAATAAGACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATC
CAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA
CCAGTG
>Cu_98
CAGTGAGCCGCGTGGTGACGATGTCTTCGGAGTGTAATCACTGTATGTGGGGAGGAAGGGTATAAGTAATACCTTGCGGT
GTCGCCATTACCAACAGAATAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTAC
GGTAGGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGG
>Cu_99
CAGTGAGCCGCGTGGTGACGTTCTTTTCCGAGCGGCATGACTGTAGTGGGTAGGGCGGGTTGAAGTATTACCTTGTGGTGCCTCCATTACCGACAGAATAAG
CACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATAGGAAGGAACACC
AGTGGC
>Cu_100
TCAGCAGCCGCGTGTGTGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATGCTCTGTTAATACCTGGAGTCGATGACGGTACCGGAAGAAT
AAGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTGCAT
TGGTGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT

ACCGAT
>Cu_101
TCAGCAGTGCCGCGTGTGTGAGAGGCCTTCCGGGTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATGCTTGGCTCTAATACAGGCGGGGGATGACGGTACCGGAAG
AATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCATCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTGAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTA
AGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTATGACTGCAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
CGGTAGAA
>Cu_102
CAGCATCCGCGTGTGTGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATGGTCTGCTAATACCCGGGGT
CGATGACGGTACCGGAAGAATAAGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGATAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGCT
TGTGACTGTCAGGCTAGAGTGCGTCAAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
CCGATG
>Cu_62
CTGATCGCCATGCCGCGTGTGTGAGAAGGTTTGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAGGCCTAGTTAATACCTGCT
GTTTTGACGTTACCAAAGAAAACGACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCCCAAACGAAGAGAAAAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
CACCAG

Anexo G – Registro de coleta de material biológico

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 56463-1	Data da Emissão: 24/10/2016 20:52

Dados do titular

Nome: Ingrid Regina Avanzi	CPF: 361.033.528-94

SISBIO

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	REINO	Bacteria

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 33576834

Página 1/1