

KARINA REGUEIRA HORNINK

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL
PARA REALIZAR BIORREMEDIAÇÃO DE COBRE**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan/ IPT, para
a obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientadora:

Profa. Dra. Elisabete José
Vicente

Versão Original

São Paulo
2015

RESUMO

HORNINK, K. R. **Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar a biorremediação de cobre**. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os chamados metais pesados, atualmente mais adequadamente chamados metais tóxicos, são considerados responsáveis por grande parte da poluição ambiental, principalmente em áreas de mineração. Para reduzir os impactos causados pela contaminação por estes metais, a aplicação de microrganismos capazes de adsorver-los, um processo conhecido por biorremediação, tem sido cada vez mais empregado. Desta forma, este trabalho teve por objetivo isolar e identificar bactérias com potencial para biorremediação de ambientes contaminados por íons cobre a partir de amostras de solo e água coletadas na Mina Sossego localizada em Canaã dos Carajás, PA, pertencente à mineradora VALE. As amostras foram coletadas e mantidas tanto sob refrigeração como à temperatura ambiente. Para tornar possível este isolamento, foi desenvolvida uma metodologia que passou por diversas alterações de forma que fossem obtidos isolados que apresentassem resistência a alta concentração de íons cobre. As colônias isoladas foram submetidas a análises sequencial de morfologia (microscópica e macroscópica) e a um teste simples de resistência a CuCl_2 . Pela facilidade de execução, a metodologia MALDI-TOF foi a primeira a ser aplicada para a identificação dos isolados e a partir dos resultados foram selecionados 12 isolados para terem seus estudos aprofundados. Foi realizado o sequenciamento de fragmentos de tamanho superior a 1100 pb do gene codificador de 16S rRNA e do gene *rpoD* (apenas para o isolado pertencente ao gênero *Pseudomonas*). Os resultados foram alinhados e comparados com dados do banco de dados "GenBank", utilizando-se a ferramenta "BLAST". A partir dessas mesmas sequências, árvores fenéticas foram construídas. Testes bioquímicos foram realizados para a obtenção de maiores informações sobre as bactérias estudadas e conseqüentemente, auxiliar na identificação. Este conjunto de dados visava a identificação mais precisa das espécies bacterianas selecionadas. Comparando-se todos os resultados obtidos pelo emprego das diversas metodologias aplicadas aos 12 isolados selecionados, foi possível observar que 58% destes pertencem ao gênero *Cupriavidus*. Os gêneros aos quais pertencem as demais bactérias são: *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Novosphingobium*, *Stenotrophomonas* e *Herbaspirillum*. Os 12 isolados bacterianos tiveram sua resistência aos íons de cobre analisada pelo teste de Mínima Concentração Inibitória (MIC) em meio TSM líquido, e apresentaram resistências que variaram de 2,5 mM até 14,5 mM de cloreto de cobre. Ainda, foram determinadas as capacidades de adsorção de íons cobre por grama de biomassa bacteriana, permitindo a seleção dos isolados bacterianos com maior potencial para aplicação em biorremediação ambiental. As capacidades de biossorção de Cu^{2+} , comparadas ao controle *Cupriavidus metallidurans* CH34, se apresentaram superiores, chegando a ser 3,64 vezes maior no caso do isolado 98.b, identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*. Desta forma, propomos que este isolado apresenta uma capacidade de biossorção de Cu^{2+} inédita e que, por isto, tem um grande potencial para emprego em biorremediação ambiental de íons cobre.

Palavras-chave: Biorremediação de metais. Cobre. Maldi-TOF. Biodiversidade bacteriana. Adsorção de metais. *Cupriavidus*. *Pseudomonas*.

ABSTRACT

HORNINK, K. R. **Isolation and identification of bacteria with potencial to biorremediate copper**. 2015. 101 p. Master's Thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The so-called heavy metals, now more properly called toxic metals, are considered responsible for most of the environmental pollution, especially in mining areas. To reduce the impacts caused by contamination from these metals, the application of microorganisms capable of adsorbing them, a process known as bioremediation, has been increasingly employed. Thus, this study aimed to isolate and identify bacteria with potential for bioremediation of environments contaminated by copper ions from soil and water samples collected from the Sossego mine located in Canaã dos Carajás, PA, owned by the mining company VALE. Samples were collected and maintained either under refrigeration as at room temperature. In order to make the bacteria isolation possible, a methodology, that has undergone through several changes, so that it was possible to obtain several bacteria that are resistant to a high concentration of copper ions. The isolated colonies were subjected to morphology analysis (microscopic and macroscopic) and a simple test of CuCl_2 resistance. For ease of implementation, the MALDI-TOF method was the first to be applied for the identification of the isolates, the results of this test allowed the selection of 12 isolates for more extensive studies. The sequencing of a fragment containing 1100 pb of the 16S rRNA region and the sequencing of the gene encoding the *rpoD* gene (for the *Pseudomonas* genera isolated) was performed. The results were compared and aligned with GenBank database using the tool "BLAST". From these same sequences, fenetic trees were assembled. Biochemical tests were conducted in order to obtain more information on the bacteria studied and consequently assist in identification. This data set was designed to a more accurate identification of selected bacterial species. Comparing all results obtained by the use of different methodologies applied to the 12 selected isolates, it was observed that 58% of these belong to the *Cupriavidus* genre. The genres they belong to other bacteria are: *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Novosphingobium*, *Stenotrophomonas* and *Herbaspirillum*. The 12 bacterial isolates had their resistance to copper ions analyzed by the Minimum Inhibitory Concentration test (MIC), and showed resistance ranging from 2.5 mM to 14.5 mM copper chloride. Still, tests of the determination of ion adsorption capacities of copper per gram of dry bacterial biomass was performed, allowing the selection of bacterial isolates with the greatest potential for application in environmental bioremediation. The copper biosorption capacity presented by the isolate 98.b, belonging to the genus *Pseudomonas*, was 3,64 times higher, when compared to the control, *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thus, we propose that this isolate has a novel biosorption of Cu^{2+} and, thus, it has a great potential for use in bioremediation of environmental copper ions.

Keywords: Metals bioremediation. Copper. Maldi-TOF. Bacterial biodiversity. Metal adsorption. *Cupriavidus*. *Pseudomonas*.

1 INTRODUÇÃO

O cobre é o segundo metal não ferroso mais utilizado mundialmente, ficando atrás apenas do alumínio. Isto é decorrente do fato deste metal ser excelente condutor de eletricidade e de calor (CHUNG, 2001). Assim, apresenta extenso uso nas indústrias de fios e cabos elétricos, as quais empregam mais de 50% do total produzido deste metal, sendo o restante utilizado em ligas especiais, tubos, laminados e extrudados. Devido à sua crescente demanda e ao possível esgotamento de suas minas, são crescentes os investimentos que visam o aprimoramento e o desenvolvimento de tecnologias para o melhor aproveitamento deste metal, bem como para a sua recuperação a partir de resíduos provenientes do seu processamento.

Estima-se que apenas na lagoa de rejeitos da Mina do Sossego, localizada em Canaã dos Carajás, Pará, pertencente a mineradora VALE, haja 90 milhões de toneladas de detrito que contém em média cerca de 0,07% de cobre. Se fosse possível sua recuperação, ao seu valor atual, estima-se que a empresa teria uma receita bruta de US\$ 1,4 bilhão, valor superior ao da implementação desta mina (SOARES, 2012)

O presente trabalho visou o isolamento e identificação de bactérias com potencial para emprego em biorremediação e/ou biorrecuperação de metais de águas contendo metais pesados. Foi desenvolvido como parte integrante de um projeto maior, que tem por objetivo desenvolver tecnologias para o emprego de microrganismos capazes de recuperar cobre de resíduos produzidos pelo processo de mineração da VALE. A execução do projeto foi realizada no Laboratório de Genética e Microrganismos localizado no Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) em colaboração com o Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica (POLI/USP). O projeto maior está sendo financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento (BNDES) e pela mineradora VALE; coordenado pelo Prof. Claudio Augusto Oller do Nascimento (POLI/USP).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Metais Pesados e o Ambiente*

Os chamados metais pesados, recentemente mais adequadamente chamados apenas de metais tóxicos compõem um grupo de elementos de grande importância biológica e industrial, apesar de serem classificados muitas vezes como perigosos, pois em grandes quantidades podem causar riscos à saúde de vegetais e animais sendo assim considerados elementos potencialmente tóxicos. No entanto, alguns metais, como cobalto, cromo, cobre, manganês e zinco são essenciais em quantidades bem pequenas para diversos organismos, desde microrganismos até o homem, que os empregam em seus metabolismos como aceptores finais de elétrons em processos de obtenção de energia (ALLOWAY, 1995).

Esses elementos são normalmente inseridos no meio ambiente devido às diversas atividades antropogênicas, como a disposição inadequada de resíduos provenientes de indústrias e o descarte de equipamentos eletrônicos, e em certas regiões são provenientes principalmente de resíduos de mineração. Dentre os metais mais frequentemente encontrados como contaminantes estão o cobre, o cádmio e o níquel (ÇELO et al., 1999; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010; ZHANG et al., 2005).

No Brasil, com a finalidade de regulamentar e taxar as quantidades de contaminantes presentes nos leitos d'água e efluentes, existe a Resolução CONAMA nº 357 de 25 de março de 2005, a qual determina que para se eliminar efluentes contendo cobre, a concentração deste metal deverá ser de no máximo 1mg/L (aproximadamente 0,016 mM). Assim, grandes indústrias têm buscado com uma maior frequência mecanismos adequados para o tratamento de seus efluentes, não apenas para obedecer à legislação, mas também para agregar o valor de ser uma empresa verde e sustentável, que vem sendo amplamente valorizado pela sociedade (GLOBAL BUSINESS REPORTS, 2011).

2.2 Tratamentos utilizados e Biorremediação

Os metais tóxicos, após serem depositados na natureza, permanecem por muito tempo no ambiente, podendo ser acumulados a elevadas concentrações chegando a níveis nocivos à vegetais e animais (GÓMEZ-SAGASTI et al., 2012). Assim, são crescentes as técnicas desenvolvidas que buscam sanar ou amenizar os impactos causados pelo descarte inadequado de metais.

Existem diversos tipos de tratamentos que podem ser aplicados com a finalidade de recuperar solos e efluentes contaminados com metais. No entanto, para selecionar o tratamento mais adequado, é necessário observar as condições iniciais e as características de cada ambiente. A escolha correta está relacionada não apenas à efetividade do processo, mas também aos custos de implementação e manutenção (WUANA;OKIEIMEN, 2011).

As técnicas de remediação podem ser separadas em duas principais categorias: *in situ*, são aquelas realizadas no local da contaminação; e, *ex situ*, caracterizadas pela retirada do material contaminado para ser armazenado ou tratado em um local diferente de sua origem (WOOD, 2007).

Como formas de tratamento *ex situ* tradicionais pode-se citar a incineração do material contaminado e a remoção para um aterro, no qual deverão estar presentes alguns requisitos de isolamento, como medidas de contenção de sólidos gases e líquidos, além de serem necessárias ações de atenuação dos compostos tóxicos por meios físicos químicos ou biológicos (MULLIGAN; YOUNG; GIBBS, 2001).

Uma ampla gama de técnicas pode ser empregada no tratamento *in situ* (GUPTA et al., 1999):

- Técnicas de contenção, que consistem na aplicação de sistemas de barreiras e coberturas que impedem que o contaminante se espalhe;
- Processos físicos, a fim de separar os agentes tóxicos baseando-se em suas características físicas (densidade, carga elétrica ou tamanho de suas partículas, etc);
- Processos químicos, como óxido-redução, hidrólise e ajuste de pH podem ser empregados;

- Processos biológicos, que empregam diversos materiais biológicos (principalmente derivados de plantas ou microrganismos), podendo ser células vivas ou mortas ou substâncias derivadas de células.

2.2.1 Processos Biológicos

Dentre todos os processos de remediação ambiental, os processos biológicos (biorremediação) vêm recebendo cada vez mais maior atenção, por serem de alta aplicabilidade e demandam baixos custos; além de apresentarem bons resultados, principalmente quando empregados em combinação com outras técnicas. Os processos de biorremediação podem ser divididos em quatro categorias:

- 1) aplicação *in situ* (abaixo um pouco mais detalhado);
- 2) processos dinâmicos *ex-situ* (biorreatores);
- 3) processos estáticos *ex-situ* (remoção do solo para o tratamento em outra localidade); e
- 4) bioacumulação, que consiste no acúmulo de metais, ou outras substâncias danosas ao meio ambiente, por plantas e/ou microrganismos (WOOD, 2007).

Há três principais formas para a aplicação de biorremediação *in situ*:

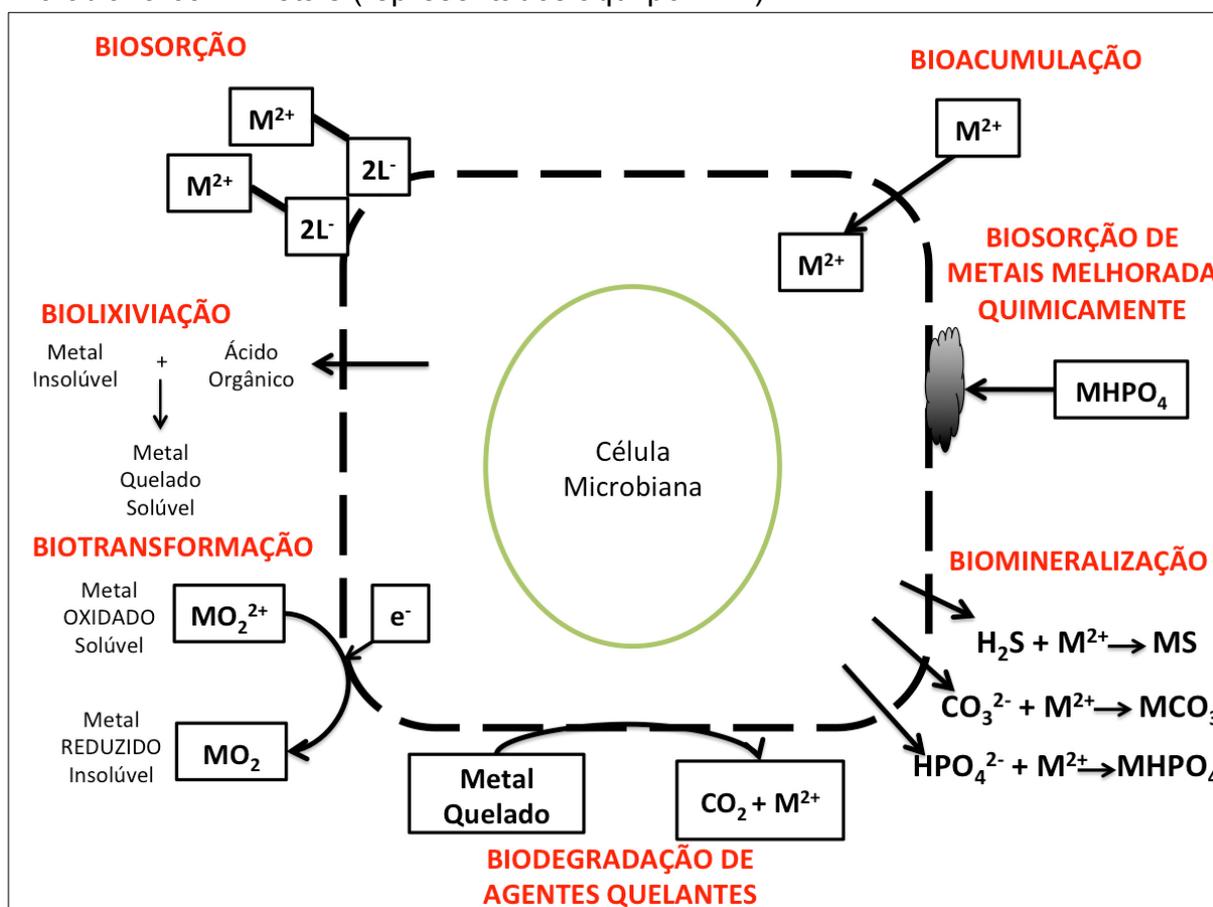
- 1) A bioaugmentação, que consiste na adição de organismos exógenos capazes de degradar ou modificar o poluente;
- 2) Bioestimulação, que é o estímulo à atividade microbiana já existente;
- 3) A utilização dessas duas técnicas em conjunto (RIZZO; RAIMUNDO, 2003).

A biorremediação vem alcançando maior importância no mundo atual, pois tem se mostrado ser uma técnica bastante eficaz com custos reduzidos (GAYLARDE et al., 2005; JACQUES et al., 2009; MACEDO et al., 2002). Além desses fatores favoráveis à aplicação da biorremediação, é importante ressaltar que sempre há a possibilidade de se selecionar os microrganismos do próprio ambiente contaminado (autóctones), favorecendo assim a manutenção da microbiota natural; ou no limite, até realizar adaptações genéticas em microrganismos isolados do local para que atuem nas condições desejadas (BOLTON; GORBY, 1995).

2.3 Bactérias utilizadas para a Biorremediação

Há diversos trabalhos que descrevem a existência de microrganismos com a capacidade de imobilizar metais pesados ou que produzem proteínas quelantes de metais, sendo ainda seletivos para certos tipos de metais (SUMERS; 1992, BIONDO, 2008). Há também microrganismos que produzem compostos que influenciam diretamente a solubilidade de metais, ou que realizam reações de oxido-redução de metais, os diferentes tipos de interação de uma célula microbiana podem ser observados na Figura 1. (LLOYD; ANDERSON; MACASKIE, 2005).

Figura 1 - Esquemática dos diferentes tipos de interação de uma célula microbiana com metais (representados aqui por M^{2+}).



Dentre esses microrganismos, um gênero de grande importância e que apresenta diversos estudos sobre sua utilização na biorremediação de metais pesados é aquele que compreende as bactérias do gênero *Cupriavidus sp.*

O gênero *Cupriavidus sp.* compreende bactérias anteriormente denominadas como *Wautersia sp.*, esta nomenclatura foi dada a uma parte do gênero *Ralstonia sp.*, o qual apresentava características bastantes diferentes das chamadas *Ralstonia sensu strictu* (VANDAMME; COENYE, 2004). De uma forma geral, as bactérias pertencentes a esse gênero apresentam diversos mecanismos de resistência a metais pesados, podendo sobreviver em ambientes com elevadas concentrações desses componentes nocivos (GROßE; FRIEDRICH; NIES, 2007, TAGHAVI et al., 2009).

A espécie *Cupriavidus metallidurans* é uma das bactérias mais resistentes à altas concentrações de metais pesados, chegando a resistir a concentrações de 6,0 mM de Cu^{2+} (MIJNENDONCKX et al., 2013). Esta bactéria apresenta alto nível de complexidade em seus sistemas de homeostase (Figura 2) e é provida de sistemas genéticos com organização diferenciada para resistir à altas concentrações de vários metais pesados, entre estes aos íons de cobre.

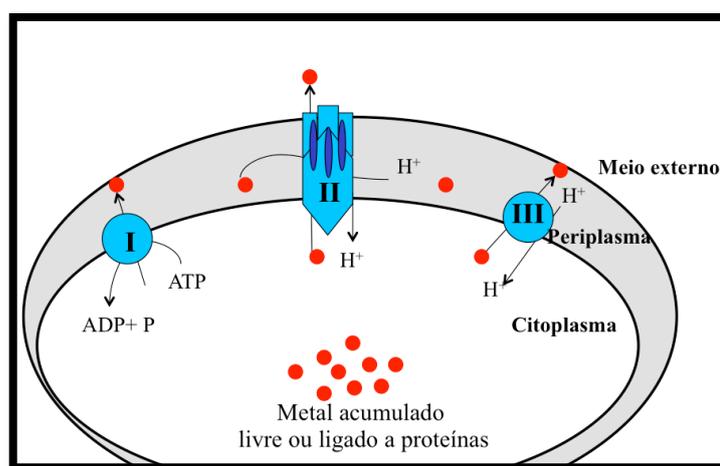
Como pode ser observado na Figura 2, os mecanismos de resistência desta bactéria, também são compostos por facilitadores de difusão, os quais permitem apenas uma maior resistência às concentrações de metais existentes no meio, desta forma, ao buscar bactérias para a utilização em biorremediação, deve-se verificar a capacidade de retenção do metal pela célula e não apenas a resistência. A expressão desses genes depende da concentração e do tempo de exposição a cada um destes íons metálicos (SENDRA et al., 2006). Na Tabela 1, é possível observar a capacidade de remoção de cobre de algumas bactérias.

Tabela 1 - Capacidade de adsorção máxima de cobre para alguns microrganismos encontrados na literatura.

Microrganismo	$Q_{\text{máx}}$ (mg/g de célula) Capacidade Máxima de Adsorção Estimada	Bibliografia
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	19,0	CHEN et al., 2008
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	86,78	FAN; OKYAY, RODRIGUES, 2014
<i>Pseudomonas putida</i>	27,6	CHEN et al., 2005
<i>Ralstonia pickettii</i>	27 a 38	YANG et al., 2010
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18,81	TING; CHOONG, 2009

Embora não apresentem sistemas de resistência tão elaborados quanto os da *C. metallidurans*, outras espécies de bactérias do gênero *Cupriavidus* apresentam altos valores de resistência a metais pesados, quando comparadas às bactérias de outros gêneros, segundo Chen et al. (2008). *C. taiwanensis* apresenta resistência a 5,0 mM de cobre. Já outras espécies como *C. necator* e *C. oxalaticus* também apresentam elevada resistência a metais tóxicos, embora sejam menos estudadas e não há dados sobre suas resistências quando cultivadas em meio mínimo acrescido de íons Cu^{2+} .

Figura 2 – Sistemas de reação da *Cupriavidus metallidurans* à presença de metais tóxicos presentes no ambiente.



Esquema simplificado dos sistemas de resistência a metais tóxicos da bactéria *C. metallidurans*. Há três principais sistemas de resistência na célula bacteriana: ATPases (I), Divisão de modulação de resistência da célula transmembrana (sistema-RND)(II) e Facilitadores de difusão de cátions (CDF)(III) (LEGATZKI et al., 2003).

Fortemente relacionadas às bactérias do gênero *Cupriavidus* as bactérias pertencentes ao gênero *Ralstonia sensu strictu* também apresentam resistência considerável a metais tóxicos. No entanto, isolados da espécie *Ralstonia pickettii* apresentam resistência aos íons Cu^{2+} reduzida (1,5 mM), em comparação às células do gênero *Cupriavidus* (MIJNENDONCKX et al., 2013).

Além das bactérias do gênero *Cupriavidus*, outro gênero que vem apresentando estudos aprofundados para aplicação em biorremediação é *Pseudomonas*. As bactérias pertencentes à este gênero têm sido muito estudadas quanto à sua aplicação em biorremediação, seja para a biodegradação de pesticidas e compostos orgânicos aromáticos, como para a

remoção de metais pesados, em que principalmente as espécies *P. aeruginosa* e *P. putida* têm apresentado maior relevância (WASI; TABREZ; AHMAD, 2013).

Distribuída amplamente na natureza a espécie *P. putida* é encontrada com relativa facilidade em águas residuais e solos, sendo capaz de acumular íons de cobre a concentrações consideráveis. Uma cepa de *P. putida* isolada a partir de amostras do rio Yangtze, na China, apresentou resistência a 7,5 mM de Cu^{2+} (ZHANG et al., 2014), além da resistência a este metal, esta espécie ainda apresenta uma alta capacidade de adsorção dos íons Cu^{2+} , como é possível observar na Tabela 1. Algumas cepas desta bactéria apresentam ainda elevada eficiência para a remoção destes íons, como foi constatado por Pardo et al. (2003), em um estudo que demonstra a capacidade desta bactéria remover 80% dos íons de cobre em menos de 5 minutos em contato com este metal.

Apesar de existirem poucos trabalhos relacionados, outros grupos bacterianos também têm sido constantemente considerados para o emprego em biorremediação de metais, dentre eles podem ser citados os gêneros, *Stenotrophomonas*, *Herbaspirillum* e *Novosphingobium*.

Presente em grandes quantidades na rizosfera de diversos vegetais, a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* apresenta a capacidade de interagir com diversos compostos xenobióticos, como hidrocarbonetos e metais, resultando em menor toxicidade para ao meio ambiente. Algumas cepas desta bactéria apresentaram crescimento em até 5,0 mM de cobre, sendo que em alguns experimentos mostraram capacidade de remover até 90% do cobre presente no meio de crescimento. (GHOSH; SAHA, 2013, PAGES et al., 2008).

As bactérias pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* têm sido mais recentemente estudadas para finalidades de biorremediação, havendo poucos trabalhos ainda que relatam sua utilização para esta finalidade. Segundo Govarthanan et al. (2014) um isolado pertencente a esse gênero apresentou aplicabilidade para a biolixiviação de metais e resistência a 5,5mM de Cu^{2+} .

Na tabela abaixo é possível comparar a resistência a cobre de um isolado de *Herbaspirillum* a dos outros microrganismos citados (Tabela 2).

Tabela 2 - Mínima concentração inibitória de algumas bactérias resistentes a metais tóxicos.

	MIC Cu ⁺²	Bibliografia
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	6,0mM	MIJNENDONCKX et al., 2013
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	5,0mM	CHEN et al., 2008
<i>Ralstonia pickettii</i>	1,5mM	MIJNENDONCKX et al., 2013
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5,0mM	GHOSH e SAHA, 2013
<i>Herbaspirillum</i> sp.	5,5mM	GOVARTHANAN et al., 2014
<i>Pseudomonas putida</i>	7,5mM	ZHANG et al., 2014

O gênero *Novosphingobium* foi proposto após a divisão do gênero *Sphingomonas*, devido às diferenças filogenéticas e quimiotaxonômicas. Atualmente compreende dezoito espécies sendo que uma grande variedade de isolados são de origem ambiental (MANZARI et al., 2014). Há alguns trabalhos referentes às espécies como *N. subarticum* e *N. pentaromativorans* que relatam a capacidade destas bactérias degradarem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Segundo o projeto de sequenciamento do genoma completo, realizado por Gan et al. (2014), a espécie *N. resinovorum* apresenta proteínas de resistência a metais pesados. No entanto, não há trabalhos relacionando esta espécie com a biorremediação de metais pesados.

2.4 Identificação de microrganismos

Existe uma ampla gama de microrganismos que tem 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 (CANHOS; MANFIO, 2000; FELÍX, 2008). No entanto, existe grande necessidade de se identificar esses microrganismos, não apenas para evitar a aplicação de patógenos em processos de ampla escala, mas também para conhecer melhor suas características e necessidades visando potencializar suas possíveis aplicações.

A identificação de isolados bacterianos pode ser realizada empregando-se diversos métodos. Além das técnicas de microbiologia clássica (análise da morfologia e das provas bioquímicas ou biotipagem), também podem ser empregadas novas metodologias modernas, como a utilização de métodos

moleculares, os quais vem permitindo uma mudança drástica do conhecimento da diversidade microbiana no ambiente (PACE, 1997). Também, 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 (“Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight” – MALDI-TOF).

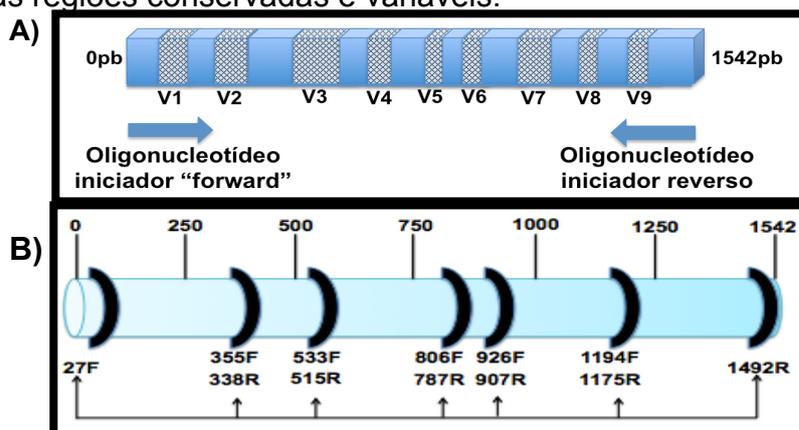
2.4.1 A região 16S

O gene 16S *rRNA* é uma das regiões mais conservadas no DNA de todas as células procariotas, apresenta aproximadamente 1500 pares de bases e tem sido utilizado como marcador molecular, permitindo a identificação destes microrganismos ou pelo menos um conhecimento filogenético destes, possibilitando averiguar sua procedência gênica e estabelecer relações entre eles (DESANTIS et al., 2006; GROßKOPF et al., 1998).

Grande parte dos procariotos apresenta três *rRNAs*, denominados 5S, 16S e 23S *rRNA*. Os genes que codificam estes *rRNAs* são tipicamente organizados como um *operon* co-transcrito. Cada um destes *rRNAs* apresenta tamanho diferente, sendo 120 pb para o 5S, 1500 pb para o 16S, e 2900 pb para o 23S (GUTELL; LARSEN; WOESE, 1994).

Apesar do gene codificador do 16S *rDNA* apresentar regiões hipervariáveis denominadas de V1 a V9 (Figura 3.a), cujas sequências se alteram com o decorrer da evolução e assim são responsáveis pela caracterização das espécies, 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) (Figura 3.b).

Figura 3 - Esquema do gene rDNA 16S, com aproximadamente 1500 pares de bases, com as regiões conservadas e variáveis.



3.A: em azul as regiões das sequências conservadas, em caixas achuradas as regiões das sequências variáveis. 3.B: os círculos pretos representam as regiões conservadas. Os números da parte superior indicam o tamanho da região em pares de bases. Na parte inferior estão indicados o número da base de início dos oligonucleotídeos iniciadores ("primers") para a amplificação de cada região.

O gene codificador do 16S *r*RNA tem sido amplamente utilizado, pois, além da facilidade em obter *amplicons*, devido às suas características, permite a identificação de bactérias de forma rápida e pouco onerosa. Isto ocorre, principalmente, devido ao tamanho da sequência completa e de suas regiões hipervariáveis (WOO et al., 2003).

Dadas as características do gene 16S *r*RNA e a verificação das inúmeras publicações em que este foi empregado, pode-se concluir que esta sequência é a ferramenta mais amplamente utilizada quando não se tem informação alguma sobre o isolado seja para realizar a identificação deste (JANSSEN, 2006; MIGNARD; FLANDROIS, 2006) ou para estudos filogenéticos (SINGLETON et al., 2001; WHITEHAD; COTTA, 1999). Todavia, apesar de todas as vantagens derivadas do emprego de 16S *r*RNA para a identificação de procaríotos, existem alguns problemas nesta utilização:

- Há a possibilidade de que apenas a utilização desta informação não seja suficiente para diferenciar algumas espécies de bactérias, como ocorre com *Bacillus cereus* e *Bacillus anthrax*, nas quais as diferenças estão presentes nos plasmídios pX01 e pX02 que contém os de virulência para a bactéria causas antraz (PILO e FREY 2011). Na verdade, a identificação de espécies do gênero *Bacillus*, que contem espécies patogênicas e outras de grande importância em aplicação biotecnológica como *B. thuringiensis*, não pode ser feita somente baseada as diferenças do gene 16S *r*RNA (CHEN; TSEN, 2002);

- O fato de que recentemente foi demonstrado que somente 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 (VETROVSKY; BALDRIAN, 2013).

- Ainda, há gêneros bacterianos muito diversos, como *Pseudomonas*, que reúnem grande número de espécies. Assim, devido à baixa taxa de evolução há diferentes espécies que apresentam 16S rDNA com grande similaridade, tornando a identificação baseada apenas nessa sequência muito difícil (MULET et al., 2009, 2010).

Assim, pelo menos pelas razões acima mencionadas, para se identificar uma nova bactéria isolada, atualmente é entendido que se faz necessário analisar as sequências de outros genes e analisar outras características, como suas proteínas e suas necessidades metabólicas (PETTI, 2007; KANG et al., 2010).

2.4.2 O gene *rpoD*

Embora o sequenciamento do 16S rRNA seja o mais amplamente utilizado para a identificação de microrganismos, principalmente devido à vasta base de dados existente para estas sequências, existem ainda outras regiões de DNA conservadas com regiões variáveis que podem ser encontradas em microrganismos, como gene que codifica o fator σ^{70} da RNA polimerase.

O gene *rpoD*, é universal, e apresenta baixos níveis de transferência horizontal, podendo assim sua sequência ser utilizada de forma confiável para a identificação de microrganismos (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1998).

Com tamanho de aproximadamente 800 pares de bases, o gene *rpoD*, pode ser dividido em quatro regiões, destas as regiões 2 e 4 são bem conservadas para todos os membros da família σ^{70} , pois envolvem sub-regiões envolvidas na ligação da RNA polimerase; já nas regiões 1 e 3 são encontrados maiores números de variações gênicas (PAGET; HELMANN, 2003).

2.4.3 Construção de Árvore Filogenéticas

Os organismos vivos, podem ser descritos, comparados e correlacionados de diversas maneiras, sendo possível classificá-los por seu nível de similaridade e parentesco, ou seja, por um relacionamento filogenético através do qual é possível ter conhecimento da evolução biológica, surgimento e extinção de espécies, dependendo da metodologia empregada (FOSTER, 2001).

Este trabalho teve por objetivo, a identificação de algumas bactérias isoladas potencialmente mais promissoras para emprego em biorremediação e/ou bioacumulo de cobre, não sendo importante, neste momento, a história evolucionária destes isolados. Assim, 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).

Entre os métodos fenéticos mais utilizados principalmente devido à sua eficiência computacional está o “neighbor-joining”. Este método consiste na minimização da soma dos comprimentos dos ramos a cada etapa do processo de clusterização (SAITOU; NEI, 1987). 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 (KUMAR; FILIPSKI, 2008).

Técnicas estatísticas são empregadas em conjunto com as análises filogenéticas de forma a verificar a confiabilidade das análises realizadas, o procedimento de “bootstrap” é um dos mais utilizados. Ele consiste na construção de novas árvores a partir do conjunto de dados original, e calcula o número de vezes em que um determinado ramo aparece em uma mesma posição (YANG; RANNALA, 2012).

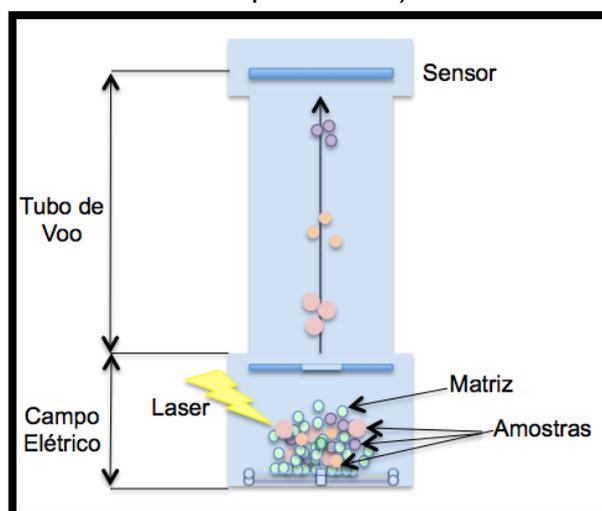
2.4.4 Espectrometria de Massa (MS) com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Análise de Tempo de Voo (MALDI-TOF)

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 amplamente empregada para a identificação de microrganismos. 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).

A principal característica desta técnica está na capacidade de gerar um espectro baseado na massa e na carga dos componentes proteicos de uma 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 técnica consiste basicamente na aceleração de partículas dessorvidas e ionizadas 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. Um “software” analisa este perfil e o compara com os existentes em uma base de dados permitindo, assim, a identificação da amostra (WIESSER et al., 2012; TUMA, 2003) (Figura 04). Assim, a limitação da técnica está apenas na dependência de uma base de dados de memória dos padrões do equipamento.

Figura 4 - Esquema da metodologia de identificação de bactérias pela técnica MALDI-TOF (Espectrometria de Massa com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Análise de Tempo de Voo).



No momento em que o laser atinge a superfície da amostra embebida em uma matriz, ocorre a dessorção térmica, levando à formação de íons, os quais são acelerados em um campo elétrico de acordo com sua massa e carga. No Tubo de voo ocorre a separação dos compostos, devido às suas diferentes características, estes compostos são detectados pelo sensor que marca seu tempo de voo. Um espectro é formado e a partir da comparação deste com um banco de dados é possível identificar a amostra.

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 da ordem de segundos. 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 proveniência clínica, sendo esta uma limitação técnica para a identificação de isolados ambientais (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

2.4.5 Caracterização bioquímica

Com a utilização de “kits” industrializados para caracterização bioquímica, que permitem a comparação de seus resultados com um vasto banco de dados, é possível obter a identificação de microrganismos, embora imprecisa para isolados ambientais, quando aliada às demais técnicas de identificação, a utilização desses permite comprovar os demais resultados obtidos.

Apesar de alguns microrganismos ambientais não apresentarem seus resultados inseridos nos bancos de dados, é possível encontrar em diversas publicações (Quadro 1) resultados desses “kits” referentes a diversos isolados ambientais, tornando possível sua comparação com resultados obtidos.

Quadro 1 – Resultados do teste API 20NE BIOMERIEUX[®], segundo a literatura.

TESTES		Microrganismos							
		1	2	3	4	5	6	7	
API 20NE	Redução de nitratos	+	+	+	+	-	-	-	
	Produção de indol	-	-	-	-	-	-	-	
	Fermentação de Glicose	-	-	-	-	-	-	-	
	Arginina Dihidrolase	-	-	-	-	-	-	-	
	Urease	+	-	-	-	+	+	-	
	β-glucosidase	-	-	+	-	-	-	+	
	Protease	-	-	-	-	-	-	-	
	β-galactosidase	-	-	-	-	-		-	
	Assimilação	Glicose	-	-	-	-	-	+	+
		Arabinose	-	-	-	-	-	+	+
		Manose	-	+	-	-	-	+	-
		Manitol	-	-	-	-	-	+	-
		N-acetil-glucosamida	+	-	-	-	-	+	+
		Maltose	-	-	-	-	-	-	+
		Gluconato	+	+	+	+	+	+	-
		Ácido caprico	+	+	+	-	+	+	-
		Ácido adipico	+	+	-	+	+	+	-
		Malato	+	+	+	+	+		+
	Citrato	+	+	+	-	+		+	
Ácido fenilacético	+	+	+	-	+		-		
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+		
Precipitação de Tween 80	+	-	+	-	-	-	+		
Hemólise em ágar sangue	-	-	-	-	-	-	-		
Coloração Gram	-	-	-	-	-	-	-		

Obs.:1 – *C. necator*, 2 – *C. oxalaticus*, 3 – *C. taiwanensis*, 4 – *C. metallidurans*, 5 – *C. pauculus* (SAHIN et al., 2000; DE BAERE et al., 2001; CHEN et al., 2001; IWAKI et al., 2008; CUADRADO et al., 2010; MARTÍNEZ-AGUILAR; CABALLERO-MELLADO; SANTOS, 2013). 6 – *H. huttiense* (DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010). 7 – *N. resinovorum* (LIM; MOON; CHUN, 2007). Os quadrados em cinza representam dados que não foram encontrados na literatura.

Embora apenas a caracterização bioquímica não seja suficiente para identificar espécies bacterianas (CARBONELLE et al., 2011), esta caracterização é bastante útil para que sejam obtidas características fisiológicas dos microrganismos isolados, as quais permitem a otimização de seu cultivo *in vitro*, levando à obtenção de melhores resultados.

3 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

- A partir de amostras de solo, sedimento e águas da Mina do Sossego da VALE, em Carajás, PA, foi possível o isolamento de bactérias de diferentes espécies que apresentam elevada resistência a Cu^{2+} . Foram selecionadas 12 bactérias pertencentes a 6 gêneros diferentes, e a pelo menos, 8 espécies diferentes;
- Dentre as bactérias selecionadas as mais prevalentes (ou frequentes) são do gênero *Cupriavidus* (40- 50% dos isolados);
- Dentre as bactérias selecionadas como mais promissoras para os estudos de biorremediação foram 12 ao todo, 58,33% do gênero *Cupriavidus*;
- Ao relacionar os dados obtidos pelas diversas técnicas de identificação aplicadas, principalmente com a construção das árvores fenéticas foi possível obter a identidade de todos os isolados, não apenas a nível de gênero, mas também uma aproximação bastante precisa de suas espécies;
- Cinco isolados apresentaram produção de biomassa superior à do controle positivo, a bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34, que produziu 3,89 g biomassa seca/L de meio de cultura, quando cultivados com sob as mesmas condições de temperatura, pH e composição do meio:
 1. 69.b (*C. oxalaticus*) 5,38 g biomassa seca/L
 2. 74.a (*C. metallidurans*) 4,72 g biomassa seca/L
 3. 90.a (*C. taiwanensis*) 4,31 g biomassa seca/L
 4. 98.a (*C. metallidurans*) 4,50 g biomassa seca/L
 5. 120.e (*N. resinovorum*) 4,65 g biomassa seca/L

- Vários dos isolados bacterianos apresentaram maior resistência aos íons Cu^{2+} superior à da bactéria controle *Cupriavidus metallidurans* CH34, bactéria padrão de estudos em biorremediação de metais pesados (MIC 6,0 mM Cu^{2+}) são estes:
 1. 69.a (*C. taiwanensis*) – 8,5 mM CuCl_2
 2. 74.a (*C. metallidurans*) – 15,0 mM CuCl_2
 3. 80.a (*C. metallidurans*) – 15,0 mM CuCl_2
 4. 90.a (*C. taiwanensis*) – 9,5 mM CuCl_2
 5. 98.a (*C. metallidurans*) – 15,0 mM CuCl_2
 6. 104.b (*C. metallidurans*) – 15,0 mM CuCl_2
 7. 120.e (*N. resinovorum*) – 10,0 mM CuCl_2
 8. 122.b (*S. maltophilia*) – 12,0 mM CuCl_2
 9. 125.e (*H. huttiense*) -12,5 mM CuCl_2
- Apenas 4/12 dos isolados selecionados apresentaram MIC inferiores a 9,0 mM de CuCl_2 ;
- Os elevados níveis de resistência aos íons Cu^{2+} dos isolados são indicativos do potencial de emprego para biorremediação de águas, solo e sedimentos contaminados com Cu^{2+} . Todavia, temos claro que não obrigatoriamente a elevada resistência a Cu^{2+} significa uma ligação direta com elevada capacidade de adsorção destes íons;
- Em 24h, 5 dos 12 isolados, apresentaram valores de adsorção de íons de cobre superior aos do controle positivo, a bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34, que, em 24h, apresentou capacidade de adsorção de 18,9 mg Cu^{2+} /mg biomassa seca:
 1. 69.a (*C. taiwanensis*) – 19,2 mg Cu^{2+} /g biomassa seca
 2. 69.b (*C. oxalaticus*) – 25,08 mg Cu^{2+} /g biomassa seca
 3. 80.a (*C. metallidurans*) – 20,72 mg Cu^{2+} /g biomassa seca
 4. 98.b (*P. putida*) – 68,85 mg Cu^{2+} /g biomassa seca
 5. 122.b (*S. maltophilia*) – 29,64 mg Cu^{2+} /g biomassa seca

- O isolado **98.b**, identificado como *Pseudomonas putida*, apresentou adsorção de 68,85 mg de Cu^{2+} / g de biomassa seca em 24 h de exposição, valor este 3,64 vezes superior ao do controle utilizado. Este valor é 2,5 vezes superior ao $Q_{\text{Máx}}$ da *Pseudomonas putida* encontrado na literatura (27,6 mg de Cu^{2+} / g de biomassa seca), mesmo tendo sido obtido com o meio padrão do trabalho, ou seja, sem possíveis otimizações de cultivo.
- Os diferentes isolados identificados como *Cupriavidus metallidurans* apresentaram diferentes capacidades de adsorção de íons cobre, em relação a capacidade da linhagem controle CH 34:
 - Um dos isolados (**80.a.**), apresentou capacidade superior
 - Três isolados apresentaram capacidade inferior: **74.a**, **98.a** e **104.b**A causa de tais diferenças pode ser devido às diferenças entre as cepas, como foi possível observar na árvore fenética destes microrganismos, a qual mostra que existe uma pequena distância gênica entre eles.

REFERÊNCIAS*

- ALVES, J. M. P. **Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba***. 2001. 210 f. Tese (Doutorado) – ICB, São Paulo, 2001.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. V. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in Soils**, 2. Ed. Londres: Blackie Academic and Professional, 1995.
- ARPIN, C. et al., Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2163 – 2169, 1996.
- ASSIS, D. G.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.9, p. 344-355, 2011.
- BIONDO, R. **Engenharia Genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a Biorremediação de Efluentes Contendo Metais Pesados**. 2008. 170 f. Tese (Doutorado) - Ep/fmvz/ipt/ib/icb/butantan, São Paulo, 2008.
- BOLTON, H.; GORBY, Y. A. An overview of bioremediation of inorganic contaminants. In: HINCHEE, R. E.; MEANS, J. L.; BURRIS, D. R. (eds.) *Bioremediation* v. 3. San Diego, CA: Battelle Press, 1995.
- CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. 2001. Disponível em: <http://www.redetec.org.br/publique/media/mct_recursos_biologicos.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013.
- CARBONNELLE, E. et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v.44, p. 104-109, 2011.
- CARBONNELLE, E. et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. **Journal of Microbiological Methods**, v.89, p. 133-136, 2012.
- ÇELO, V. et al. An Assessment Of Heavy Metal Pollution in the Sediments Along The Albanian Coast. **Water, Air, And Soil Pollution**, Nanjing, n. 31, p.235-250, 19 mar. 1998.
- CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 330-339, 2007.
- CHEN, M. L.; TSEN, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 912-919, 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CHEN, W. M., LAEVEENS, S., LEE, T. M., COENYE, T., DE VOS, P., MERGEAY, M., VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.
- CHEN, W. M.; WU, C. H.; JAMES, E. K.; CHANG, J. S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 364-371, 2008.
- CHIMETTO, L. A. et al. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Systematic and Applied Microbiology** 31: 312-319, 2008.
- CHUNG, D. D. L. Materials for thermal conduction, **Applied Thermal Engineering**, V. 21, ed. 16, p. 1593-1605, 2001.
- CUADRADO, V., GOMILA, M., MERINI, L., GIULIETTI, A. M., MOORE, E. R. B. *Cupriavidus pampae* sp. Nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2606-2612, 2010.
- DE BAERE, T., STEYAERT, S., WAUTERS, G., DE VOS, P., GORIS, J., COENYE, T., SUYAMA, T., VERSCHRAEGEN, G., VANEECHOUTTE, M. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar *3l'thomasii* strains (Pickett, 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 547-558, 2001.
- DESANTIS, T. Z. et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 394-399, 2006.
- DOBRITSA, A. P., REDDY, M. C. S., SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1418-1426, 2010.
- FÉLIX, D. J. de S. **Potencial Biotecnológico dos Microrganismos Extremófilos**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Molecular, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.
- FOSTER, J. A. Evolutionary computation. **Nature reviews – genetics**, v. 2, p. 428-436, 2001.
- GAN, H. M., GAN, H. Y., AHMAD, N. H., AZIZ, N. A., HUDSON, A. O., SAVKA, M. A. Whole genome sequencing and analysis reveal insights into the genetic structure, diversity and evolutionary relatedness of *luxI* and *luxR* homologs in bacteria belonging to the *Sphingomonadaceae* family. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 188, 2014.
- GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

- GHOSH, A.; SAHA, P. D. Optimization of copper bioremediation by *Stenotrophomonas maltophilia* PD2. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, p. 159-163, 2013.
- GLOBAL BUSINESS REPORTS (Org.). **A Mineração Brasileira**: A imensa base brasileira de recursos e grande influência econômica e política formam uma potência em mineração que pode dominar por gerações. Xx: Global Business Reports, 2011. Disponível em: <http://www.gbreports.com/admin/reports/BrazilMining_2011.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013.
- GÓMEZ-SAGASTI, M. T. et al. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, p. 3249-3262, 2012.
- GORIS, J. et al. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al., 1998 emend. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1773- 1782, 2001.
- GOVARTHANAN, M.; LEE, G. W.; PARK, J. H.; KIM, J. S.; LIM, S. S.; SEO, S. K.; CHO, M.; MYUNG, H.; KANNAN, S. K.; OH, B. T. Bioleaching characteristics, influencing factors of Cu solubilization and survival of *Herbaspirillum* sp. GW103 in Cu contaminated mine soil, **Chemosphere**, v. 109, p. 42-48, 2014.
- GROßE, C.; FRIEDRICH, S.; NIES, D. H., Contribution of extracytoplasmatic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 227-240, 2007.
- GROßKOPF, R. et al., Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 960, 1998.
- GUPTA, S. K. et al., (Ed.). In situ gentle remediation measures for heavy metal-polluted soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. S. (Ed.). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Crc Press, Cap. 17. 1999.
- GUTELL, R. R.; LARSEN, N.; WOESE, C. R. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. **Microbiological Reviews**, v. 58, p. 10-26, 1994.
- HOLBEN, W. E. et al.; GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 2263-2270, 2004.
- IWAKI, H., NAKAI, E., NAKAMURA, S., HASEGAWA, Y. Isolation and characterization of new cyclohexylacetic acid-degrading bacteria. **Current Microbiology**, v. 57, p. 107-110, 2008.
- JACQUES, R. J. S. et al. Processos biotecnológicos e oportunidades na biorremediação de ambientes contaminados. **Boletim Informativo da Sbcs**, Viçosa, n., p.17-19, 1 abr. 2009.

- JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p. 1719-1728, 2006.
- KANG, Y. J. et al. Multiple copies of 16S rRNA gene affect the restriction patterns and DGGE profile revealed by analysis of genome database. **Microbiology**, v. 79, p. 655-662, 2010.
- KAVAMURA, V. N.; ESPOSITO, E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. **Biotechnology Advances**, Mogi Das Cruzes, v. 1, n. 28, p.61-69, 01 mar. 2010.
- KHOT, P. D. et al. Optimization of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight Mass Spectrometry analysis for bacterial identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 3845-3852, 2012.
- LIM, Y. W., MOON, E. Y., CHUN, J. Reclassification of *Flavobacterium resinovorum* Delaporte and Daste 1956 as *Novosphingobium resinovorum* comb. nov., which *Novosphingobium subarticum* (Nohynek et al. 196) Takeuchi et al. 2001 as later heterotypic synonym. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1906-1908, 2007.
- MACEDO, R. C. et al. Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Crú Utilizando Fungos Filamentosos. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_X_jic_2002/Victor.pdf>. Acesso em: 24 maio 2012.
- MANZARI, C.; CHIARA, M.; COSTANZA, A.; LEONI, C.; VOLPICELLA, M.; PICARDI, E.; D'ÉRCHIA, A. M.; PLACIDO, A.; TROTTA, M.; HORNER, S. S.; PESOLE, G.; CECI, L. R. Draft genome sequence of *Sphingobium* sp. ba1, resistant to kanamycin and nickel ions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 361, p. 8-9, 2014.
- MERGEAY, M. et al. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p. 328-334, 1985.
- MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal Of Microbiological Methods**, V. 67, p. 574 – 581, 2006.
- MIJNENDONCKS, K.; PROVOOST, A.; OTT, M. C.; VENKATESWARAN, K.; MAHILLON, J.; LEYS, N.; VAN HOUDT, R. Characterization of the survival ability of *Cupriavidus metallidurans* and *Ralstonia pickettii* from space-related environments. **Microbiology Ecology**, v.65, p. 347-360, 2013.
- MONCHY, S. et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. **Microbiology**, v. 152, p. 1765-1776, 2006.
- MULET, M., LALUCAT, J. and GARCÍA-VALDÉS, E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 1513-1530, 2010.
- MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation Technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering Geology**, v. 60, p. 193-207, 2001.

- MURRAY, P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology Infectology**, v. 16, p. 1626-1630, 2010.
- NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 103-113, 1997.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**. v. 276, p. 734-740, 1997.
- PAL, A; PAUL, A. K. Nickel uptake and intracellular localization in *Cupriavidus pauculus* KPS 201, native to ultramafic ecosystem. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, p. 276-280, 2010.
- PAGES, D.; ROSE, J.; CONROD, S.; CUINE, S.; CARRIER, P.; HEULIN, W. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE**, v. 2, p. 1-6, 2008.
- PILO, P.; FREY, J. Bacillus anthracis: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1218-1224, 2011.
- PARDO, R.; HERGUEDAS, M.; BARRADO, E.; VEGA, M. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 26-32, 2003.
- PETTI, C. A. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p.1108-1114, 2007.
- RIZZO, A. C. L.; RAIMUNDO, R. S. Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2003, Poços de Caldas. **Livro de Resumos**. Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Química, 2003.
- ŞAHIN, N., IŞIK, K., TAMER, A. Ü., GOODFELLOW, M. Taxonomic position of "Pseudomonas oxalaticus" strain Ox1^T (DSM 1105^T) (Khambata and Bhat, 1953) and its description in the genus *Ralstonia* as *Ralstonia oxalatica* comb. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 206-209, 2000.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.
- SENDRA, V.; CANNELLA, D.; BERSCH, B.; FIESCHI, F.; MÉNAGE, S.; LASCOUX, D.; COVÊS, J., CopH from *Cupriavidus metallidurans* CH34. A novel periplasmatic copper-binding protein. **Biochemistry**, v. 45, p. 5557-5566, 2006.
- SINGLETON, D. R. et al. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

- SOARES, P. Bactéria que "come" cobre pode dar R\$ 2,8 bi para Vale. **Folha de São Paulo**. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/fsp/mercado/62629-bacteria-que-quotcomequot-cobre-pode-dar-r-28-bi-para-vale.shtml> Acesso em: 22. Nov. 2013.
- SUMMERS, A. O. The hard stuff: metals in bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 3, p. 271-276, 1992.
- TAGHAVI, S.; LESAULNIER, C.; MONCHY, S.; WATTIEZ, R.; MERGEAY, M.; LELIE, D. V. D., Lead (II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 171-182, 2009.
- TUMA, R. S. MALDI-TOF mass spectrometry: getting a feel for how it works. **ONCOLOGY TIMES**. v. 25, p. 26, 2003.
- VALLS, M.; ATRIAN, S.; LORENZO, V.; FERNANDÉZ, L. A. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. **Natural Biotechnology**, v. 18, p. 661-665, 2000a.
- VALLS, M.; LORENZO, V.; GONZÁLEZ-DUARTE, R.; ATRIAN, S. Engineering outer membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhance heavy-metal bioadsorption. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, p. 219-223, 2000b.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p 2285-2289, 2004.
- VANEECHOUTTE, M., KÄMPFER, P., DE BAERE, T., FALSEN, E., VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia* gen. nov, a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (ROBERTS, et al, 1990) comb. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 317-327, 2004.
- 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, p. 1-10, 2013.
- WASI, S.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Use of *Pseudomonas spp.* for the niorremediation of environmental pollutants: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.185, p. 8147-8155, 2013.
- WEISBURG, W. G. et al.; 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173: 697–703, 1991.
- WHITEHAD, T.R.; COTTA, M.A. Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 223-226, 1999.
- WIESSER, A. et al. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 93, p. 965-974, 2012.

- WOO, P. C. Y. et al. Usefulness of the microseq 500 16S ribosomal DNA-Based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1996-2001, 2003.
- WOOD, P. A. Remediation methods for contaminated sites. In: HESTER, R. E.; HARRISON, R. M. (Ed.). **Assessment and Reclamation of Contaminated Land**. Boca Raton: CRC Press, 2007. v. 16, p. 115-140.
- WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **ISRN Ecology**, v. 2011, 2011.
- ZHANG, G. et al. Historical change of heavy metals in urban soils of Nanjing, China during the past 20 centuries. **Environment International**, n. 31, p.913-919, 28 jun. 2005.
- ZHANG, Q; ACHAL, V.; XIANG, W. N.; WANG, D. Identification of heavy metal resistant bacteria isolated from Yangtze river, China. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 16, p. 619-623, 2014.