

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.**

São Paulo
2015

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

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Hornink, Karina Regueira.

Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre / Karina Regueira Hornink. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biorremediação de metais pesados.

Versão do título para o inglês: Isolation and identification of bacteria with potential for performing copper bioremediation.

1. Biorremediação de metais 2. Cobre 3. Biodiversidade bacteriana
4. Bioadsorção de metais 5. *Cupriavidus* 6. *Pseudomonas* I.
Vicente, Profa. Dra. Elisabete José II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0118/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Karina Regueira Hornink.

Título da Dissertação: Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre.

Orientador(a): Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

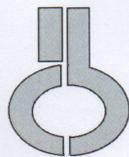
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 617/13 referente ao projeto intitulado: "Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre" sob a responsabilidade de **Karina Regueira Hornink**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 24 de setembro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

Aos meus pais por terem me apoiado durante o período da realização do mestrado, mesmo com todos os momentos difíceis;

Ao meu noivo, Thiago, por estar sempre comigo, me dando suporte e sempre me fazendo seguir em frente;

À professora Dr^a Elisabete José Vicente por ter aberto as portas de seu laboratório para que pudesse iniciar meu trabalho científico, sempre estimulando a produção independente;

Ao grupo de pesquisa do professor Claudio Augusto Oller do Nascimento pela colaboração neste trabalho;

Às pós graduandas do CEPEMA pelo auxílio na execução do MALDI-TOF;

À Tais Kuniyoshi, por estar sempre disposta a ajudar e a ensinar muito do que sei, por me incentivar a continuar, me ajudar a ver novas possibilidades e por ser sempre tão positiva;

Ao Bruno Oishi, por toda a paciência nas explicações e discussões que por muitas vezes foram responsáveis por este trabalho caminhar e por todas as longas conversas que deixavam o dia a dia mais gostoso;

À Cecília Carvalho, não somente pelas discussões teóricas, mas também pelo companheirismo e amizade no laboratório nos momentos mais complicados, por entender exatamente tudo o que passamos no último ano;

Aos amigos e colegas, Felipe, Ralph, Jessica, Bruno, Larissa, Igor, Carla, Diogo, Bianca, Kazui, Norma e Tadeu, que certamente fizeram parte da construção deste trabalho;

“O verdadeiro homem mede a sua
força, quando se defronta com o
obstáculo”

Antoine de Saint-Exupéry

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*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Capacidade de adsorção máxima de cobre para alguns microrganismos encontrados na literatura.....	23
Tabela 2 - Mínima concentração inibitória de algumas bactérias resistentes a metais tóxicos.	26
Tabela 3 - Iniciadores da reação de PCR e iniciadores para sequenciamento.	45
Tabela 4 – Isolados bacterianos selecionados para prosseguimento das análises de bioacumulo/biorremediação	54
Tabela 5 – Identificação dos isolados bacterianos selecionados.....	68
Tabela 6 –Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados bacterianos frente a íons Cu^{2+}	69
Tabela 7 - Massa seca de isolados bacterianos selecionados para ensaios de bioacumulo de Cu^{2+}	73
Tabela 8 – Capacidade de adsorção de íons Cu^{2+} por alguns isolados bacterianos (mg de Cu adsorvido/g biomassa seca).....	74
Tabela 9 – Capacidade de adsorção de íons Cu^{2+} por alguns isolados bacterianos (mg de Cu adsorvido/g biomassa seca) obtidos neste trabalho e os descritos na literatura.	75
Tabela 9 - Detalhamento dos dados da primeira coleta Maio/2012.....	88
Tabela 10 - Detalhamento dos dados da segunda coleta Novembro/2012.	88
Tabela 11 - Detalhamento dos dados da terceira coleta Março/2013.....	89
Tabela 12 - Detalhamento dos dados da quarta coleta Maio/2013.....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultados do teste API 20NE BIOMERIEUX [®] , segundo a literatura....	33
Quadro 2 - Morfologia macroscópica, morfologia microscópica e teste de resistência a CuCl ₂ de alguns isolados bacterianos obtidos.	51
Quadro 3 - Identificação dos 51 isolados bacterianos por MALDI-TOF.....	53
Quadro 4 - Identificação dos 12 isolados bacterianos 16S rDNA.	58
Quadro 5- Testes bioquímicos realizados com o kit API20NE, cultivo em meio com Tween 80, cultivo em ágar sangue e coloração Gram.....	65
Quadro 6 - Resultados de testes bioquímicos das bactérias isoladas de solo, sedimento e águas coletados próximo a mina Sossego em Carajás: kit comercial API20NE, precipitação com Tween 80, padrão de hemólise, e coloração Gram.	66
Quadro 7 - Imagens das características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados de 69.a até 90.a.....	95
Quadro 8 - Imagens das características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados de 98.a até 125.e.....	96
Quadro 9 - Imagens dos resultados KIT API 20NE para os isolados de 69.a até 90.a.	98
Quadro 10 - Imagens dos resultados KIT API 20NE para os isolados de 98.a até 125.e.	99
Quadro 11 – Imagens dos resultados do teste de mínima concentração inibitória dos isolados 69.a até 90.a.	100
Quadro 12 - Imagens dos resultados do teste de mínima concentração inibitória dos isolados 98.a até 125.e	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemática dos diferentes tipos de interação de uma célula microbiana com metais (representados aqui por M^{2+}).	22
Figura 2 – Sistemas de reação da <i>Cupriavidus metallidurans</i> à presença de metais tóxicos presentes no ambiente.....	24
Figura 3 - Esquema do gene rDNA 16S, com aproximadamente 1500 pares de bases, com as regiões conservadas e variáveis.....	28
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).	32
Figura 5 - Localização, segundo "Google Earth", de cada um dos pontos de coleta das amostras de solo, sedimento e água, nos quatro eventos de coleta.	38
Figura 6 - Esquema das etapas de isolamento, seleção e proliferação de bactérias resistentes a $CuCl_2$	41
Figura 7 - Espectros gerados pela análise MALDI-TOF das bactérias do gênero <i>Cupriavidus</i> (69.a, 69.b, 74.a, 80.a, 98.a, 104.b) e do gênero <i>Ralstonia</i> (76.a) selecionadas para para prosseguimento das análises de bioacumulo/biorremediação	55
Figura 8 - DNA total dos isolados bacterianos selecionados.	56
Figura 9 – DNA codificador de 16S rDNA dos isolados selecionados.	57
Figura 10 – <i>Amplicon</i> obtido por PCR do gene <i>rpoD</i> do isolado 98.b.....	59
Figura 11 - Árvore fenética com base nas sequências da região 16S rRNA e do gene <i>rpoD</i> do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero <i>Pseudomonas</i>	60
Figura 12 - Árvore fenética com base nas sequências da região 16S das bactérias isoladas previamente identificadas como pertencentes aos gêneros <i>Cupriavidus</i> e <i>Ralstonia</i>	61
Figura 13 - Árvore fenética com base em sequências da região 16S rDNA para o isolado 120.e pertencente ao gênero <i>Novosphingobium</i>	62
Figura 14 - Árvore fenética com base em sequências da região 16S rDNA do isolado 121.b previamente identificada como pertencente ao gênero <i>Stenotrophomonas</i>	63

Figura 15 - Árvore fenética com base em sequencias da região 16S rDNA para o isolado 125. Previamente identificado como pertencente ao gênero <i>Herbaspirillum</i>	64
Figura 16 - Curva de crescimento do isolado 69.a, identificado como <i>Cupriavidus taiwanensis</i>	71
Figura 17 - Curva de crescimento do isolado 76.a, identificado como <i>Ralstonia pickettii</i>	71
Figura 18 - Curva de crescimento do isolado 98.b, identificado como <i>Pseudomonas putida</i>	72
Figura 19 - Curva de crescimento do isolado 120.e, identificado como <i>Novosphingobium resinovorum</i>	72
Figura 20 - Curva de crescimento do isolado 125.e, identificado como <i>Herbaspirillum huttiense</i>	72
Figura 21 - Resultado e perfil protéico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 69.a	90
Figura 22 - Resultado e perfil protéico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 69.b	90
Figura 23 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 74.a	90
Figura 24 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 76.a	91
Figura 25 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 80.a	91
Figura 26 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 90.a	91
Figura 27 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 98.a	92
Figura 28 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 98.b	92
Figura 29 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 104.b	92
Figura 30 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 120.e	93
Figura 31 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 122.b	93

Figura 32 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 125.e	93
Figura 34 - Árvore fenética com base nas sequências do gene <i>rpoD</i> do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero <i>Pseudomonas</i>	94
Figura 35 – Imagens do crescimento das colônias em meio TSM acrescido de Tween 80.....	97
Figura 36 - Imagens do crescimento dos isolados em meio Ágar Sangue, após 48h para verificação de hemólise.....	97
Figura 37 - Imagem do crescimento dos isolados em meio Ágar Sangue, após 96h para confirmação da formação do halo do isolado 121.b.	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	<i>Metais Pesados e o Ambiente</i>	19
2.2	<i>Tratamentos utilizados e Biorremediação</i>	20
2.2.1	<u>Processos Biológicos</u>	21
2.3	<i>Bactérias utilizadas para a Biorremediação</i>	22
2.4	<i>Identificação de microrganismos</i>	26
2.4.1	<u>A região 16S</u>	27
2.4.2	<u>O gene <i>rpoD</i></u>	29
2.4.3	<u>Construção de Árvore Filogenéticas</u>	30
2.4.4	<u>Espectrometria de Massa (MS) com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Análise de Tempo de Voo (MALDI-TOF)</u>	31
2.4.5	<u>Caracterização bioquímica</u>	33
3	OBJETIVO	34
3.1	<i>Objetivos específicos</i>	34
4	HIPÓTESE	35
4.1	<i>Justificativa</i>	35
5	QUESTÕES	36
6	MATERIAL E MÉTODOS	37
6.1	<i>Amostras de solo e água contaminadas com cobre</i>	37
6.2	<i>Linhagens Bacterianas</i>	39
6.3	<i>Equipamentos</i>	39
6.3.1	<u>Incubadora com agitação horizontal</u>	39
6.3.2	<u>Termociclador</u>	39
6.3.3	<u>Espectrômetro de Massa - Bruker Daltonics MALDI Biotyper</u>	40
6.4	<i>Meios de cultura</i>	40
6.5	<i>Isolamento das bactérias resistentes a cobre</i>	41
6.5.1	<u>Etapa 1 (E1) - Etapa de obtenção de Microrganismos</u>	42
6.5.2	<u>Etapa 1 Suplementar (E1S) - Etapa de proliferação das bactérias obtidas</u>	42

6.5.3	<u>Etapa 2 (E2) - Etapa de Obtenção de isolados bacterianos</u>	42
6.5.4	<u>Etapa 3 (E3) - Etapa de proliferação dos isolados</u>	43
6.6	<i>Identificação de bactérias Isoladas</i>	43
6.6.1	<u>Espectrometria de Massa (MS) com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Análise de Tempo de Voo (MALDI-TOF)</u>	43
6.6.2	<u>Identificação dos Isolados por Sequenciamento do gene 16S RNA</u>	44
6.6.2.1	Extração de DNA genômico dos isolados	44
6.6.2.2	Análise eletroforética de DNA em gel de agarose e purificação de fragmentos	44
6.6.2.3	Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	44
6.6.2.4	Sequenciamento de DNA	46
6.6.2.5	Análise da sequência obtida.....	46
6.6.2.6	Análise filogenética.....	46
6.6.3	<u>Caracterização e Identificação de bactérias por métodos Bioquímicos</u>	46
6.6.4	<u>Coloração Gram</u>	47
6.7	<i>Teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC) para cobre</i>	47
6.8	<i>Obtenção das curvas de crescimento dos isolados selecionados</i>	47
6.9	<i>Análise da produção de biomassa bacteriana</i>	48
6.10	<i>Teste de adsorção de íons CuCl₂</i>	48
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
7.1	<i>Isolamento de bactérias de amostras ambientais</i>	50
7.2	<i>Identificação das bactérias isoladas e seleção das mais promissoras</i>	52
7.2.1	<u>Espectrometria de Massa (MS) com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Análise de Tempo de Voo (MALDI-TOF)</u>	52
7.2.2	<u>Sequencia do gene codificador do rRNA 16S</u>	56
7.2.3	<u>Sequência do gene <i>rpoD</i></u>	59
7.2.4	<u>Árvores fenéticas dos isolados bacterianos</u>	60
7.2.5	<u>Caracterização bioquímica dos isolados</u>	64
7.2.6	<u>Identificação dos isolados bacterianos e seleção dos mais promissores</u>	67
7.3	<i>Caracterização dos isolados bacterianos selecionados</i>	69
7.3.1	<u>Avaliação da resistência aos íons de cobre dos isolados selecionados</u>	69
7.3.2	<u>Curvas de crescimento dos isolados bacterianos selecionados</u>	70
7.4	<i>Produção de Biomassa Bacteriana</i>	73

7.5 <i>Análise da capacidade de adsorção de (verificação de potencial)</i>	74
8 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS*	81
ANEXOS	88
- a - Tabela 9 - Detalhamento dos dados da primeira coleta Maio/2012.	88
- b - Tabela 10 - Detalhamento dos dados da segunda coleta Novembro/2012.....	88
- c - Tabela 11 - Detalhamento dos dados da terceira coleta Março/2013.	89
- d - Tabela 12 - Detalhamento dos dados da quarta coleta Maio/2013.	89
- e - Figura 21 - Resultado e perfil protéico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 69.a	90
- f - Figura 22 - Resultado e perfil protéico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 69.b	90
- g - Figura 23 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 74.a	90
- h - Figura 24 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 76.a	91
- i - Figura 25 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 80.a	91
- j - Figura 26 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 90.a	91
- k - Figura 27 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 98.a	92
- l - Figura 28 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 98.b	92
- m - Figura 29 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 104.b	92
- n - Figura 30 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 120.e	93
- o - Figura 31 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 122.b	93
- p - Figura 32 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 125.e	93

- q - Figura 33 - Árvore fenética com base nas sequências da região 16S <i>r</i> RNA do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero <i>Pseudomonas</i>	94
- r - Figura 34 - Árvore fenética com base nas sequências do gene <i>rpoD</i> do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero <i>Pseudomonas</i>	94
- s - Quadro 7 - Imagens das características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados de 69.a até 90.a.....	95
- t - Quadro 8 - Imagens das características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados de 98.a até 125.e.....	96
- u - Figura 35 – Imagens do crescimento das colônias em meio TSM acrescido de Tween 80.....	97
- v - Figura 36 - Imagens do crescimento dos isolados em meio Ágar Sangue, após 48h para verificação de hemólise.....	97
- w - Figura 37 - Imagem do crescimento dos isolados em meio Ágar Sangue, após 96h para confirmação da formação do halo do isolado 121.b.	98
- x - Quadro 9 - Imagens dos resultados KIT API 20NE para os isolados de 69.a até 90.a.	98
- y - Quadro 10 - Imagens dos resultados KIT API 20NE para os isolados de 98.a até 125.e.	99
- z - Quadro 11 – Imagens dos resultados do teste de mínima concentração inibitória dos isolados 69.a até 90.a.	100
- aa - Quadro 12 - Imagens dos resultados do teste de mínima concentração inibitória dos isolados 98.a até 125.e	101

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*:

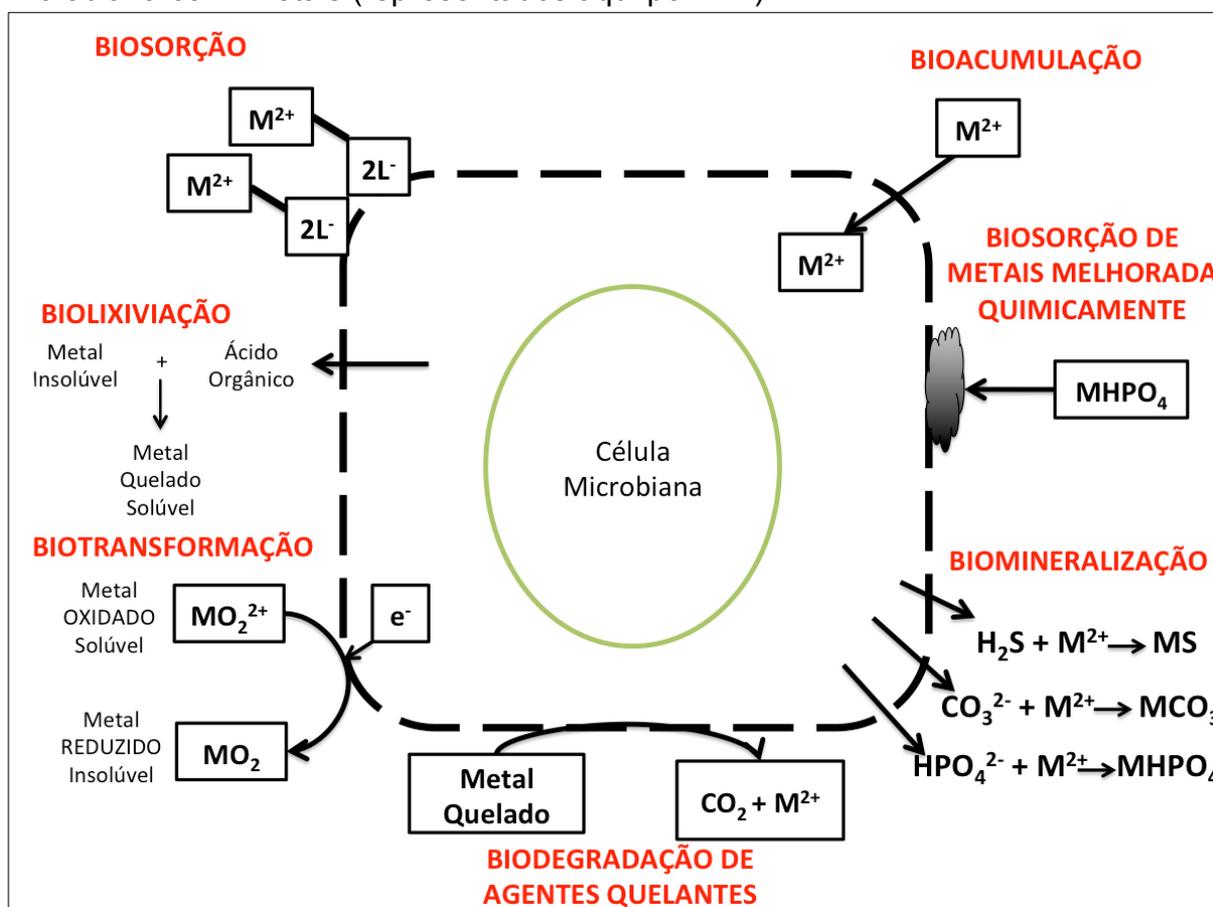
- 1) A bioaugmentação, que consiste na adição de organismos exógenos capazes de degradar ou modificar o poluente;
- 2) Bioestimulação, que é o estímulo à atividade microbiana já existente;
- 3) A utilização dessas duas técnicas em conjunto (RIZZO; RAIMUNDO, 2003).

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.

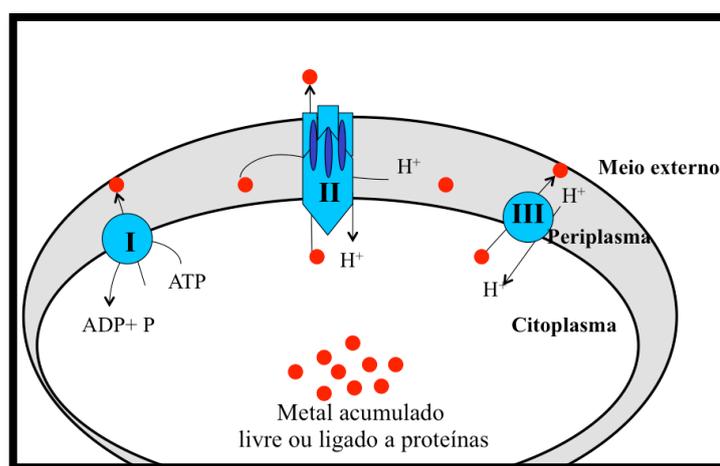
Como pode ser observado na Figura 2, os mecanismos de resistência desta bactéria, também são compostos por facilitadores de difusão, os quais permitem apenas uma maior resistência às concentrações de metais existentes no meio, desta forma, ao buscar bactérias para a utilização em biorremediação, deve-se 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).

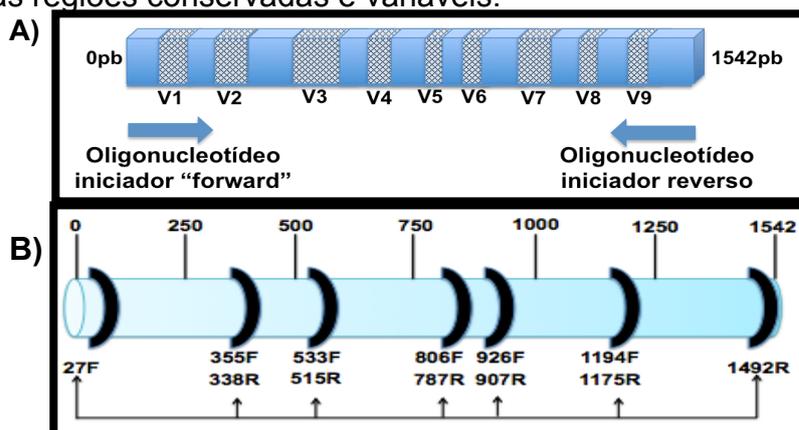
2.4.1 A região 16S

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 causadora de antraz (PILO e FREY 2011). Na verdade, a identificação de espécies do gênero *Bacillus*, que contém espécies patogênicas e outras de grande importância em aplicação biotecnológica como *B. thuringiensis*, não pode ser feita somente baseada nas 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).

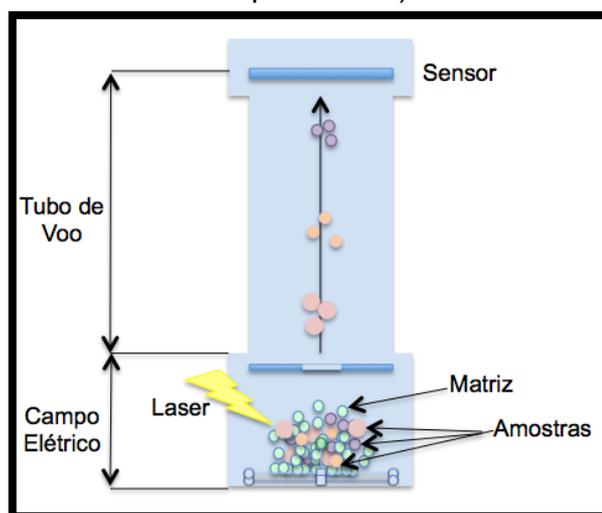
2.4.4 Espectrometria de Massa (MS) com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Análise de Tempo de Voo (MALDI-TOF)

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 desorção 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 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo isolar bactérias de áreas contaminadas com íons cobre (Cu^{2+}) que apresentassem alta resistência a estes íons, realizar a identificação das bactérias, e selecionar os isolados potencialmente mais promissores para serem empregados em biorremediação ambiental.

3.1 *Objetivos específicos*

- Isolar bactérias resistentes a íons Cu^{2+} a partir de amostras de águas e de sedimentos provenientes de diversos pontos identificados da Mina do Sossego pertencente à mineradora VALE;
- Estabelecer um protocolo de isolamento que permita um bom rendimento de seleção de bactérias resistentes;
- Realizar a identificação das bactérias selecionadas empregando técnicas: microbiologia clássica, sequenciamento do 16S rRNA, MALDI-TOF;
- Construir uma árvore fenética com os resultados obtidos.
- Selecionar as bactérias potencialmente mais promissoras para serem empregadas em processos de:
 - Biorremediação de águas contendo íons Cu^{2+} ;
 - Bioacumulação de íons Cu^{2+} visando a recuperação deste metal.

4 HIPÓTESE

4.1 *Justificativa*

Este trabalho teve e tem como justificativa:

- A presença no Brasil de uma ampla biodiversidade microbiana, que permite que os microrganismos se adaptam aos diversos tipos de ambiente;
- A descrição por diversos autores que realizaram isolamentos de microrganismos resistentes a metais tóxicos de ambientes contaminados com metais;
- Bactérias resistentes à elevadas concentrações de íon Cu^{2+} possivelmente deverão apresentar potencial de adsorção de grandes quantidades deste íon, já que este seria um dos mecanismos que promoveria a redução de sua toxicidade para a célula;
- A demanda existente para que se encontrem microrganismos capazes de atuar com êxito na área de biorremediação de íons Cu^{2+} , aliada à possibilidade de recuperação deste metal de importante valor econômico.

Assim, aliada à crescente preocupação com a sustentabilidade, este estudo visou isolar e identificar microrganismos a partir de amostras de solo, sedimento e água contaminados com íons cobre (Cu^{2+}) que apresentassem não apenas resistência potencial a esse metal, mas que também fossem capazes de adsorver este íon.

5 QUESTÕES

Seria possível isolar bactérias a partir de áreas contaminadas com íons cobre (Cu^{2+}) que apresentem não apenas resistência a esse metal, mas também apresentassem boa capacidade de adsorção deste íon ?

Em termos ecológicos, como essas bactérias estariam relacionadas entre si ? Ou seja, estes isolados poderiam ser bioindicadores de áreas contaminadas com íons cobre (Cu^{2+}) ?

6 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos localizado no Instituto de Ciência Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), sob orientação da professora Dr^a Elisabete José Vicente. Parte do trabalho foi realizado no laboratório do professor Cláudio Augusto Oller do Nascimento e no CEPEMA.

6.1 *Amostras de solo e água contaminadas com cobre.*

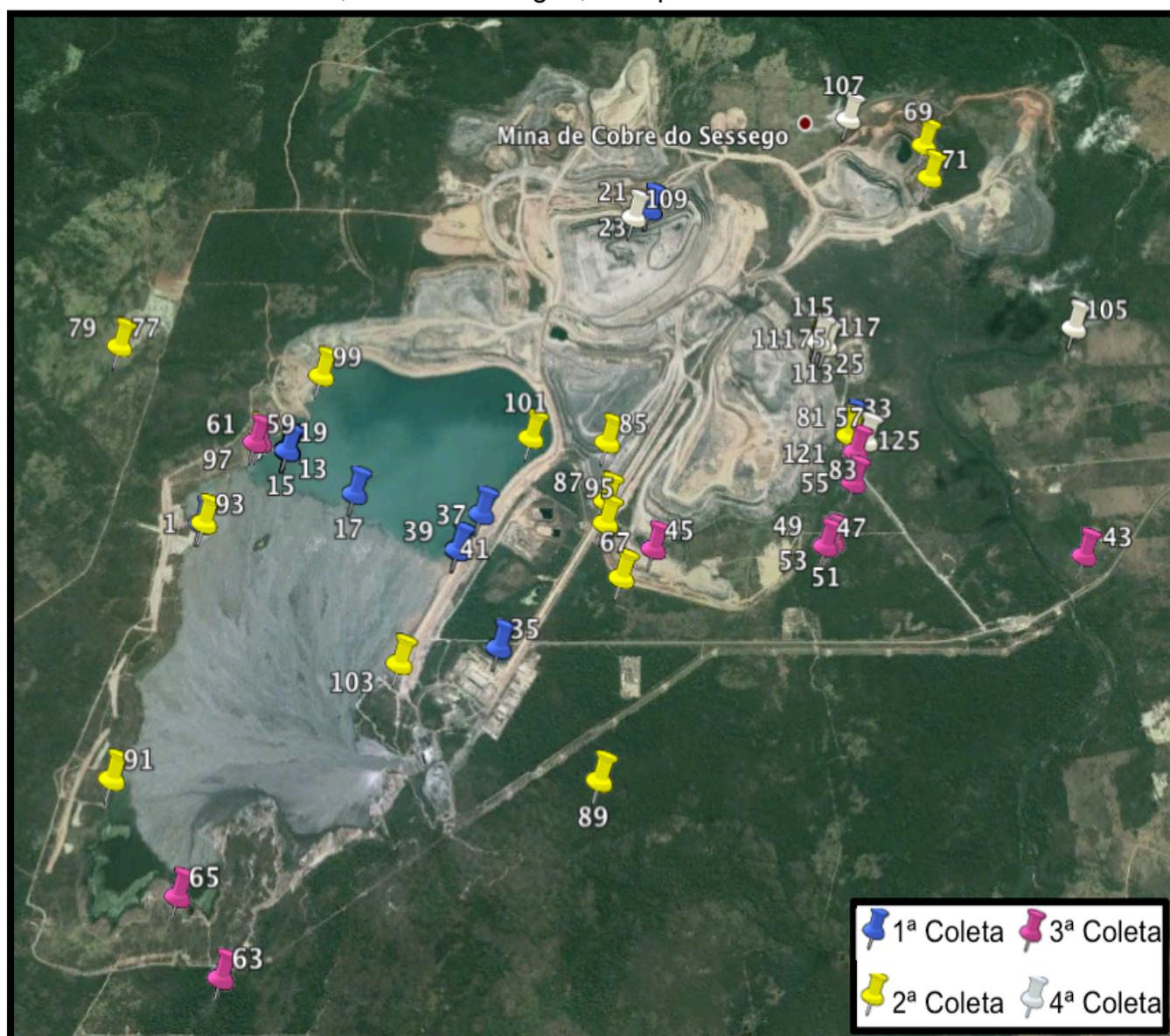
Diversos pesquisadores do Projeto maior ao qual se insere este trabalho, realizaram um total de quatro coletas de solo, sedimento e água, em diferentes épocas do ano Maio/2012, Novembro/2012, Março/2013, Maio/2013; e estas coletas foram realizadas em diferentes localizações da Mina do Sossego, pertencente à mineradora VALE, localizada em Carajás, Pará. As localizações das coletas estão indicadas na Figura 5. No item Anexos podem ser observadas as Tabelas de 9 a 12, onde são apresentados todos os dados das amostras analisadas, como localização (latitude e longitude) e pH, de cada uma das amostras coletadas.

As amostras foram retiradas em duplicatas e de forma aleatória, uma vez que não havia dados disponíveis sobre a concentração de resíduo de cobre na extensão da mina. As amostras foram armazenadas de duas formas até o momento de seu processamento: refrigerada (4 °C); e, não refrigerada (temperatura ambiente):

1. Primeira coleta: foram obtidas 20 amostras, que foram numeradas de 1 a 42, devido à presença de duplicatas;
2. Segunda coleta: foram obtidas 12 amostras numeradas em continuação às anteriores de 43 a 66;
3. Terceira coleta: apresentou 19 amostras numeradas de 67 a 104;
4. Quarta coleta: foram obtidas 11 amostras numeradas de 105 a 126.

Desta forma, ao todo, considerando-se as duplicatas, foram processadas 126 amostras, sendo 63 amostras refrigeradas, representadas pelos números pares; e, 63 duplicatas não refrigeradas, representadas pelos números ímpares.

Figura 5 - Localização, segundo "Google Earth", de cada um dos pontos de coleta das amostras de solo, sedimento e água, nos quatro eventos de coleta.



FONTE: HORNINK, K.R.; VICENTE et al, 2013

1ª Coleta: Maio/2012; 2ª Coleta: novembro/2012; 3ª Coleta: março/2013; 4ª Coleta maio/2013.

6.2 Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho foram:

- *Cupriavidus metallidurans* CH34 (ATTC -43123): fornecida pelo laboratório de Genética Molecular e Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB II – USP) para ser utilizada como controle positivo na adsorção de cobre. A mesma encontra-se armazenada em solução de glicerol 30%, à -70 °C e à -20 °C.
- *Escherichia coli* DH5 α (MESELSON; YUAN,1968): fornecida pelo laboratório de Genética Molecular e Microrganismo do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB II – USP) para ser utilizada como controle negativo da absorção de metal tóxico. A mesma encontra-se armazenada em solução de glicerol 30%, à -70 °C e à -20 °C.

6.3 Equipamentos

6.3.1 Incubadora com agitação horizontal

Para o cultivo das bactérias em meio líquido foi utilizada a incubadora com agitação horizontal (“shaker”) da marca “Innova” (New Brunswick Scientific, New Jersey, EUA) modelo 44R. Este equipamento proporciona agitação por rotação entre 25 até 400 rpm. Sua temperatura pode ser ajustada desde -20 °C até 80 °C.

Os cultivos foram realizados na temperatura de 28 °C, com rotação fixada em 180 rpm. O tempo de permanência das amostras neste aparelho variou de acordo com o tempo necessário para ser observado crescimento bacteriano.

6.3.2 Termociclador

Utilizou-se o Termociclador C1000 da marca “Bio-Rad” (Bio-Rad, Berkeley, EUA) com capacidade para dois blocos de 48 Tubos de 0,2 ml ou um bloco de 96 tubos de 0,2 ml. A temperatura neste equipamento pode variar entre 0–99 °C.

6.3.3 Espectrômetro de Massa - Bruker Daltonics MALDI Biotyper

O equipamento "Bruker Daltonics MALDI Biotyper" (Bruker, Billerica, EUA) foi utilizado para identificação das bactérias isoladas por MALDI – TOF. Para tanto, uma alíquota de cada colônia bacteriana foi transferida para a placa de leitura, com auxílio de um palito. Após a secagem à temperatura ambiente, a mostra foi coberta com 1 µL da matriz HCCA ("α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid", do fornecedor "BRUKER"). A mistura foi seca a temperatura ambiente e então analisada no equipamento.

6.4 *Meios de cultura*

- MJS Adaptado de Valls et al. (2000): 12,5 mM HEPES (pH 7.1); 50 mM NaCl; 20 mM NH₄Cl; 1 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,05 mM MnCl₂; 0,8% (p/v) casaminoácidos; 0.005% (p/v) tiamina. A fonte de carbono variou conforme cada experimento, podendo ser utilizado 0,50% de glicose e/ou 0,50% de glicerol e/ou 0,5% de gluconato. Para todos os experimentos com este meio acrescentou-se a ele 1 mM CuCl₂, 10,0 mg/L de Anfotericina B.
- TSM adaptado de Mergeay et al (1985): 6,06 g/L de Tris; 4,68 g/L de NaCl; 1,49 g/L de KCl; 1,07 g/L de NH₄Cl; 0,43 g/L de Na₂SO₄; 0,2 g/L de MgCl₂ x 6H₂O; 0,03 g/L de CaCl₂ x 2H₂O; 0,23 g/L de Na₂HPO₄ x 12H₂O; 0,005g/L de Fe(III)(NH₄) citrato; 1 mL de solução de elementos traço SL7; As fontes de carbono variaram de acordo com a etapa do experimento, podendo ser 0,50% de glicose (p/v) e/ou 0,50% de glicerol (mL/L) e/ou 0,50% de gluconato. Os elementos traço SL7 (1 L) empregados são: 1 mL de HCl solução (25%); 70 mg de ZnCl₂; 100 mg de MnCl₂.4H₂O; 60 mg de H₃BO₃; 200 mg de CoCl₂.6H₂O; 20 mg de CuCl₂.H₂O; 20 mg de NiCl₂.6H₂O e 40 mg de (NH₄)₂MoO₄.2H₂O. O meio TSM foi utilizado para evitar-se a redução de biodisponibilidade dos metais pesados, sendo o principal meio
- Meio líquido Luria Bertani (LB), utilizado para as etapas de proliferação celular após estocagem em glicerol 30%, consiste em triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, para meio sólido adiciona-se 2% de Ágar.
- Caldo Nutriente (CN) industrializado, para algumas etapas de proliferação bacteriana anteriores aos experimentos.

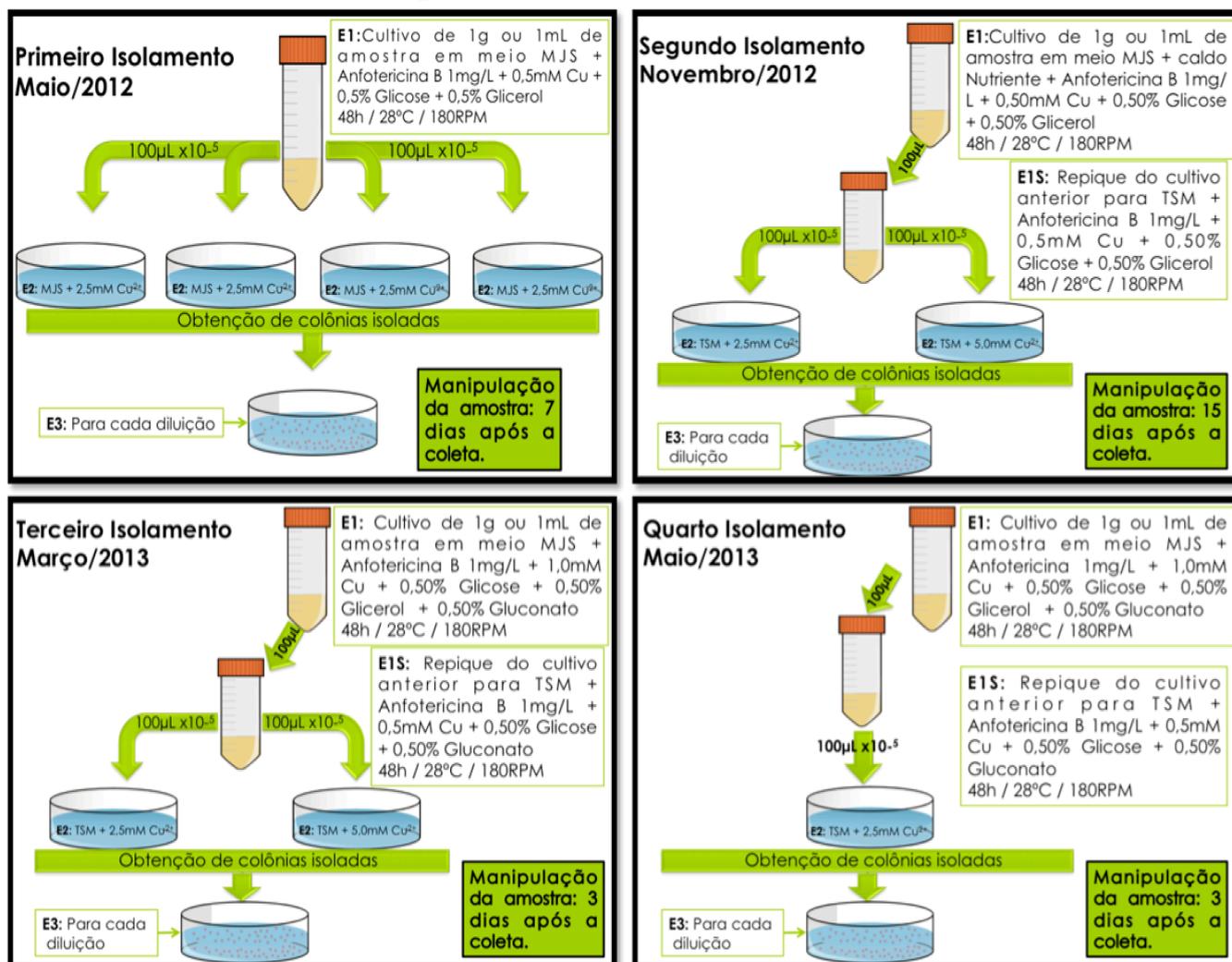
- Ágar sangue industrializado, para diferenciação de espécies de isolados.

Todos os meios de cultura empregados foram de procedência Difco (Difco, Michigan, EUA) e a procedência dos sais empregados foi Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha) ou Sigma (Sigma, St. Louis, EUA). Quando não especificamente indicado, a composição dos meios e o preparo destes foi realizado de acordo com Sambrook e Russel, 2001.

6.5 Isolamento das bactérias resistentes a cobre.

Para o isolamento das bactérias resistentes aos íons Cu^{2+} foram seguidos uma série de procedimentos cujo as etapas podem ser observadas na Figura 6 e estão abaixo descritas.

Figura 6 - Esquema das etapas de isolamento, seleção e proliferação de bactérias resistentes a CuCl_2 .



6.5.1 Etapa 1 (E1) - Etapa de obtenção de Microrganismos

Foram inoculados 1g ou 1 ml de amostra em meio MJS com adições variadas em tubos de 50 ml (Figura 6). As culturas foram incubadas em "shaker" sob agitação de 180 rpm, à 28 °C, até que fosse observado o crescimento. De cada cultivo crescido foram retirados 700 µL, para serem armazenados em microtubos do tipo "Eppendorf" (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) contendo 300 µL de glicerol 99%. Estas amostras foram mantidas a -70 °C (Figura 6).

6.5.2 Etapa 1 Suplementar (E1S) - Etapa de proliferação das bactérias obtidas

Para a obtenção de um cultivo mais puro e livre de resíduos, a partir do segundo isolamento, foi realizada uma etapa de enriquecimento das bactérias resistentes a CuCl_2 , para tanto transferiu-se cerca de 100 µL do cultivo anterior para 5 mL de meio TSM contidos em tubos de 50 mL, com concentrações variando de 1 mM a 10 mM de cobre. Para os terceiros e quartos isolamentos este cultivo foi realizado em "erlenmeyer" de 150 mL com 25 mL de meio nas mesmas condições anteriores (Figura 6).

6.5.3 Etapa 2 (E2) - Etapa de Obtenção de isolados bacterianos

Para se obterem colônias isoladas de bactérias resistentes a CuCl_2 , 100 µL das amostras que apresentaram crescimento no cultivo anterior foram semeados meio sólido acrescido de 1 mg/L de Anfotericina B (Sigma) e CuCl_2 em concentrações variando entre 2,5 mM e 10 mM (Figura 6).

No primeiro isolamento das bactérias da primeira coleta, as culturas foram diluídas 100.000 (10^{-5}) vezes para serem semeadas em meio sólido MJS com adição, possibilitando desta forma a obtenção de colônias isoladas.

O isolamento das bactérias da segunda coleta, foi realizado utilizando-se alça de platina, pelo método de esgotamento. Nos dois isolamentos das bactérias das duas coletas seguintes, as culturas foram diluídas como no primeiro isolamento.

Do segundo ao quarto isolamento, para a obtenção das colônias isoladas foi empregado no meio TSM com adições de Anfotericina B e 2,5 mM a 10 mM de CuCl_2 .

6.5.4 Etapa 3 (E3) - Etapa de proliferação dos isolados

Algumas colônias que se formaram na etapa de obtenção de isolados foram coletadas isoladamente e cultivadas em 5 mL de meio MJS e na máxima concentração de CuCl_2 alcançada no cultivo anterior (variando de 2,5 mM a 10 mM) do primeiro isolamento.

A cada coleta a metodologia para o isolamento de bactérias resistentes a cobre passou por modificações, como pode ser observado na Figura 5 e na descrição anterior. Estas alterações ocorreram, pois a metodologia do primeiro isolamento foi idealizada a partir da observação de diversas publicações (JIANG *et al.*, 2008; CASTRO-SILVA *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2009). As metodologias seguintes foram adaptadas visando obter maior número de isolados, as mudanças foram realizadas conforme observações do número de isolados obtidos nos isolamentos anteriores e na capacidade desses isolados resistirem às altas concentrações de íons de cobre.

6.6 Identificação de bactérias Isoladas

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

A identificação de bactérias isoladas por MALDI-TOF foi realizada empregando-se o equipamento "Bruker Daltonics MALDI Biotyper" com o "software" localizado no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA). O procedimento utilizado foi o sugerido pelo fabricante do equipamento.

Foi considerado que quando o "score" obtido encontra-se entre:

- 2.3 e 3.0, há uma grande probabilidade para identificação de espécie;
- 2.0 e 2.29, a identificação de gênero é praticamente certa e a de espécie é provável;
- 1.9, apenas a identificação de gênero é provável.

Apenas os isolados com os quais se obteve "scores" significativos e apresentaram identificação positiva de interesse (não patogênica) tiveram seus cultivos e análises continuadas.

6.6.2 Identificação dos Isolados por Sequenciamento do gene 16S RNA

6.6.2.1 Extração de DNA genômico dos isolados

Para o isolamento do DNA genômico (DNAg) total dos isolados foi utilizado o "Kit" da Promega "Wizard® Genomic DNA purification" (Promega, Madison, EUA) e foi seguido o protocolo para extração de DNA total de bactérias Gram negativas, conforme indicado pelo fabricante.

6.6.2.2 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose e purificação de fragmentos

A separação de fragmentos de DNA foi realizada em géis de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, submetido a 80 V, por 2 horas em tampão de corrida 0,5x TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH 8,0) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A quantificação do DNA presente nas amostras foi realizada comparando a intensidade da fluorescência da amostra com aquela exibida por λDNA de concentração conhecida e marcador molecular DNA "Ladder" entre 100 pb e 1000 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Esta comparação foi realizada com a utilização do "software" Vision Works®LS.

6.6.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A amplificação de parte do gene 16S rDNA foi realizada utilizando 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores da região 16S rRNA listados na Tabela 3, 200 µM de dNTP (desoxiribonucleosídeo trifosfato), 1 x de tampão para PCR (Fermentas), e 2,5 U Taq-polimerase (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂ e 30-50 ng de DNA genômico, totalizando o volume final de 25 µL. A reação foi realizada no equipamento termociclador "MJ Research", modelo "PTC-200 Peltier Thermal Cycler" (MJ Research, St. Bruno, Canada). O programa utilizado foi de 35 ciclos de: 95 °C, por 1 minuto, para desnaturação; 50 °C, por 1 minuto, para anelamento; e, 72 °C, por 3 minutos, para extensão. Após o término desses 35 ciclos houve uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram purificados com "kit" PCR "Clean-Up System" (Promega) e quantificados pela comparação da intensidade de fluorescência com o λDNA (100 ng).

A amplificação do gene *rpoD* foi realizada utilizando-se 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador referente do gene *rpoD* listados na Tabela 3, 200 µM de dNTP (desoxiribonucleosídeo trifosfato), 1 x de tampão para PCR (Fermentas), e 2,5 U Taq-polimerase (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂ e 500 ng de DNA genômico, totalizando um volume final de 25µL. A reação foi realizada no equipamento termociclador “MJ Research”, modelo “PTC-200 Peltier Thermal Cycler”. O programa utilizado foi de 35 ciclos de 94 °C, por 1 minuto, para desnaturação; 60 °C, por 1 minuto, para anelamento; e, 72 °C, por 2 minutos, para extensão. Após o término desses 35 ciclos houve uma extensão final de 72 °C, por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram purificados com “kit” da Promega “PCR Clean-Up System” e quantificados pela comparação da intensidade de fluorescência com o λDNA (100 ng). A amplificação deste gene só foi realizada para o isolado que pertence ao gênero *Pseudomonas sp.*, o qual apresenta uma ampla base de dados deste gene. Para os demais isolados, utilizar este gene para identificação, não seria muito proveitoso.

Tabela 3 - Iniciadores da reação de PCR e iniciadores para sequenciamento.

	Nome	Sequência	Finalidade	Referência
16S rDNA	16S _{27F}	5'- AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG- 3'	Amplificação do gene 16S rDNA	WEISBURG et al., 1991
	16S _{1492R}	5'- TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT- 3'		
	16S _{536F}	5'- CAGCMGCCGCGGTAATWC- 3'	Sequenciamento do gene 16S rDNA	HOLBENet al., 2004
	16S _{782R}	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'		CHIMETTO et al., 2008
<i>rpoD</i>	<i>rpoD</i> _{70R}	5'-ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNG CYTCNACCATYTCYTTYTT-3'	Sequenciamento do gene <i>rpoD</i>	YAMAMOTO et al., 2000
	<i>rpoD</i> _{70f}	5'-ACGACTGACCGGTACGCATGTAYA TGMGNGARAGGGNACNGT-3'	Sequenciamento do gene <i>rpoD</i>	YAMAMOTO et al., 2000

6.6.2.4 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR resultantes da amplificação do 16S rDNA das bactérias isoladas, foram sequenciados no sequenciador automático "ABI 3730 DNA Analyser" (Applied Biosystems, Foster City, EUA), no Departamento de Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP. Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 37,5 ng do *amplicon* da região 16S ou do gene *rpoD*.

6.6.2.5 Análise da sequência obtida

Os resultados do sequenciamento foram analisados com o auxílio do programa "Chromas Pro", para verificação da qualidade das sequências e obtenção de sequências "contig" ou consenso. As sequências foram transformadas em dados FASTA e a análise de similaridade foi realizada empregando o programa "BLASTn" (ALTSCHUL et al., 1997) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). Este "software" permite a execução de alinhamento local entre uma sequência fornecida ("query") contra um banco de dados ("subject") que, no caso, são sequências depositadas no "GenBank".

6.6.2.6 Análise filogenética

As árvores filogenéticas foram construídas com o programa "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" (MEGA versão 5.0) utilizando-se a metodologia "Neighbor Joining" e teste de robustez "bootstrap" com 1000 interações.

6.6.3 Caracterização e Identificação de bactérias por métodos Bioquímicos

A caracterização e possível identificação dos isolados bacterianos por métodos bioquímicos foi realizada empregando o "kit" de identificação API-20NE (Biomérieux, Rennes, França), segundo as instruções que constam em seu manual.

Além disto, foram utilizados cultivos em ágar sangue, e cultivos em meio TSM acrescido de Tween 80, com a finalidade de se caracterizar melhor os isolados, uma vez que algumas espécies podem ser diferenciadas por realizarem ou não hemólise e/ou precipitação de Tween 80.

6.6.4 Coloração Gram

Para a observação da morfologia microscópica das células bacterianas isoladas, após o primeiro isolamento das bactérias estas foram submetidas à coloração de Gram e observadas ao microscópio óptico.

A coloração Gram foi realizada segundo o protocolo Smith e Hussey (2005), originalmente publicado por Gram, 1884.

6.7 *Teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC) para cobre*

A determinação da mínima concentração inibitória (MIC) dos isolados para os íons de cobre foi realizada de acordo com Monchy et al., (2006), com alterações. Este teste foi realizado a partir dos cultivos da etapa de proliferação de isolados. 100 µL da cultura desta etapa foram semeados em uma série de tubos contendo o mesmo meio e concentrações crescentes de cloreto de cobre. As diluições de cloreto de cobre foram preparadas a partir de uma solução a 1,0 M que foi esterilizada por filtração em membrana com poros 0,22 µm (Sartorius). Foram testadas as concentrações de CuCl₂: 0,5 mM; 1,5 mM; 2,5 mM; 5,0 mM; 6,5 mM; 7,5 mM; 8,5 mM; 9,5 mM; 10,0 mM; 12,5 mM; 14,5 mM; 15,0 mM e 17,5 mM. A verificação de crescimento foi realizada pela leitura da Absorbância a 600 nm (Ab600), após o cultivo com agitação em “shaker” a partir de 48 h.

6.8 *Obtenção das curvas de crescimento dos isolados selecionados*

As curvas de crescimento foram obtidas para alguns isolados selecionados, que foram cultivados em frascos do tipo “erlenmeyer” de 250 ml, contendo 50 ml meio mínimo TSM (Material e Métodos, item 6.4), mantidos em “shaker” sob agitação de 180 rpm e a temperatura de 28 °C.

Após o inóculo inicial retirou-se uma amostra de 1 mL a cada 4 h, por 72 h, ou até que se atingisse a fase estacionária. A verificação do crescimento microbiano foi realizada pela leitura de Absorbância a 600 nm (Ab600). Quando a Absorbância atingiu valores superiores a 1,00, foi realizada a diluição da amostra na proporção 1:100. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas

6.9 *Análise da produção de biomassa bacteriana*

Para a determinação da produção de biomassa bacteriana, inicialmente cada uma das bactérias foi cultivada em meio mineral TSM (Material e Métodos, item 6.4). Para tanto, a partir de pré-cultivos realizados no mesmo meio de cultura por 48 h, foram realizadas diluições até serem obtidos pré-cultivos com Absorbância 600 nm igual a 2,0.

A partir destas pré-culturas diluídas foram realizadas semeaduras de 500 µl em 50 ml de meio mineral TSM contido em frasco “erlenmeyer” de 250 mL. Os cultivos foram realizados em “shaker”, com rotação de 180 rpm e temperatura de 28 °C.

Após 24 h de cultivo, cada frasco foi agitado vigorosamente para que seu conteúdo fosse homogeneizado e uma amostra de 15 ml foi submetida a filtração a vácuo através de uma membrana de celulose com porosidade de 0,20 µm (Millipore, Billerica, EUA). O sedimento da filtração foi submetido a secagem em forno de microondas com potência 20%, deixado para resfriar em uma estufa a temperatura ambiente até que se obtivesse uma massa constante. O valor da massa seca foi determinado por gravimetria.

6.10 *Teste de adsorção de íons CuCl₂*

Para os ensaios de adsorção de cobre foi utilizada uma metodologia adaptada a partir da proposta pelos autores Huang et al., (2003) e Fosso-Kankeu et al., (2011).

Todos os isolados bacterianos selecionados foram cultivados em 50 mL de meio mineral TSM, em “shaker” a temperatura de 28 °C e agitação de 180 rpm. Quando os cultivos atingiram metade da fase logarítmica, os cultivos foram transferidos para tubos tipo “Falcon” e então centrifugados a 6.000 g, por 40 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi incubada e lavada em solução salina e centrifugada novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado. Os tubos foram deixados inclinados sobre papel absorvente por 40 minutos, para que todo o resíduo líquido de salina fosse eliminado. A massa seca de células foi ressuspensa em água Milli-Q (pH 5,0) contendo CuCl₂ a 2,0 mM.

Foi realizada a incubação de 10 ml de cada uma das amostras contendo células na concentração de 1,00 g/L e cloreto de cobre em tubos do tipo “Falcon” de 15 ml, em “shaker” sob agitação de 180 rpm, a 28 °C. Após 2 h e 24 h foram retiradas amostras, as quais foram centrifugadas por 20 minutos a 8.000 g. O sobrenadante foi coletado e submetido a análise para determinação da concentração de cobre empregando espectrometria de absorção atômica. As análises foram realizadas no Espectrofômetro de Absorção Atômica, Shimadzu, modelo AA7000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Quando não foi possível a análise imediata do sobrenadante, o mesmo foi congelado para análise posterior. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a partir de amostras de solo, sedimento e águas coletadas de diferentes localidades da mina de cobre pertencente à mineradora VALE, mina do Sossego, em Canaã dos Carajás, PA (Figura 5 - Material e Métodos 6.1), foram realizados os procedimentos de isolamento, identificação e caracterização de isolados bacterianos com potencial e/ou bioacumulo de cobre (Cu^{2+}).

7.1 *Isolamento de bactérias de amostras ambientais*

Para o isolamento das bactérias com potencial de emprego em biorremediação e/ou bioacumulo de metais pesados tóxicos, foram empregados diferentes procedimentos para cada uma das amostras coletadas. A metodologia foi continuamente aprimorada visando a obtenção de isolados em maior número e mais adequados aos objetivos do trabalho.

A última metodologia aplicada apresentou o melhor resultado quanto ao número de isolados obtidos, uma vez que foi possível observar o crescimento de colônias em todas as amostras coletadas. Alguns fatores que podem ter contribuído para tal resultado são:

- A adição de gluconato como fonte de carbono;
- A redução do período de espera para manipulação da amostra, que permite que os microrganismos presentes estejam em maior número para cultivo;
- A adição de CuCl_2 em meio mínimo desde o primeiro cultivo, o que permite que o cobre esteja biodisponível desde as primeiras etapas da seleção, e desta forma, que as bactérias isoladas apresentem a mínima resistência a Cu^{2+} desejada.

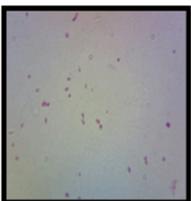
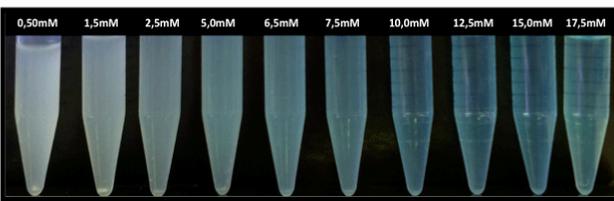
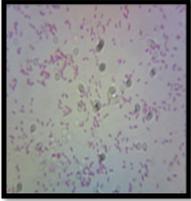
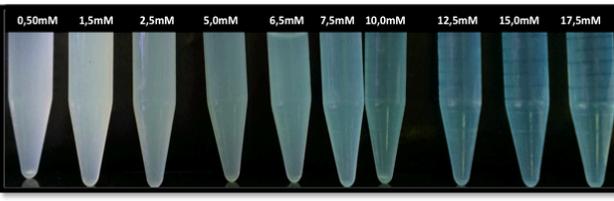
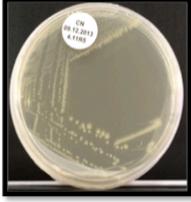
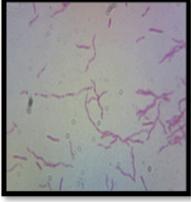
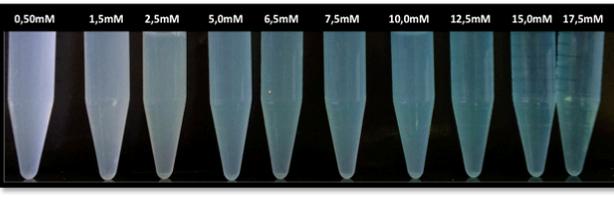
Os procedimentos de isolamento foram realizados em 126 amostras coletadas, sendo que 43 amostras resultaram em crescimento de colônias de bactérias resistentes a Cu^{2+} isoladas: 12 pertencentes à primeira coleta; 4 pertencentes à segunda; 10 pertencentes à terceira coleta; e, 17 pertencentes à quarta coleta.

Com a finalidade de evitar o isolamento de bactérias idênticas provenientes das amostras, as colônias isoladas foram submetidas a várias análises sequenciais:

1. Morfologia macroscópica das colônias isoladas (Quadro 2);
2. Morfologia microscópica das células bacterianas coradas por coloração Gram (Material e Métodos, 6.6.4) (Quadro 2);
3. Confirmação da capacidade de resistência a concentração de CuCl_2 (Material e Métodos 6.7) (Quadro 2).

No Quadro 2 abaixo são apresentados os resultados das análises dos isolados 69.a, 121.b e 125.e. Os resultados das análises de morfologia macroscópica e microscopia de todos os isolados obtidos estão apresentadas no item Anexos, nos Quadros 7 e 8; e, os resultados da resistência aos íons cobre (MIC), no item Quadros 11 e 12.

Quadro 2 - Morfologia macroscópica, morfologia microscópica e teste de resistência a CuCl_2 de alguns isolados bacterianos obtidos.

Isolado	Morfologia Macroscópica	Morfologia Microscópica	Resistência a CuCl_2
69.a			
121.b			
125.e			

A partir destas análises foram selecionados 126 isolados bacterianos para terem seus estudos aprofundados.

7.2 *Identificação das bactérias isoladas e seleção das mais promissoras*

Para a identificação dos isolados bacterianos selecionados foram empregadas diversas técnicas: como MALDI-TOF, sequenciamento da região 16S, construção de árvores fenéticas, e testes bioquímicos.

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

Como a metodologia MALDI-TOF (Material e Métodos, item 6.6.1) apresenta prática execução, foi empregada como a metodologia inicial da identificação dos 126 isolados obtidos.

Foi possível obter uma identificação positiva baseada no padrão das proteínas de superfície expressas pelas bactérias isoladas. Foram identificados isolados repetidos nas amostras, ou seja, foi verificado que colônias isoladas eram correspondentes à mesma cepa isolada, uma vez que os picos apresentados pelo programa de análise dos dados do MALDI-TOF foram idênticos. Esta estratégia permitiu saber que haviam 73 isolados distintos.

A metodologia empregada permitiu a identificação de apenas 51 dos 73 isolados bacterianos independentes obtidos (Quadro 3). Isto porque estes 22 microrganismos não identificados apresentaram o parâmetro de pontuação abaixo do recomendado pelo software Bruker Daltonics para ser considerado um dado confiável (score <1700). Este resultado já era esperado, pois era sabido que esta metodologia não permitiria a identificação de muitos isolados deste trabalho, uma vez que os bancos de dados disponíveis são alimentados principalmente com microrganismos de procedência clínica (CARBONNELLE et al., 2012; KHOT et al, 2012).

Pôde-se observar que há grande diversidade de bactérias em cada uma das amostras coletadas, com várias de espécies e até gêneros distintos (Quadro 3).

Apesar de ser possível que alguns dos 22 microrganismos não identificados apresentassem potenciais para a adsorção de metais tóxicos ou para biorremediação, neste trabalho optou-se por não prosseguir os estudos com estes isolados uma vez que seu estudo seria mais extenso e provavelmente exigiria uma dedicação exclusiva para cada isolado. Desta forma, esses isolados 22 isolados

foram mantidos armazenados em glicerol 30%, a temperatura de -70 °C para estudos posteriores.

Quadro 3 - Identificação dos 51 isolados bacterianos por MALDI-TOF.

Burkholderia cenocepacia (5)		Serratia marcescens (1)	Score < 1700 (22)		
123.a	32	38	86.a	123.b	
124.a	123.b	Bacillus cereus (1)	88.a	125.a	
124.b		53.b	70.b	106.a	
Burkholderia cepacia (6)		Herbaspirillum aquaticum (2)		80.d	106.e
107.f	108.e	125.e	72.b	84.a	106.f
108.a	107.a	Pseudomonas mosselii (2)			105.a
108-c	107.c	104.c	125.c		105.b
Cupriavidus metallidurans (17)		Pseudomonas putida (1)			105.c
70.a	104.a	118.b	98.b		105.d
72.a	104.b	117.a	Ralstonia pickettii (4)		118.a
80.a	114.a	117.b	69.c	76.a	118.c
80.b	114.c	117.c	69.d	80.c	118.d
98.a	116.a	122.b	Sphingomonas trueperi (2)		120.a
126.c			125.b	126.a	120.c
Cupriavidus pauculus (1)		Stenotrophomonas maltophilia (1)			120.e
53.a					
Cupriavidus necator (2)		121.b			122.a
69.a	90.a	Enterobacter cloacae (3)			122.b
Cupriavidus oxalaticus (1)		8	40	65	
69.b		Enterobacter aerogenes (1)			
Staphylococcus epidermidis (1)		50			
32					

A nomenclatura dos isolados refere-se ao número da amostra (algarismos) e à identificação da colônia (letras), sendo que os números ímpares se referem às amostras refrigeradas e os pares referem-se às amostras não refrigeradas. Um "score" menor que 1700 indica baixa especificidade nos resultados em comparação com a base de dados.

Para dar continuidade ao trabalho foram selecionadas apenas aquelas bactérias que apresentavam algum potencial de emprego em biorremediação pré-reconhecido, como algumas bactérias pertencentes ao gênero *Cupriavidus sp* (PAL; PAUL; 2010). Os resultados gerados pelo programa de análise "Bruker Daltonics software" bem como os espectros gerados pelo MALDI-TOF podem ser observados no item Anexos (Figuras de 21 a 32).

Algumas bactérias, pertencentes aos gêneros *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Serratia sp.*, e alguns outros, foram excluídas da continuação do trabalho por serem potencialmente patogênicas apesar de terem sido isoladas de

amostras ambientais (ARPIN et al., 1996; NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997) e, desta forma, seriam pouco recomendadas para processos de escala ampliada.

Apesar de algumas espécies selecionadas apresentarem algum potencial patogênico descrito na literatura, os casos de infecção descritos são apenas de pessoas imunodeprimidas.

A maior quantidade de isolados observada foi da espécie *Cupriavidus metallidurans*, 17/51 (33,3%). Este resultado está dentro do esperado, uma vez que esta espécie de bactéria tem uma presença bastante acentuada em regiões com alta concentração de metais tóxicos (GORIS et al., 2001). Há ainda que considerar a identificação de 7 isolados de bactérias muito próximas: 3 isolados de *Cupriavidus* de outras espécies; e, 4 isolados de *Ralstonia*, que é um gênero muito próximo filogeneticamente de *Cupriavidus*. Desta forma concluímos que 47% dos isolados, quase metade deles, são ou estão relacionados à espécie *C. metallidurans*.

Tendo em vista ampla quantidade de microrganismos obtidos e a dificuldade de se dar prosseguimento ao trabalho com todos, alguns foram selecionados para as etapas subsequentes. Os critérios para esta escolha foram: diferentes espécies, diferentes localidades de isolamento, e baixo potencial para patogenicidade. Os 12 isolados que foram selecionados para estudos mais aprofundados encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Isolados bacterianos selecionados para prosseguimento das análises de bioacumulo/biorremediação

Número do isolado	Microrganismo	Score	Coleta	
1	69.a	<i>Cupriavidus necator</i>	1769	3 ^a
2	69.b	<i>Cupriavidus necator</i>	1727	3 ^a
3	74.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	1682	3 ^a
4	76.a	<i>Ralstonia pickettii</i>	1334	3 ^a
5	80.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	2154	3 ^a
6	90.a	<i>Cupriavidus necator</i>	1703	3 ^a
7	98.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	1790	3 ^a
8	98.b	<i>Pseudomonas putida</i>	1565	3 ^a
9	104.b	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	2340	3 ^a
10	120.e	<i>Novosphingobium resinovorum</i>	1281	4 ^a
11	122.b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1804	4 ^a
12	125.e	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	1855	4 ^a

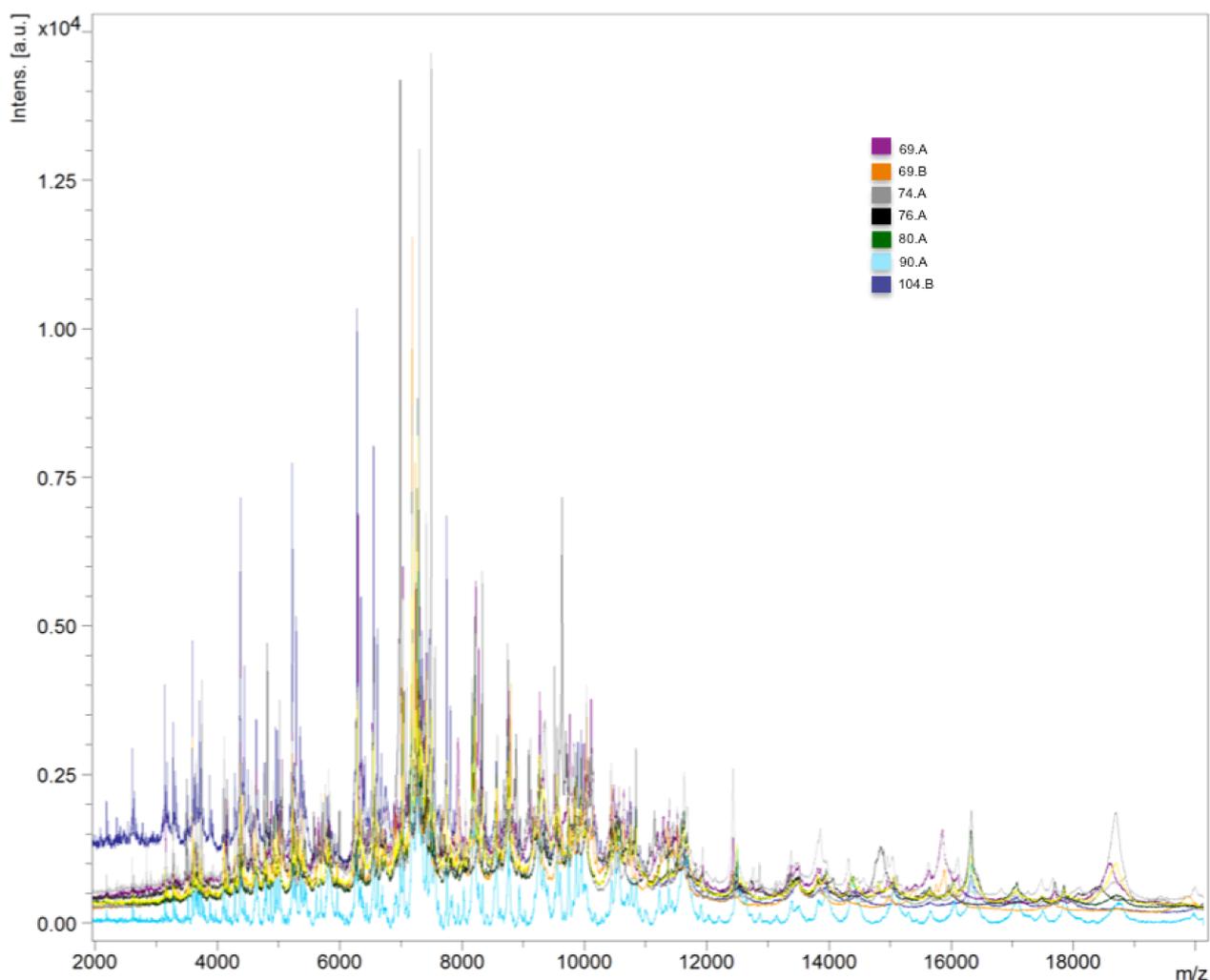
Para "score" do MALDI-TOF entre:

- 2300 e 3000, há uma grande probabilidade para identificação de espécie;
- 2000 e 2299 a identificação de gênero é praticamente certa, e a de espécie é provável;
- 1700 e 1999 apenas a identificação de gênero é provável.

A escolha de uma maioria de microrganismos pertencentes ao gênero *Cupriavidus sp.* é justificada pela distinção dos espectros gerados pelo MALDI-TOF,

que indicam se tratarem de isolados distintos, como pode ser observado na Figura 7. Deve-se aqui, mais uma vez, ressaltar que os espectros MALDI-TOF permitem a identificação não apenas de espécies diferentes, mas também cepas diferentes dentro de uma mesma espécie.

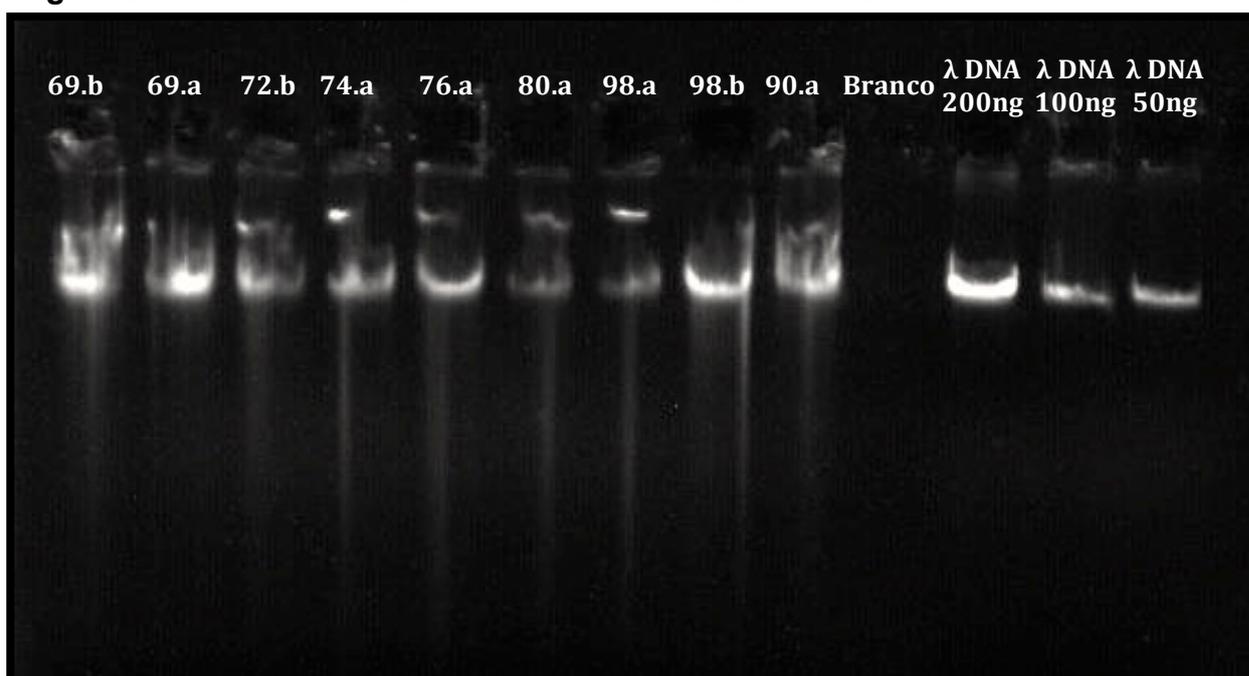
Figura 7 - Espectros gerados pela análise MALDI-TOF das bactérias do gênero *Cupriavidus* (69.a, 69.b, 74.a, 80.a, 98.a, 104.b) e do gênero *Ralstonia* (76.a) selecionadas para para prosseguimento das análises de bioacumulo/biorremediação



7.2.2 Sequencia do gene codificador do rRNA 16S

Com a finalidade de confirmar a identidade das 12 bactérias selecionadas para o prosseguimento do trabalho (Tabela 4), seus DNAs genômicos (DNAg) foram extraídos e quantificados. Os DNAs de todas as amostras apresentaram perfis semelhantes (Figura 8).

Figura 8 - DNA total dos isolados bacterianos selecionados.



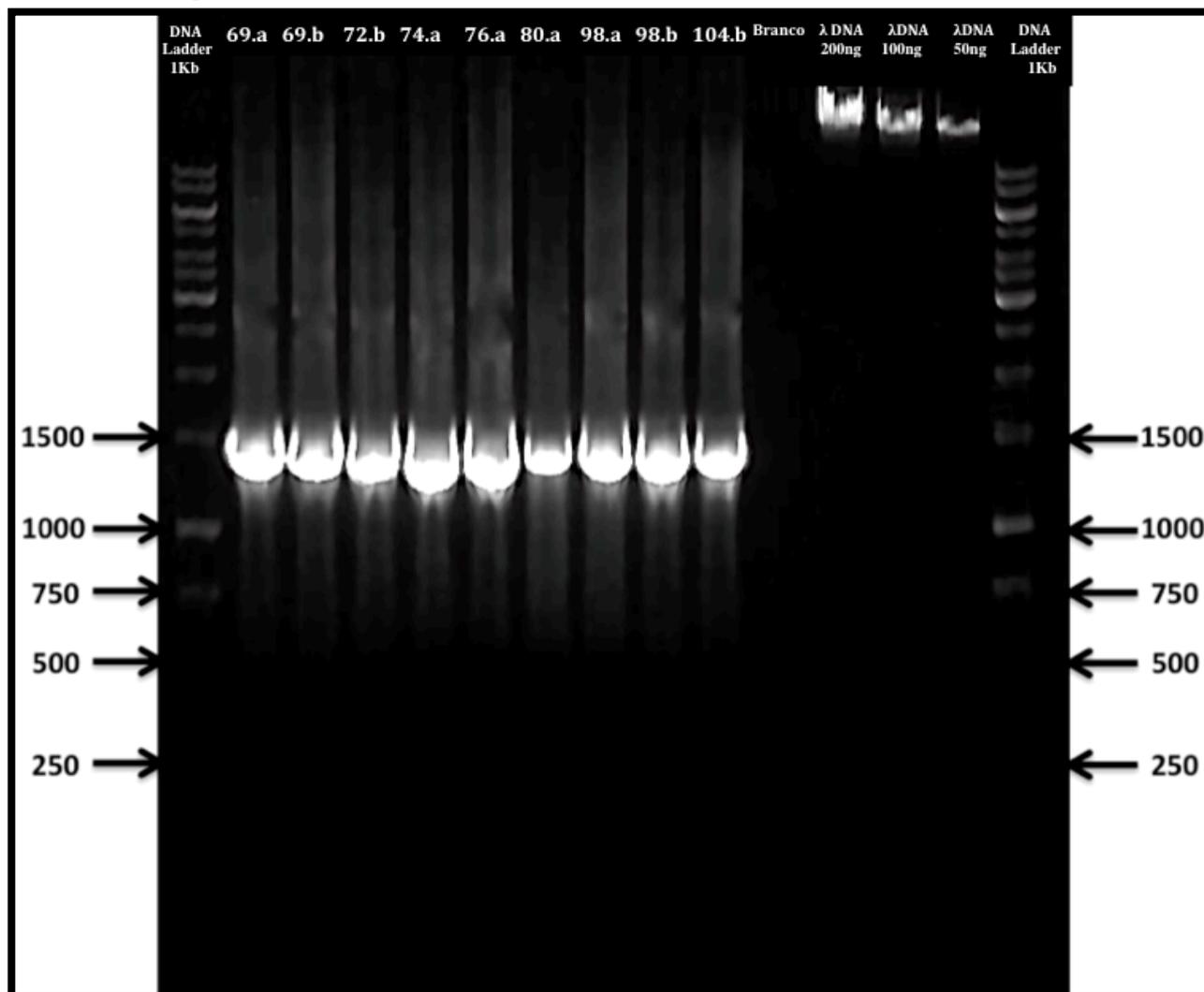
Fonte: HORNINK, K.R.

λ DNA: DNA intacto de fago λ (Fermentas)

O DNA codificador do *r*RNA 16S (16S rDNA) foi amplificado por PCR empregando como molde os DNAg de cada uma das bactérias isoladas e os iniciadores 27F, 536F, 782R e 1492R, conforme o protocolo discutido em Material e Métodos, item 6.6.2.3.

Os 16S rDNAs de todos os 12 isolados bacterianos foram obtidos com sucesso (Figura 9).

Figura 9 – DNA codificador de 16S rDNA dos isolados selecionados.



Fonte: HORNINK, K.R.

λ DNA: DNA intacto de fago λ DNA, do fornecedor λ (Fermentas)

DNA Ladder: 1 Kb, contendo fragmentos que variam de 10.000 pb a 250pb foram utilizados 0,5 µl de DNA Ladder 1 Kb, na concentração de 0,5 µg/µL(Fermentas)

Foi realizado o sequenciamento da região codificadora do 16S rRNA, (Material e Métodos, item 6.6.2.4) de todos os 12 isolados selecionados. A Análise dos resultados obtidos está apresentada no Quadro 4.

Quadro 4 - Identificação dos 12 isolados bacterianos 16S rDNA.

Número do isolado	Resultado alinhamento da região 16S					
	Microrganismo	Total score	Query Cover	E-value	Ident	Tamanho
69.a	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	1194	100%	0	99%	1349
69.b	<i>Cupriavidus oxalaticus</i>	1362	100%	0	98%	1363
74.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	2388	100%	0	99%	1324
76.a	<i>Ralstonia pickettii</i>	1249	100%	0	99%	1374
80.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	2576	100%	0	99%	1356
90.a	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	2933	100%	0	99%	1293
98.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	2465	100%	0	99%	1375
98.b	<i>Pseudomonas putida</i>	1158	100%	0	99%	1365
104.b	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	2484	100%	0	99%	1380
120.e	<i>Novosphingobium resinovorum</i>	996	100%	0	99%	1288
121.b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3575	100%	0	99%	1345
125.e	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	1223	100%	0	100%	1348

Obs: Total score: a cobertura da sequência; Ident: semelhança da sequência obtida com a alinhada; Tamanho: pb da sequência consenso obtida após análise emprego do programa "Chromas Pro".

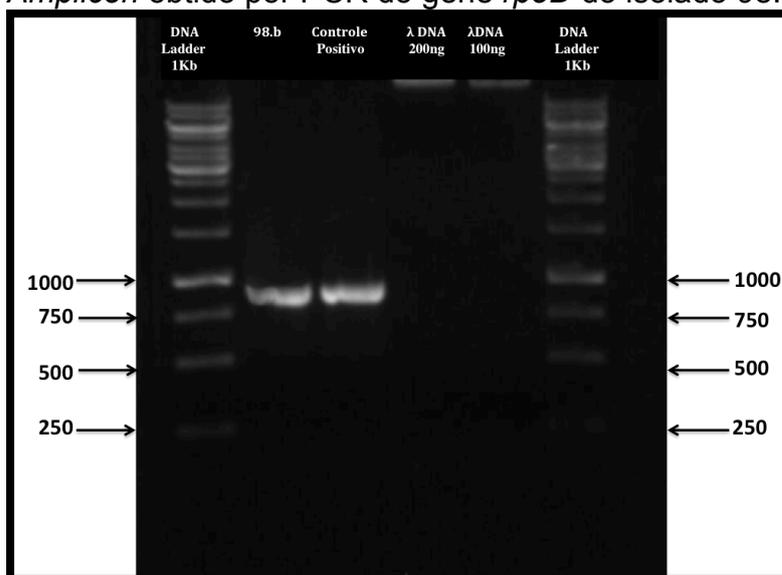
Observando-se o Quadro 4, pode-se notar que para todos os alinhamentos das sequências dos isolados com as pertencentes ao banco de dados sempre foram obtidos valores superiores a 98% de similaridade entre as sequências do banco de dados, sendo que apenas o isolado **125.e** apresentou 100% de similaridade com a sequência da bactéria *Herbaspirillum huttiense* e apenas o isolado **69.b** apresentou 98% de similaridade com a sequência do banco de dados pertencente à bactéria *Cupriavidus oxalaticus*.

Apesar dos altos índices de similaridade, ainda se faz necessária a realização de outros testes, para uma identificação mais precisa das espécies que os isolados pertencem, uma vez que o Blast, faz a análise das sequências de forma simplificada.

7.2.3 Sequência do gene *rpoD*

Uma vez que raramente é possível identificar as espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* apenas com o sequenciamento da região 16S *rRNA* e dada a grande quantidade de dados disponíveis para o gene *rpoD* desta espécie, a partir do mesmo DNAG do isolado 98.B foi realizada a amplificação deste gene (Figura 10).

Figura 10 – Amplicon obtido por PCR do gene *rpoD* do isolado 98.b



Fonte: HORNINK, K.R.

λ DNA: DNA intacto de fago λ DNA, do fornecedor λ (Fermentas).

DNA Ladder: 1 Kb, contendo fragmentos que variam de 10.000 pb a 250pb, foram utilizados 0,5 µl de DNA Ladder 1 Kb, na concentração de 0,5 µg/µL (Fermentas)

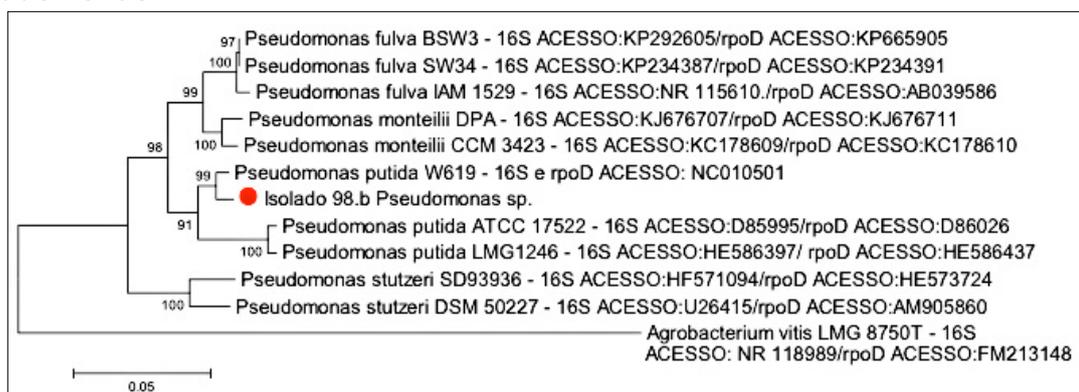
Foi realizado o sequenciamento do gene *rpoD* (Material e Métodos 6.6.2.4) do isolado 98.b. Após a análise da sequência e comparação com o banco de dados do NCBI (Material e Métodos, item 6.6.2.5), obteve-se, com a aplicação desta metodologia, o alinhamento da sequência com a bactéria *Pseudomonas sp* VLB 120 (Nº de acesso: CP003961), com “Total score”: 804, “e-value”: 0.0, “ident”: 99%, no entanto, como esta bactéria ainda não apresenta sua espécie definida, foi possível observar que o isolado apresentou semelhança também com a bactéria *Pseudomonas putida* W619 (Nº de acesso: CP000949), com “Total score”: 477, “e-value”: 7e-131, “ident”: 87%, valores baixos para uma identificação apenas com este gene, sendo necessária a realização de outras metodologias que permitam analisar esta sequência em conjunto com a região 16S.

7.2.4 Árvore fenética dos isolados bacterianos

Utilizando-se as sequências dos genes 16S rDNA dos 12 isolados obtidos, foram construídas árvores fenéticas para cada grupo de isolados. Para simplificar as análises foram construídas árvores para as bactérias pertencentes ao grupo *Pseudomonas sp* (Figura 11); *Cupriavidus sp.* e *Ralstonia sp* (Figura 12); para *Novosphingobium sp.* (Figura 13); para *Stenotrophomonas sp.* (Figura 14) e, para *Herbaspirillum sp.* (Figura 15), conforme metodologia descrita em Material e Métodos, item 6.6.2.6.

Com a finalidade de tornar a análise da árvore do isolado 98.b mais precisa e simples, as sequências do gene *rpoD*, já alinhadas foram acrescentadas ao final das sequências, também já alinhadas da região 16S, sendo possível construir a partir destes dados uma única árvore fenética contendo as informações de ambas sequências (Figura 11). As árvores obtidas com as sequências separadas podem ser observadas no item Anexos, Figuras 33 e 34.

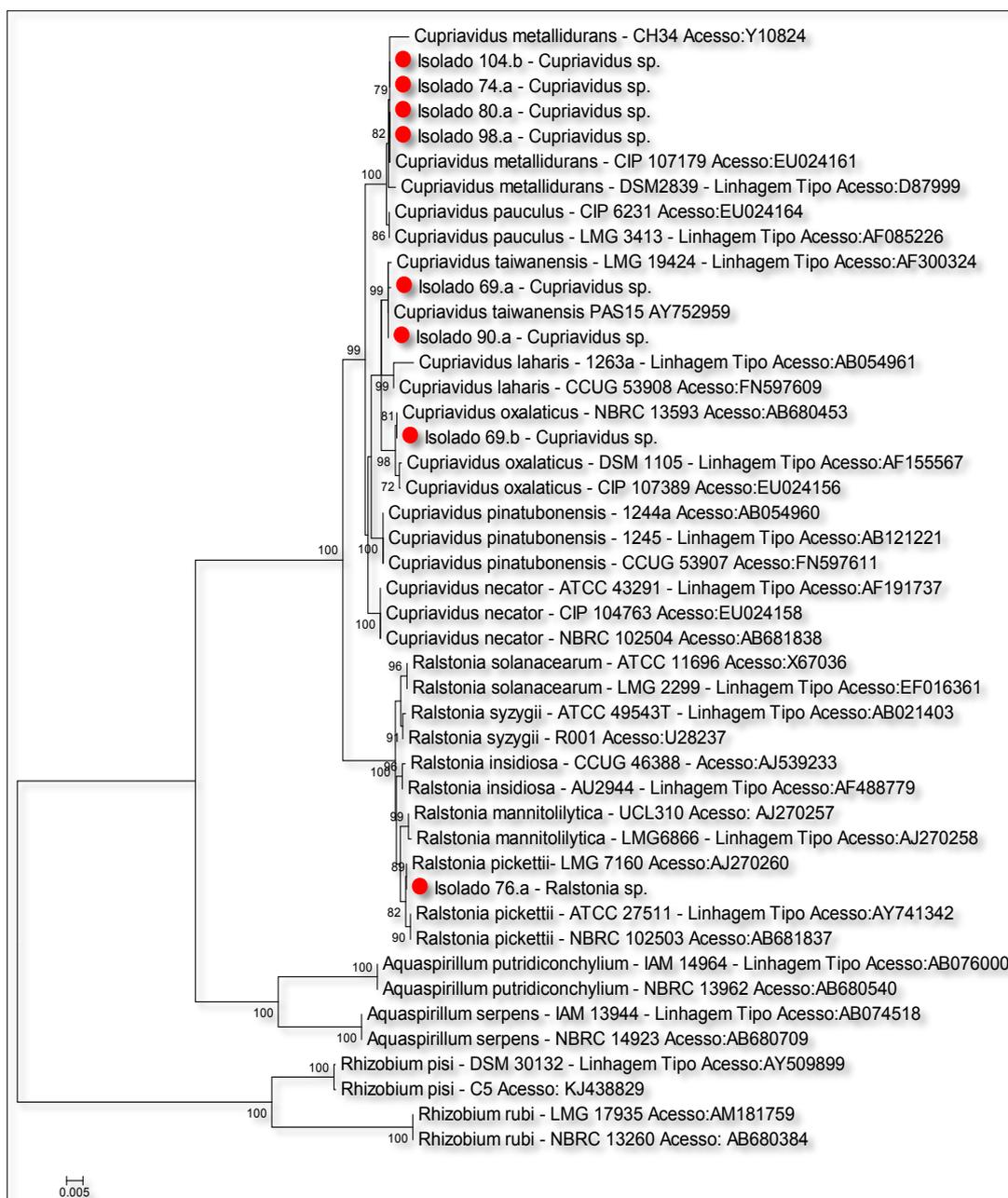
Figura 11 - Árvore fenética com base nas sequências da região 16S rRNA e do gene *rpoD* do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*



Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). A bolinha vermelha destaca o isolado.

Ao realizar a análise da Figura 11, pode-se observar que o isolado 98.b, pertence de fato ao grupo de bactérias da espécie *Pseudomonas putida*, dado o alto índice de confiabilidade do grupamento (91%).

Figura 12 - Árvore fenética com base nas sequências da região 16S das bactérias isoladas previamente identificadas como pertencentes aos gêneros *Cupriavidus* e *Ralstonia*.



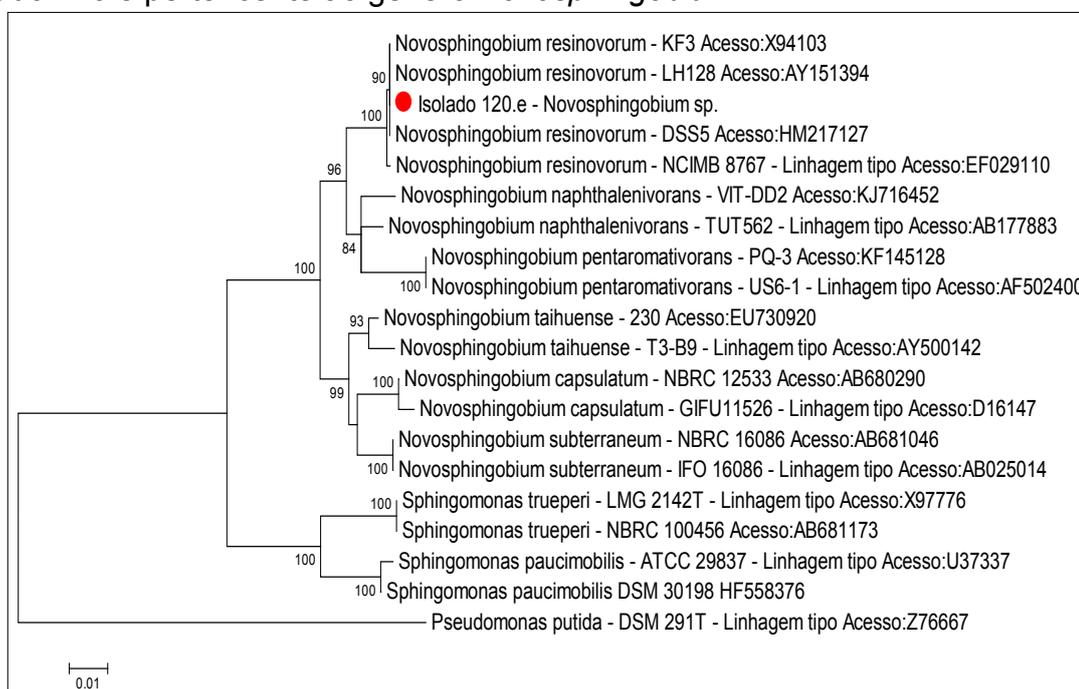
Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). As bolinhas vermelhas destacam os isolados.

Analisando-se a Figura 12 é possível notar que os índices de confiabilidade dos principais nós, mantiveram-se acima de 80%, sendo possível identificar os grupos aos quais pertencem os isolados. O índice de confiabilidade de 82% obtido no grupamento dos isolados **74.a**, **80.a**, **98.a** e **104.b** com bactérias pertencentes à

espécie *Cupriavidus metallidurans*, enquanto que o isolado **69.b** agrupou-se em 98% das vezes com as bactérias pertencentes à espécie *Cupriavidus oxalaticus*. Já os isolados **69.a** e **90.a** agruparam-se em 99% das repetições com a espécie *Cupriavidus taiwanensis* e o isolado **76.a** agrupou-se 82% das vezes com a espécie *Ralstonia pickettii*. Os altos índices de repetição dos agrupamentos nos permitem afirmar que estes microrganismos apresentam grande probabilidade de pertencerem às espécies com que se agruparam.

Observando-se os nós do dendograma apresentado na Figura 13, pode-se observar que o isolado **120.e**, apresentou 100% de confiabilidade por sempre ter sido reunido com as bactérias da espécie *Novosphingobium resinovorum*.

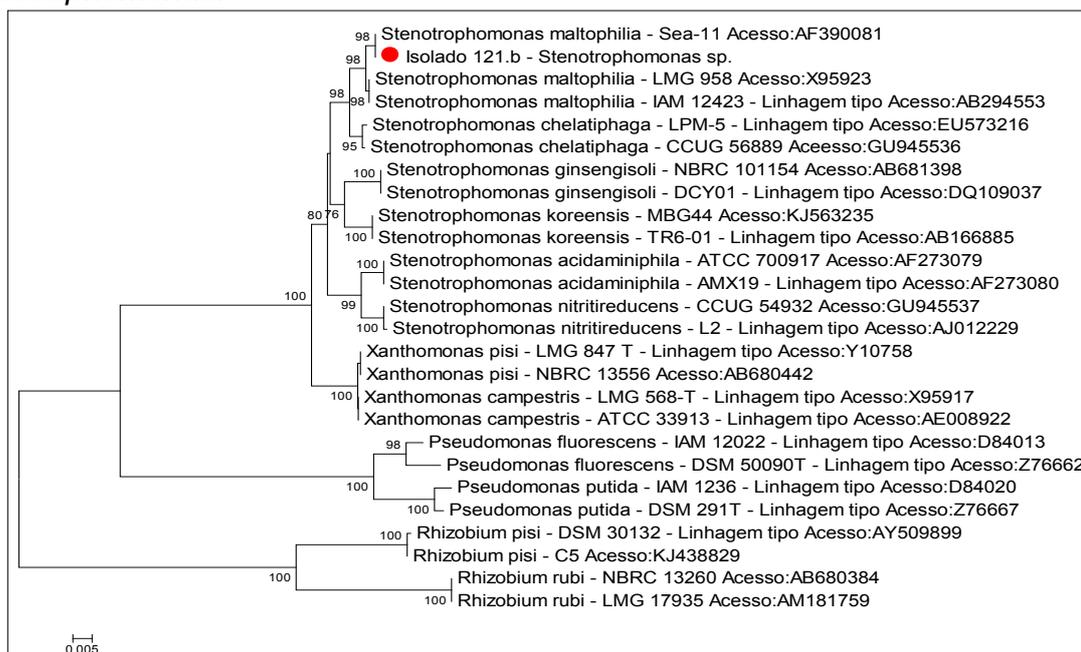
Figura 13 - Árvore fenética com base em sequências da região 16S rDNA para o isolado 120.e pertencente ao gênero *Novosphingobium*



Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). A bolinha vermelha destaca o isolado 120.e.

Também com altos índices de reprodução dos agrupamentos, o isolado **121.b** apresentou altos valores de confiabilidade, sendo igual a 98%, para o agrupamento do isolado **121.b** com as bactérias da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* (Figura 14).

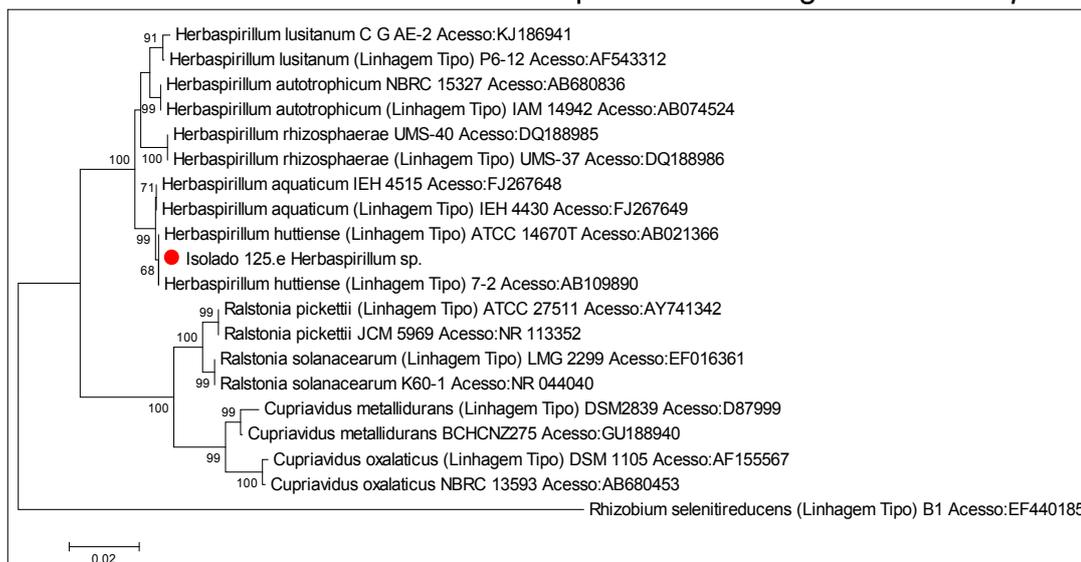
Figura 14 - Árvore fenética com base em sequências da região 16S rDNA do isolado 121.b previamente identificada como pertencente ao gênero *Stenotrophomonas*.



Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). A bolinha vermelha destaca o isolado 121.b.

O agrupamento do isolado **125.e** com a espécie *Herbaspirillum huttiense* apresentou índice igual a 68% (Figura 15), valor considerado baixo para classificar o isolado a nível de espécie, no entanto, com a somatória de todos os resultados obtidos para as diferentes técnicas aplicadas, será possível identificar de forma mais precisa este isolado.

Figura 15 - Árvore fenética com base em sequências da região 16S rDNA para o isolado 125. Previamente identificado como pertencente ao gênero *Herbaspirillum*



Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). A bolinha vermelha destaca o isolado 125.e.

7.2.5 Caracterização bioquímica dos isolados

Sabe-se que a utilização de kits de testes bioquímicos para a identificação de isolados microbianos provenientes de amostras ambientais não apresenta grande confiabilidade, uma vez que grande parte destes testes somente são adequados para a identificação de bactérias patogênicas provenientes de amostras clínicas. No entanto, tais testes ainda podem ser utilizados principalmente quando se deseja ter conhecimento das características bioquímicas destes organismos que a fim de que seja possível aprimorar suas condições de cultivo. Desta forma, no quadro a seguir (Quadro 5) são apresentados os resultados obtidos da análise dos isolados selecionados após emprego do kit API20NE. As fotos dos testes realizados estão apresentadas no item Anexos (Quadros 9 e 10; Figuras 35 a 37).

Quadro 5- Testes bioquímicos realizados com o kit API20NE, cultivo em meio com Tween 80, cultivo em ágar sangue e coloração Gram.

TESTES		ISOLADOS												
		69.a	69.b	74.a	76.a	80.a	90.a	98.a	98.b	104.b	120.e	121.b	125.e	
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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Analisando-se o Quadro 5, pode-se observar que todos os isolados apresentaram resultados negativos para produção de indol, de uréase e fermentação de glicose, além de serem todos Gram negativos. Todos apresentaram resultado positivo para a assimilação de malato. Apenas o isolado **121.b** – *Stenotrophomonas maltophilia*, teve resultado positivo para a presença de proteases, apresentou a capacidade de realizar hemólise, observada no cultivo em ágar sangue e é o único isolado incapaz de assimilar gluconato. O isolado **98.b** – *Pseudomonas putida* foi o único a apresentar resultados positivos para a presença de arginina dihidrolase.

Inserindo-se os resultados obtidos e apresentados no Quadro 5 na base de dados API-WEB, BIOMERIEUX[®], foram obtidos os dados a apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 - Resultados de testes bioquímicos das bactérias isoladas de solo, sedimento e águas coletados próximo a mina Sossego em Carajás: kit comercial API20NE, precipitação com Tween 80, padrão de hemólise, e coloração Gram.

Número do isolado	Resultado da análise com API-WEB BIOMERIEUX [®]		
	Microrganismo	Perfil API WEB	Semelhança (%)
69.a	<i>Achromobacter denitrificans</i>	1000447	67,1
69.b	<i>Alcaligenes faecalis 2</i>	10004777	59,3
74.a	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1000464	42,8
76.a	<i>Ralstonia pickettii</i>	1041455	95,1
80.a	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1000464	42,8
90.a	<i>Alcaligenes faecalis 2</i>	1000457	67,6
98.a	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1000464	42,8
98.b	<i>Pseudomonas putida</i>	0140453	99,3
104.b	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1000464	42,8
120.e	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0463751	72,9
121.b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1436341	99,9
125.e	<i>Ralstonia pickettii</i>	0045575	88,8

Observando-se os resultados apresentados no Quadro 6, pode-se notar que apenas três isolados apresentaram valores de semelhança com os dados bioquímicos das bactérias da base de dados do “kit” API20NE superiores a 90%. Para o isolado **76.a**, a semelhança bioquímica do isolado com a bactéria *Ralstonia pickettii* é de 95,1%, e confirma a identidade obtida pelas análises das proteínas de superfície com a metodologia MALDI-TOF e com as análises realizadas na sequência da região 16S rRNA. O mesmo ocorre para os isolados **98.b** – *Pseudomonas putida* e **121.b** – *Stenotrophomonas maltophilia*, os quais tiveram suas identificações obtidas com as técnicas anteriores corroboradas pelos resultados bioquímicos.

No entanto, deve-se observar que as porcentagens de semelhança obtidas para os isolados restantes, os valores obtidos foram inferiores a 90%, não sendo possível chegar a conclusões precisas sobre a identidade desses microrganismos.

Conforme mencionado no item Revisão Bibliográfica, a base de dados dos “kits” de testes bioquímicos como o API 20NE não apresenta grande confiabilidade de seus resultados para os isolados de amostras ambientais, assim, ao comparar os resultados obtidos (Quadro 5) com os esperados na literatura para isolados provenientes de amostras ambientais (Revisão Bibliográfica, Item 2.4.5, Quadro 2), pode-se obter uma comparação das características bioquímicas dos isolados mais precisa e desta forma, foi possível concluir que as bactérias isoladas de número:

- **74.a, 80.a, 98.a e 104.b** apresentam alto índice de semelhança bioquímica com a bactéria *C. metallidurans*,
- **69.a e 90.a** apresentam maior semelhança com a bactéria *C. taiwanensis*.
- **69.b** teve seus resultados mais semelhantes a *C. oxalaticus*.
- **120.e** apresenta grande semelhança bioquímica com a bactéria *Novosphingobium resinovorum*
- **125.e** assemelha-se bioquimicamente à bactéria *Herbaspirillum huttiense*.

7.2.6 Identificação dos isolados bacterianos e seleção dos mais promissores

Foi realizada a comparação dos dados resultantes das diferentes metodologias de identificação aplicadas. Na maioria dos casos, o isolado bacteriano foi identificado como pertencente ao mesmo gênero ou à mesma espécie bacteriana. Em cada caso que este fato ocorreu, isto foi interpretado como confirmação da identificação do isolado bacteriano.

Apenas para os isolados **69.a, 69.b, 90.a e 125.e**, os resultados da identificação bacteriana pela técnica MALDI-TOF, apresentados na Tabela 4, (Resultados e Discussão, item 7.2.1), foram diferentes, a nível de espécie, daqueles obtidos nas análises posteriores, o que pode ter ocorrido, especialmente devido à base de dados desta metodologia ser composta principalmente com dados provenientes de amostras clínicas.

Visto que os dados moleculares apresentam bases de dados mais consolidadas, as quais já tem sido ampliadas com dados de amostras ambientais, foram estes dados, os considerados para a identificação destes microrganismos.

Diante destes resultados, foi construída a Tabela 5, na qual é apresentada a conclusão da identificação dos isolados obtidos.

Tabela 5 – Identificação dos isolados bacterianos selecionados.

ISOLADO	ESPÉCIE BACTERIANA PROVÁVEL
69.a	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>
69.b	<i>Cupriavidus oxalaticus</i>
74.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
76.a	<i>Ralstonia pickettii</i>
80.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
90.a	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>
98.a	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
98.b	<i>Pseudomonas putida</i>
104.b	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
120.e	<i>Novosphingobium resinovorum</i>
122.b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
125.e	<i>Herbaspirillum huttiense</i>

Microrganismos com os quais houve grande semelhança entre os resultados do MALDI-TOF e sequenciamento dos genes 16S rRNA e rpoD; e, provas bioquímicas.

A identificação destes isolados empregando-se a metodologia utilizada indica com certa precisão o gênero desses isolados, e permite grande aproximação da espécie dos isolados. Todavia, ainda seriam necessários os sequenciamentos de outros genes para a total certeza das espécies às quais pertencem os isolados.

Os resultados obtidos permitem a constatação que dentre as 12 bactérias selecionadas, pelo menos 7 (58,33%) pertencem ao gênero *Cupriavidus*. Isto sugere que em ambientes altamente contaminados com metais pesados, como ocorre nos locais onde foram realizadas as coletas deste trabalho (Mina do Sossego da VALE, Canaã dos Carajás, Pará) a biodiversidade bacteriana é reduzida. Todavia, os nossos resultados são apenas indicativos desta observação, pois a estratégia de isolamento e seleção bacteriana empregada foi voltada para a escolha de bactérias resistentes a Cu²⁺, visando emprego futuro em biorremediação.

7.3 Caracterização dos isolados bacterianos selecionados

Os doze isolados bacterianos selecionados (Tabela 4) foram submetidos à mais estudos, visando a caracterização de cada um quanto ao potencial de aplicação em biorremediação e/ou bioacúmulo de cobre. Nesta etapa foram analisados:

1. Determinação mais precisa da capacidade de resistência a íons Cu^{2+} ;
2. Curvas de crescimento;
3. Capacidade de adsorção dos íons Cu^{2+} .

7.3.1 Avaliação da resistência aos íons de cobre dos isolados selecionados

Os isolados selecionados foram submetidos à avaliação de suas resistências a íons de metais tóxicos. Esta análise foi realizada pelo emprego do teste de concentração inibitória mínima (MIC). Para a realização deste teste, as bactérias isoladas selecionadas foram cultivadas em meio mínimo TSM (Material e Métodos, item 6.4), que permite que o metal permaneça biodisponível com concentrações de cloreto de cobre (CuCl_2) entre 1,5 mM a 15,0 mM.

A resistência foi constatada pela observação da turvação do meio quando este foi comparado ao meio sem inóculo bacteriano (branco). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6 e no item Anexos podem ser observadas as fotos do experimento (Quadros 11 e 12).

Tabela 6 –Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados bacterianos frente a íons Cu^{2+} .

Isolado	MIC em mM
69.a	8,50 mM
69.b	6,50 mM
74.a	15,0 mM
76.a	5,00 mM
80.a	15,0 mM
90.a	9,50 mM
98.a	15,0 mM
98.b	2,50 mM
104.b	15,0 mM
120.e	10,0 mM
122.b	12,0 mM
125.e	12,5 mM
CH34	6,50 mM

As concentrações a que as bactérias isoladas resistiram e apresentaram bom crescimento são bastante superiores às dos principais microrganismos encontrados na literatura (Tabela 1, Introdução, item 2.3). Quatro dos isolados (**74.a**, **80.a**, **98.a** e **104.b**), todos neste trabalho previamente identificados como *C. metallidurans* (Tabela 5), apresentaram MIC frente aos íons Cu^{2+} de 15 mM, mais que o dobro da resistência da bactéria mais resistente a estes íons conhecida da literatura, linhagem *C. metallidurans* CH34 (6,0 mM) (MIJNENDONCKX et al., 2013). Para controle de nossos experimentos, células de *C. metallidurans* CH34 foram cultivadas nas mesmas condições experimentais utilizadas para determinar o MIC de CuCl_2 dos isolados de estudo. A concentração mínima inibitória de Cu^{2+} de células *C. metallidurans* CH34 obtida foi de 6,5 mM. (Tabela 6). Assim, entende-se que estes isolados são fortes candidatos para serem empregados em testes de biorremediação de cobre, e-ou bioissorção de cobre e recuperação deste metal.

7.3.2 Curvas 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 microrganismo possa ser aplicado com sucesso para 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 tanto, foram construídas curvas de crescimento para um isolado representante de cada um dos gêneros de bactérias obtidos, de acordo com a metodologia apresentada em Material e Métodos, item 6.8. Para este estudo foram cinco isolados:

- **69.a:** *Cupriavidus taiwanensis* (Figura 16)
- **76.a:** *Ralstonia pickettii* (Figura 17)
- **98.b:** *Pseudomonas putida* (Figura 18)
- **120.e:** *Novosphingobium resinovorum* (Figura 19)
- **125.e:** *Herbaspirillum huttiense* (Figura 20)

As curvas de crescimento permitem avaliações relativas ao tempo necessário para emprego de cada um dos isolados em biorremediação e/ou bioacumulo. Ainda, os dados obtidos permitiram melhor embasamento para a etapa seguinte do trabalho, ou seja, a realização dos ensaios de biosorção de íons Cu^{2+} . A capacidade de biosorção de íons Cu^{2+} de cada um dos isolados bacterianos foi avaliada na fase exponencial de seu crescimento. Assim tendo-se em consideração as espécies pertencentes ao mesmo gênero, realizou-se uma curva de crescimento para um microrganismo de cada gênero.

Os isolados que produziram maior concentração de células foram **69.a** – *Cupriavidus taiwanensis* e **120.e.** – *Novosphingobium resinovorum*.

Figura 16 - Curva de crescimento do isolado 69.a, identificado como *Cupriavidus taiwanensis*.

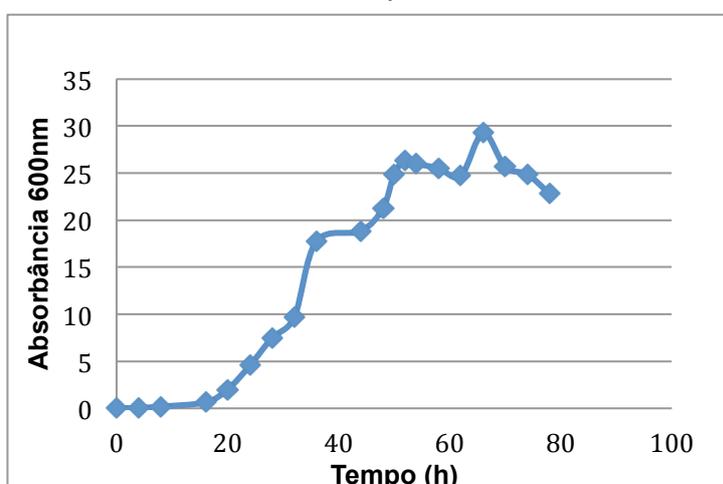


Figura 17 - Curva de crescimento do isolado 76.a, identificado como *Ralstonia pickettii*.

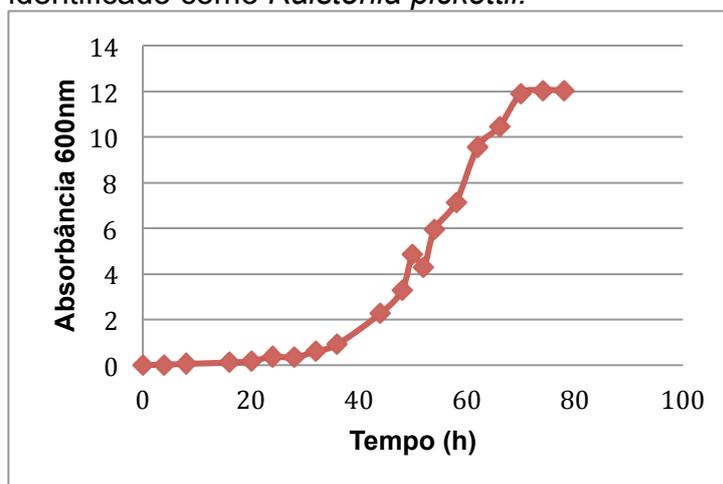


Figura 18 - Curva de crescimento do isolado 98.b, identificado como *Pseudomonas putida*.

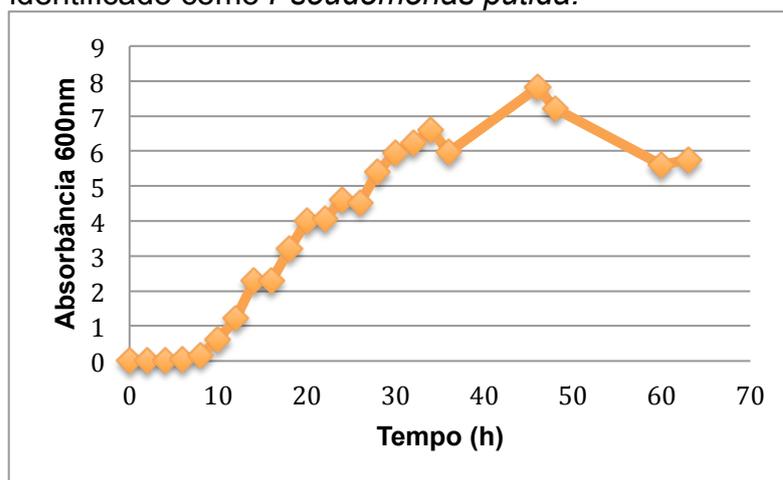


Figura 19 - Curva de crescimento do isolado 120.e, identificado como *Novosphingobium resinovorum*.

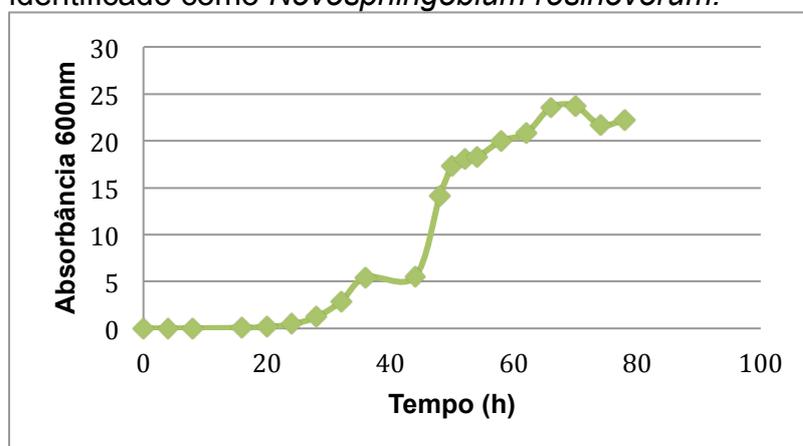
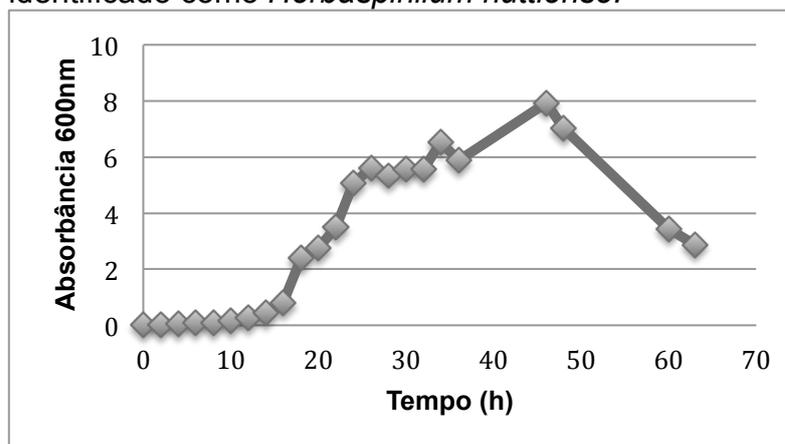


Figura 20 - Curva de crescimento do isolado 125.e, identificado como *Herbaspirillum huttiense*.



7.4 Produção de Biomassa Bacteriana

Os isolados bacterianos e a bactéria *C. metallidurans* CH34 (controle) foram cultivadas em meio mineral TSM, a 28 °C e 180 rpm (Material e Métodos, item 6.4) e após o crescimento por 24 h a massa seca foi determinada por gravimetria (Material e Métodos, item 6.9).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Massa seca de isolados bacterianos selecionados para ensaios de bioacumulo de Cu^{2+}

Bactéria	Massa Seca (g/L)
<i>C. metallidurans</i> CH34 (Controle)	3,89
69.a <i>C. taiwanensis</i>	3,59
69.b <i>C. oxalaticus</i>	5,38
74.a <i>C. metallidurans</i>	3,14
76.a <i>R. Pickettii</i>	4,72
80.a <i>C. metallidurans</i>	3,56
90.a <i>C. taiwanensis</i>	4,31
98.a <i>C. metallidurans</i>	4,50
98.b <i>P. Putida</i>	1,69
104.b <i>C. metallidurans</i>	3,12
120.e <i>N. resinovorum</i>	4,65
122.b <i>S. Maltophilia</i>	3,61
125.e <i>H. huttiense</i>	2,25

Os resultados obtidos permitem a constatação de que 5 isolados: **69.b**, **76.a**, **90.a**, **98.a** e **120.e** produzem maior que a bactéria controle *C. metallidurans* CH34.

Considerando que as condições de cultivo empregadas são as ideais para o controle e não para os isolados pode-se concluir que no quesito produção de biomassa, os isolados apresentam excelente potencial para aplicação em biorremediação ambiental ou bioacumulo de cobre.

7.5 Análise da capacidade de adsorção de (verificação de potencial)

Conhecendo-se as condições em que os microrganismos estão em fase exponencial de crescimento, foi possível realizar a análise da capacidade de bioadsorção de íons Cu^{2+} de cada um dos isolados bacterianos (Material e Métodos, item 6.10). Para a realização desta análise, faz-se necessário ressaltar que a concentração celular para todas as amostras foi a mesma de 1 g de célula/L. Para garantir que não houvesse crescimento celular durante este experimento, células foram lavadas com salina a 50% para a remoção de meio de cultivo e somente então foram incubadas em água Mili-Q acrescida de cloreto de cobre.

Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Capacidade de adsorção de íons Cu^{2+} por alguns isolados bacterianos (mg de Cu adsorvido/g biomassa seca)

Amostra	Bactéria	2h	24h
CH34	<i>C. metallidurans</i>	8,54	18,90
69.a	<i>C. taiwanensis</i>	13,12	19,20
69.b	<i>C. oxalaticus</i>	10,04	25,08
74.a	<i>C. metallidurans</i>	6,08	16,97
76.a	<i>R. pickettii</i>	10,17	11,65
80.a	<i>C. metallidurans</i>	8,78	20,72
90.a	<i>C. taiwanensis</i>	11,96	16,91
98.a	<i>C. metallidurans</i>	12,02	13,66
98.b	<i>P. putida</i>	37,98	68,85
104.b	<i>C. metallidurans</i>	8,35	11,54
120.e	<i>N. resinovorum</i>	10,40	14,31
122.b	<i>S. maltophilia</i>	7,13	29,64
125.e	<i>H. huttiense</i>	12,74	16,93

Obs.: As células bacterianas foram incubadas em solução aquosa de 2 mM de CuCl_2 , pelos intervalos de tempo 2 h e 24 h. Os isolados marcados em azul, são aqueles que apresentaram maior capacidade de adsorção de íons de cobre.

Ao se observar a Tabela 8, pode-se notar que todos os isolados apresentam adsorção do metal, e que em todos os casos um maior tempo de incubação também aumentou a quantidade de cobre adsorvida por grama de célula. Comparando os dados obtidos de capacidade de absorção de íons Cu^{2+} e os descritos na literatura, foi observado que muitos isolados apresentam um grande potencial para serem empregados no processo de biorremediação (Tabela 9).

Tabela 9 – Capacidade de adsorção de íons Cu^{2+} por alguns isolados bacterianos (mg de Cu adsorvido/g biomassa seca) obtidos neste trabalho e os descritos na literatura.

Bactéria	Cu^{+2} Sorvido (mg/g de biomassa seca)	Referência
Gênero <i>Cupriavidus</i>		
<i>C. metallidurans</i> CH34	16,25	Tunali; Çabuk; Akar (2006)
<i>C. metallidurans</i> CH34	86,78	Fan; Okayak; Rodrigues, (2014)
<i>C. metallidurans</i> CH34	18,90	Neste trabalho
<i>C. taiwanensis</i>	19,0	Chen et al., 2008
<i>C. taiwanensis</i> (69.a)	19,20	Neste trabalho
<i>C. oxalaticus</i> (69.b)	25,08	Neste trabalho
<i>C. metallidurans</i> (74.a)	16,97	Neste trabalho
<i>C. metallidurans</i> (104.b)	11,54	Neste trabalho
<i>C. metallidurans</i> (80.a)	20,72	Neste trabalho
<i>C. taiwanensis</i> (90.a)	16,91	Neste trabalho
<i>C. metallidurans</i> (98.a)	13,66	Neste trabalho
Gênero <i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> (NRRL B-255)	49,50	Uslu; Tanylol (2006)
<i>Pseudomonas putida</i>	27,6	Chen et al., 2005
<i>P. aeruginosa</i>	14,12	Langley; Beveridge (1999)
<i>P. putida</i> (98.b)	68,85	Neste trabalho
Gênero <i>Ralstonia</i>		
<i>R. pickettii</i>	38	Yang et al., 2010
<i>R. pickettii</i> (76.a)	11,65	Neste trabalho
Gênero <i>Novosphingobium</i>		
<i>N. resinovorum</i> (120.e)	14,31	Neste trabalho
Gênero <i>Herbaspirillum</i>		
<i>H. huttiense</i> (125.e)	16,93	Neste trabalho
Gênero <i>Stenotrophomonas</i>		
<i>S. maltophilia</i> (122.b)	29,64	Neste trabalho

Os isolados **69.a**, **69.b** e **80.a** do gênero *Cupriavidus* apresentaram uma capacidade de cobre sorvido maior do células de *C. metallidurans* CH34 realizadas nas mesmas condições experimentais (Tabela 9). Comparando com os valores de absorção de cobre por *C. metallidurans* CH34 obtidos por Tunali; Çabuk e Akar (2006), os isolados **69.a**, **69.b**, **74.a**, **80.a**, **90.a** apresentaram maior capacidade de biorremediação por este metal. Além disso, o isolado identificado como *C. taiwanensis* (**90.a**) apresentou maior acúmulo de Cu^{+2} em comparação ao descrito por Chen et al. (2008).

No trabalho publicado por Fan; Okayak e Rodrigues (2014) células de *Cupriavidus metallidurans* CH34 e *Ochrobactrum intermedium* Lbr apresentaram os maiores valores de absorção de cobre descritos na literatura (Tabela 9). Neste

estudo, foi verificado que houve maior acúmulo de Cu^{+2} na fase logarítmica em comparação a fase estacionária de crescimento para ambas as linhagens. Além disso, diferentes condições de pH (de 3,0 à 8,0) e temperatura (22 °C, 27 °C, 32 °C, 37 °C) foram avaliadas com o objetivo de averiguar o maior valor de cobre sorvido pelas células de *C. metallidurans* CH34 mantidas em solução salina, a 80 rpm durante 400 min (6,6 horas). As condições de pH 7,0 e temperatura de 27 °C resultaram maior sorção de cobre para esta linhagem. Por outro lado, para células de *Ochrobactrum intermedium* Lbr, as melhores condições foram de pH 6 a 37 °C (Fan; Okayak e Rodrigues 2014). Estes resultados demonstram que para cada bactéria, ou, até mesmo linhagem, a condição de cultivo influencia na absorção de cobre pelas células. Em nossos experimentos, foi realizado a curva de crescimento de cada isolado em meio mineral TSM para delimitar a fase exponencial de crescimento de cada microrganismo isolado (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20). Após a coleta das células dos diferentes isolados nesta fase, as amostras foram ressuspensas em solução salina e incubadas com íons de cobre a 28 °C \pm 1 assim como descrito por Fan; Okayak e Rodrigues (2014). Entretanto, o tempo de incubação, pH e RPM utilizados em nossos experimentos foram de 2 h e 24 h, pH 5,0 e 180 RPM diferentes das descritas por Fan; Okayak e Rodrigues (2014) contudo, semelhante com a metodologia descrita por Biondo et al. (2012). Vale ressaltar que a variação de apenas um parâmetro nas condições de cultivo torna a comparação dos dados de absorção de cobre por biomassa seca (mg/g) inadequada.

Além disso, como comentado anteriormente, que as condições dos testes de bioacúmulo apontados não incluem otimizações de processo, pois as bactérias isoladas foram cultivadas em meio ideal para o crescimento de *Cupriavidus metallidurans* CH34 descritas por Biondo et al. (2012), sem as adequações necessárias para cada espécie, como por exemplo, complementações nutricionais e ajuste de pH, condições estas que elevariam não apenas ao aumento da produção de biomassa, mas que também poderiam acarretar na elevação da adsorção dos íons de cobre pelas células.

Cabe destacar a capacidade de bioacúmulo de cobre do isolado 98.b identificado como *Pseudomonas putida* de 68,78 de Cu^{+2} Sorvido (mg/g de biomassa seca). Este valor é muito elevado em comparação aos descritos na literatura para este gênero (Tabela 9).

O isolado 122.b identificado como *Stenotrophomonas maltophilia* também apresentou alta capacidade de biorremediação 29,64 Cu^{+2} Sorvido (mg/g de biomassa seca). Não foi encontrado dados na literatura de sorção de cobre para comparação com os dados obtidos.

Neste trabalho foi padronizado um protocolo para isolar e identificar isolados bacterianos 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. Dados de MIC e sorção de cobre pelos isolados obtidos demonstraram que muitos deles apresentam grande potencial para aplicação no processo de biorremediação. Caso algum dos isolados venha a ser selecionado, deve-se ter em mente que as condições de cultivo e os processos a serem utilizados deverão ser aprimorados e o valor máximo de adsorção ($Q_{m\acute{a}x}$) deverá ser obtido, visando a obtenção de melhores resultados. Outro ponto bastante relevante deste trabalho é que estes isolados bacterianos são autóctones, de forma que não iriam interferir na biodiversidade do local.

8 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., VANECHOUTTE, 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.

ANEXOS

Tabela 10 - Detalhamento dos dados da primeira coleta Maio/2012.

Nº Atual	Nomenclatura inicial	Local	Tipo	Latitude	Longitude
1	20	Próx. a mata-terraplanagem chuva	Sedimento	06°26'19.7" S	50°05'39.6" W
3	21	Sistema de captação-barragem (amostras profundidade)	Líquida (superficial)	06°26'02.5" S	50°05'19.4" W
5	22	Sistema de captação-barragem (amostras profundidade)	Líquida (5m)	06°26'02.5" S	50°05'19.4" W
7	23	Sistema de captação-barragem (amostras profundidade)	Líquida (10m)	06°26'02.5" S	50°05'19.4" W
9	24	Sistema de captação-barragem (amostras profundidade)	Líquida (15m)	06°26'02.5" S	50°05'19.4" W
11	25	Sistema de captação-barragem (amostras profundidade)	Sedimento fundo lagoa	06°26'02.5" S	50°05'19.4" W
13	26	Lagoa do fundo da cava Sequeirinho	Líquida	06°26'02.6" S	50°05'19.4" W
15	27	Lagoa do fundo da cava Sequeirinho	Líquida	06°26'02.6" S	50°05'19.4" W
17	28	Pto de retorno p/ processo (junção lagoa barragem c/ a mina)	Líquida	06°26'12.7" S	50°05'01.9" W
19	29	Lagoa do fundo da cava Sequeirinho	Sedimento	06°26'02.6" S	50°05'19.4" W
21	30	Lixiviado da montanha de estéreis	Líquida	06°25'04.0" S	50°03'49.3" W
23	31	Lixiviado da montanha de estéreis	Sedimento	06°25'04.0" S	50°03'49.3" W
25	32	Dique do riachinho lixiviado de estéreis	Líquida	06°25'37.5" S	50°03'04.0" W
27	33	Dique do riachinho lixiviado de estéreis	Sedimento	06°25'37.5" S	50°03'04.0" W
29	34	Lagoa do dique do lixiviado de estéreis	Líquida	06°25'58.1" S	50°02'58.0" W
31	35	Lagoa do dique do lixiviado de estéreis	Sedimento	06°25'58.1" S	50°02'58.0" W
33	36	Área do resíduo de filtragem (concentrado de 30% Cu)	Areia	06°25'56.8" S	50°02'57.2" W
35	37	Resíduo de lavagem de caminhões areia/óleo	Sedimento	06°26'48.1" S	50°04'24.4" W
37	38	Limite do concentrado/Espelho d'água (praia)	Líquida	06°26'25.8" S	50°04'35.5" W
39	39	Limite do concentrado/Espelho d'água (praia)	Sedimento	06°26'25.8" S	50°04'35.5" W
41	40		Líquida	06°26'17.5" S	50°04'30.0" W

Tabela 11 - Detalhamento dos dados da segunda coleta Novembro/2012.

Nº Atual	Nomenclatura inicial	Local	Tipo	Latitude	Longitude
43	A		Sedimento	6° 26' 27.046" S	50° 1' 59.918" W
45	B		Líquida	6° 26' 25.493" S	50° 3' 4.073" W
47	C		Solo	6° 26' 24.907" S	50° 3' 4.170" W
49	D		M.O. + rocha	6° 26' 24.484" S	50° 3' 3.844" W
51	E	Saída do vertedouro	Líquida	6° 26' 23.868" S	50° 3' 2.443" W
53	F	Ao lado da saída do vertedouro	Solo	6° 26' 23.868" S	50° 3' 2.475" W
55	G		Solo	6° 26' 10.496" S	50° 2' 56.982" W
57	H		Líquida	6° 26' 2.747" S	50° 2' 56.414" W
59	I	Rejeito do processo	Sedimento	6° 26' 0.779" S	50° 5' 27.450" W
61	J	Limite espelho d' água com rejeitos	Líquida	6° 26' 0.781" S	50° 5' 26.311" W
63	L	Barragem de rejeitos	Líquida	6° 27' 58.664" S	50° 5' 26.307" W
65	M	Barragem de rejeitos	Sedimento	6° 27' 41.776" S	50° 5' 38.159" W

Tabela 12 - Detalhamento dos dados da terceira coleta Março/2013.

Nº Atual	Nomenclatura inicial	Local	Tipo	Latitude	Longitude
67	1	Cava Sossego	líquida	06° 25' 65.8" S	50° 03' 54.7" W
69	2	Perto da cava Sossego	sólida	06° 24' 47.5" S	50° 02' 37.5" W
71	3	Mata-perto da Cava Sossego	sólida	06° 24' 55.8" S	50° 02' 36.2" W
73	4	Saída do lixiviado	líquida	06° 25' 35.5" S	50° 03' 06.0" W
75	5	Saída do lixiviado	sólida	06° 25' 35.9" S	50° 03' 05.6" W
77	6	Lixiviado - perto das caixas de esgoto	sólida	06° 25' 37.5" S	50° 06' 04.0" W
79	7	Vertedouro	líquida	06° 25' 37.5" S	50° 06' 04.0" W
81	8	"lagoa" DIQ. OS-1	líquida	06° 25' 58.8" S	50° 02' 57.9" W
83	9	Ao redor da "lagoa" DIQ PS-1	sólida	06° 25' 58.8" S	50° 02' 57.9" W
85	10	Juzante DIQ PS-1	líquida	06° 26' 00.6" S	50° 02' 53.9" W
87	11	Água de processo	líquida	06° 26' 14.3" S	50° 04' 02.5" W
89	12	Saída de rejeitos - perto da pilha pulmão	sólida	06° 27' 17.2" S	50° 04' 51.8" W
91	13	Lagoa - lado oposto a usina	sólida	06° 27' 16.8" S	50° 05' 56.3" W
93	14	Lagoa-em frente a ilha	sólida	06° 26' 19.5" S	50° 05' 38.8" W
95	15	Mesmo local da amostra 14	líquida	06° 26' 19.5" S	50° 05' 38.8" W
97	16	Amostra de rejeito superficial	sólida	06° 26' 00.5" S	50° 05' 27.3" W
99	17	Captação de água para humectação	líquida	06° 25' 44.7" S	50° 05' 11.8" W
101	18	Ponto de captação da barragem - lagoa	líquida	06° 25' 59.5" S	50° 04' 18.2" W
103	19	Lado oposto ao lançamento de rejeito	líquida	06° 26' 51.6" S	50° 04' 48.2" W

Tabela 13 - Detalhamento dos dados da quarta coleta Maio/2013.

Nº Atual	Nomenclatura inicial	Local	Tipo	Latitude	Longitude
105	1	Mata de Sossego	solo	06° 25' 33" S	50° 02' 0" W
107	2	Mata de Sossego (ponto novo)	solo	06° 24' 40.8" S	50° 02' 57.2" W
109	3	Cava	líquida	06° 25' 05.8" S	50° 03' 53.3" W
111	4	Saída do lixiviado	líquida	06° 25' 36.0" S	50° 03' 05.5" W
113	5	Saída do lixiviado	sólida	06° 25' 36.0" S	50° 03' 05.5" W
115	6	lixiviado - perto das caixas de esgoto	sólida	06° 25' 36.5" S	50° 03' 05.5" W
117	7	Vertedouro	líquida	06° 25' 37.5" S	50° 03' 03.7" W
119	8	"lagoa" DIQ. OS-1	sólida	06° 25' 58.1" S	50° 02' 58.1" W
121	9	Ao redor da "lagoa" DIQ PS-1	líquida	06° 25' 58.8" S	50° 02' 57.8" W
123	10	Juzante DIQ PS-1	sólida	06° 25' 58.8" S	50° 02' 57.8" W
125	11	Rejeito de barragem	líquida	06° 26' 00.5" S	50° 02' 53.8" W

Figura 21 - Resultado e perfil protéico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 69.a

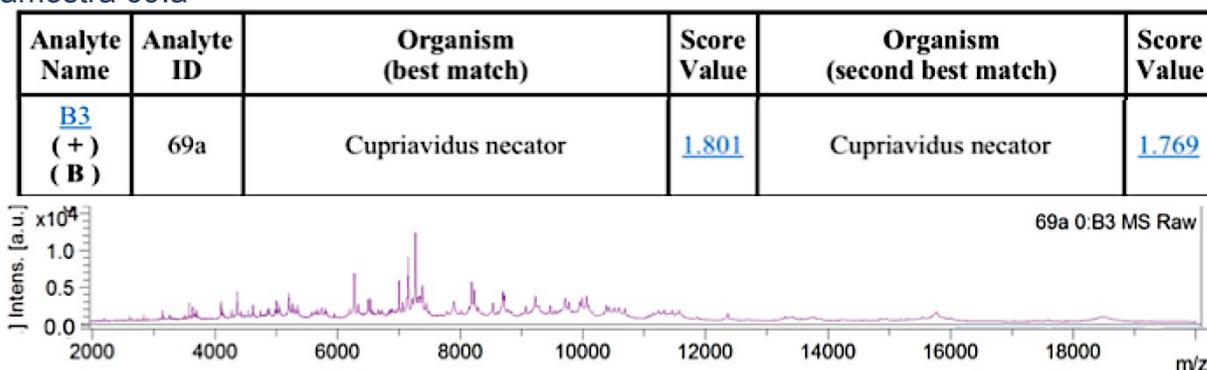


Figura 22 - Resultado e perfil protéico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 69.b

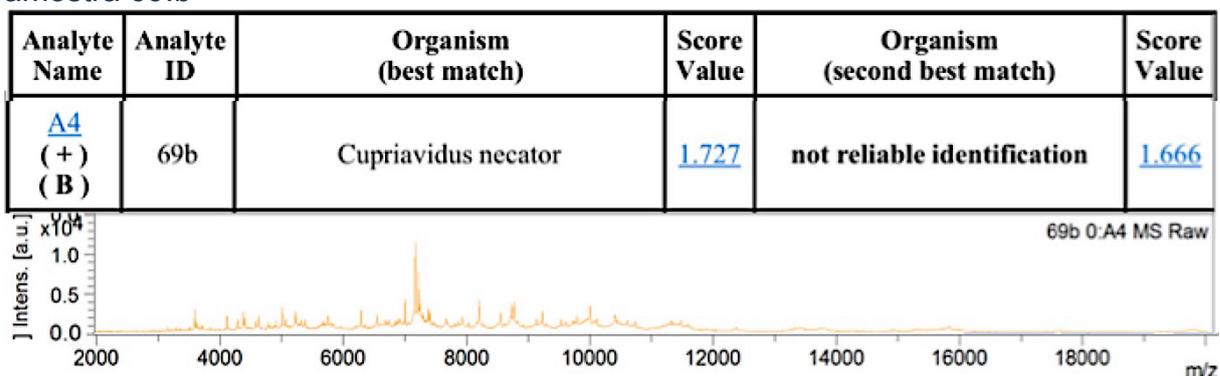


Figura 23 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 74.a

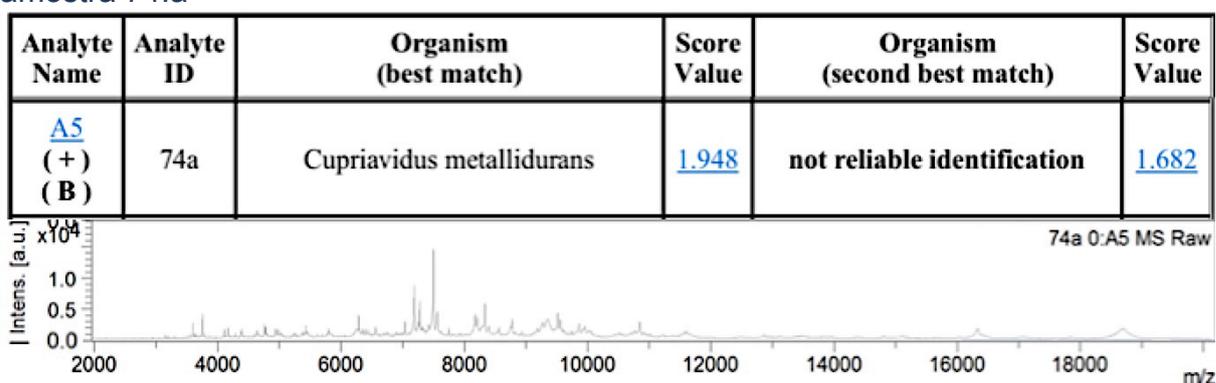


Figura 24 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 76.a

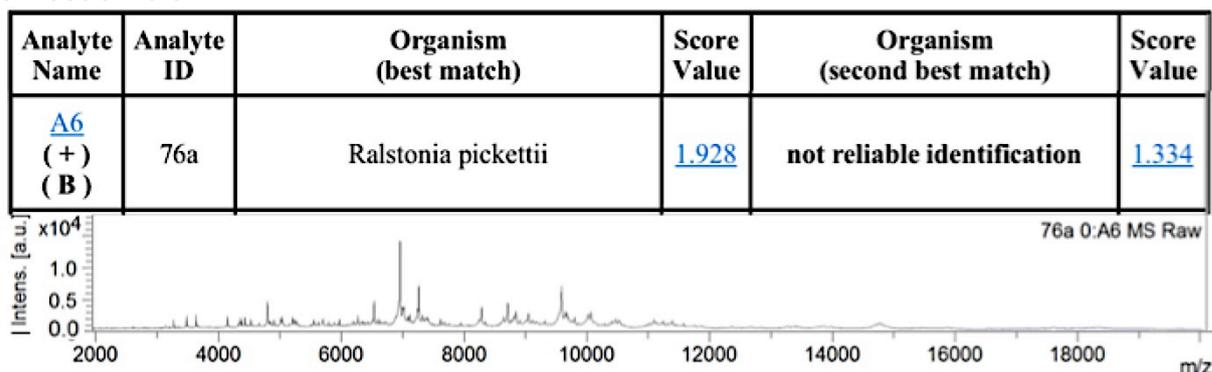


Figura 25 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 80.a

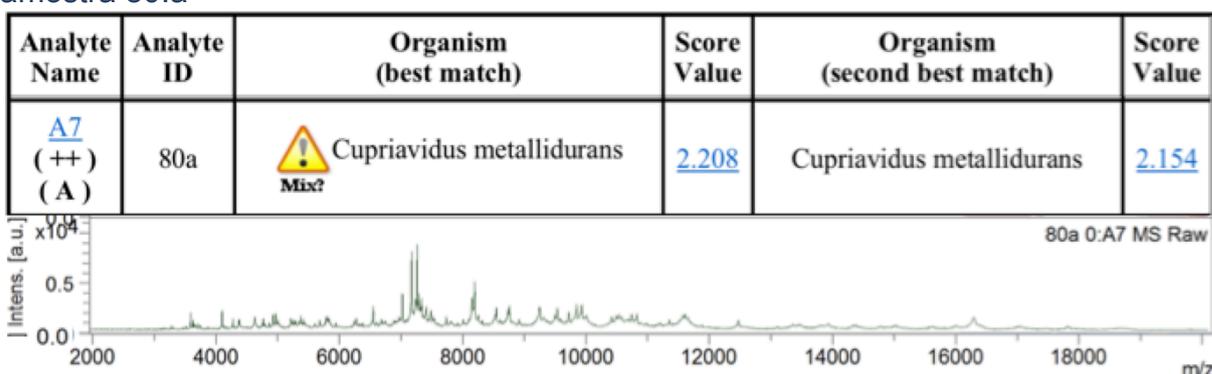


Figura 26 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 90.a

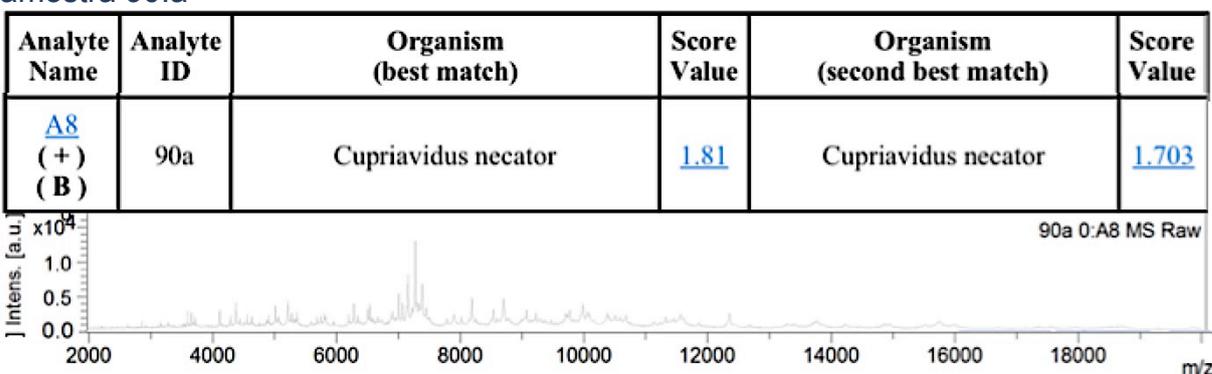


Figura 27 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 98.a

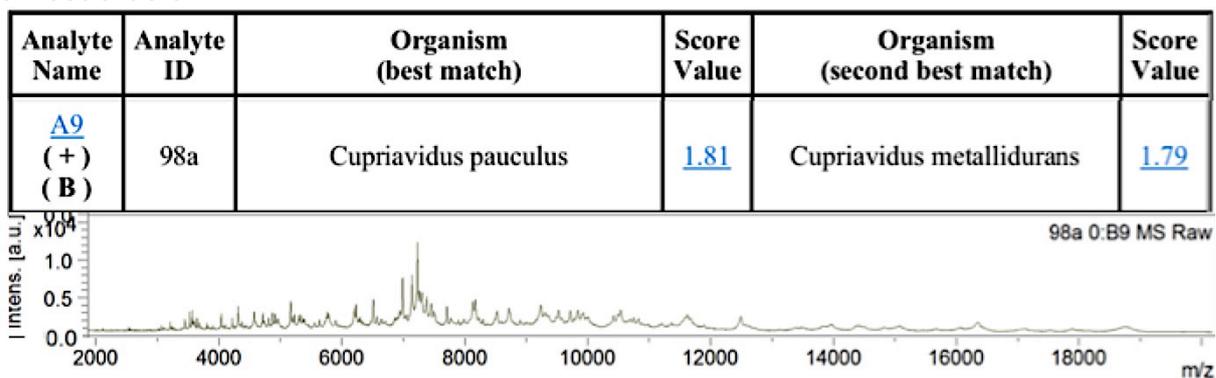


Figura 28 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 98.b

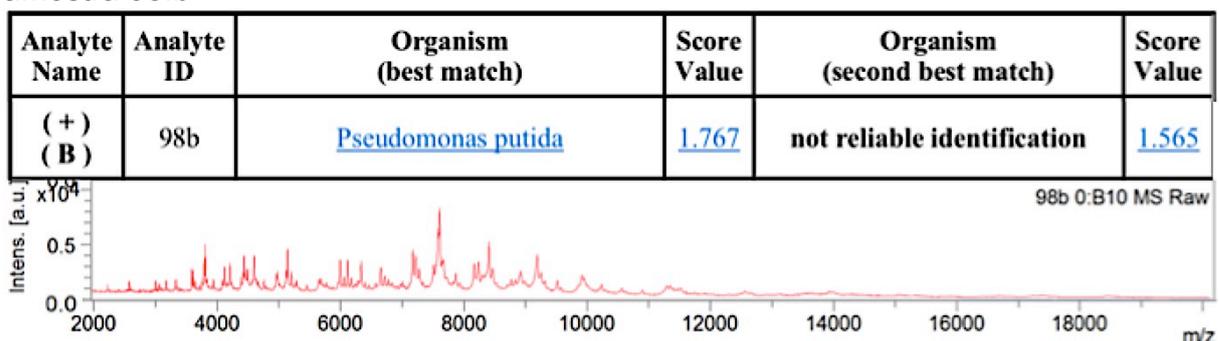


Figura 29 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 104.b

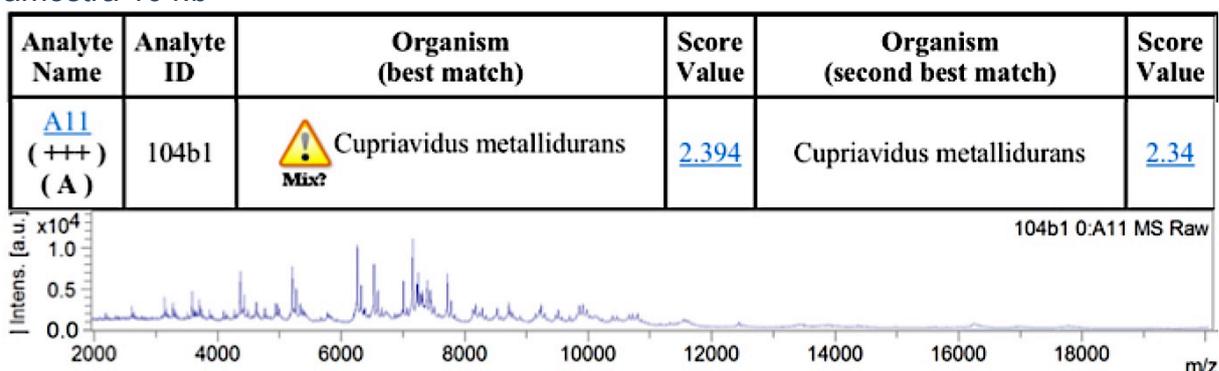


Figura 30 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 120.e

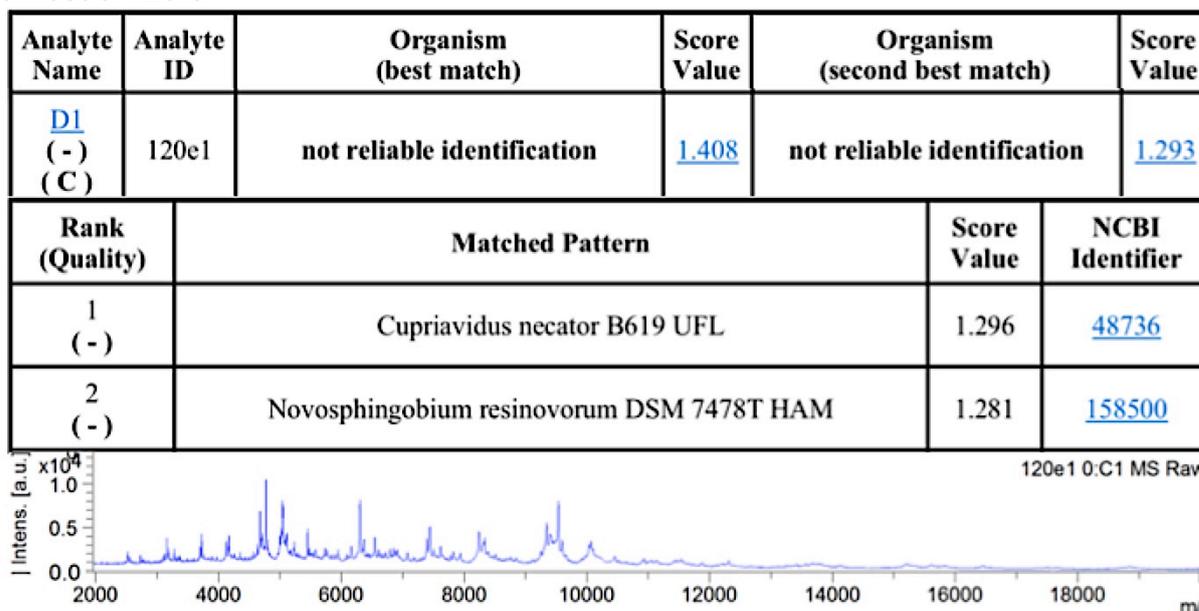


Figura 31 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 122.b

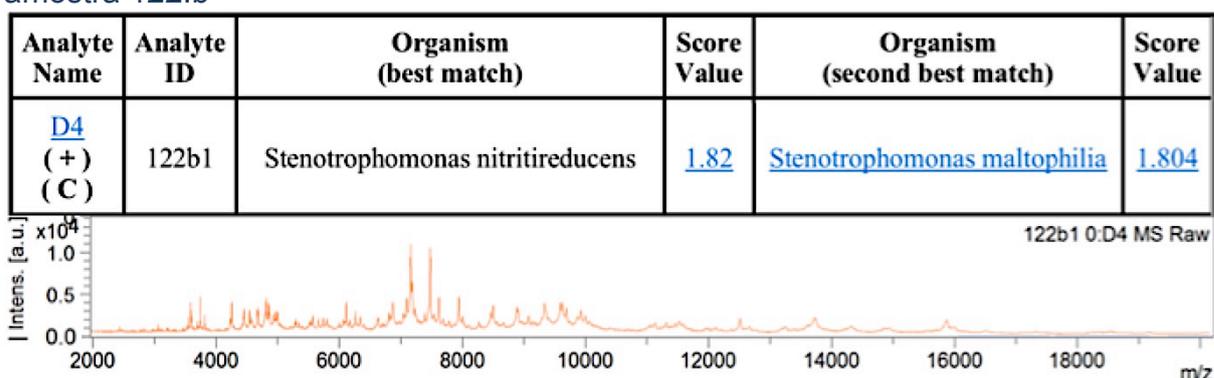


Figura 32 - Resultado e perfil proteico gerado pela análise de MALDI-TOF da amostra 125.e

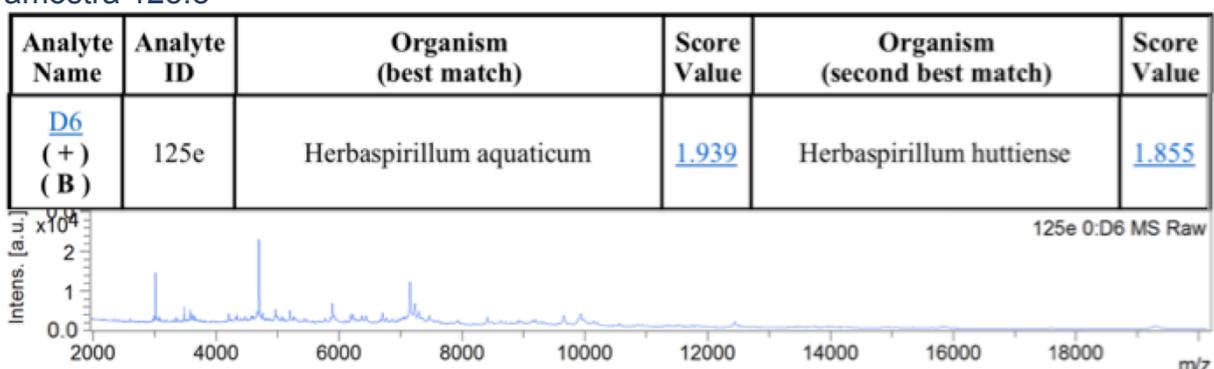
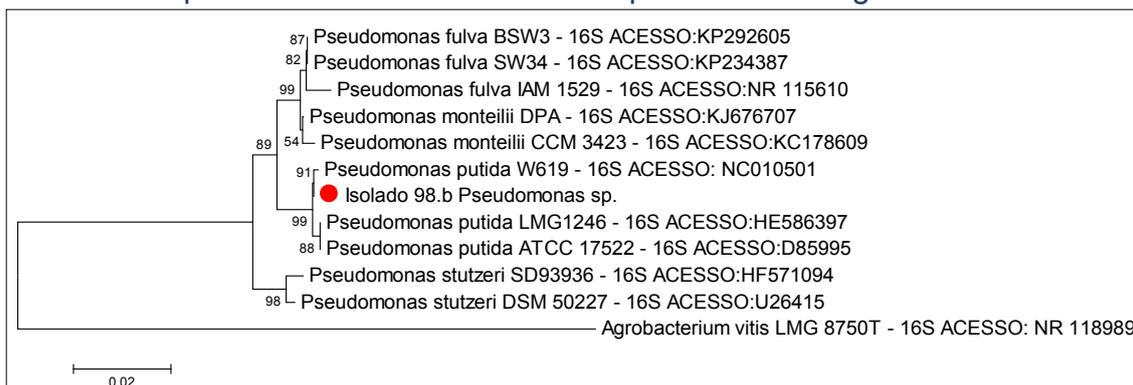
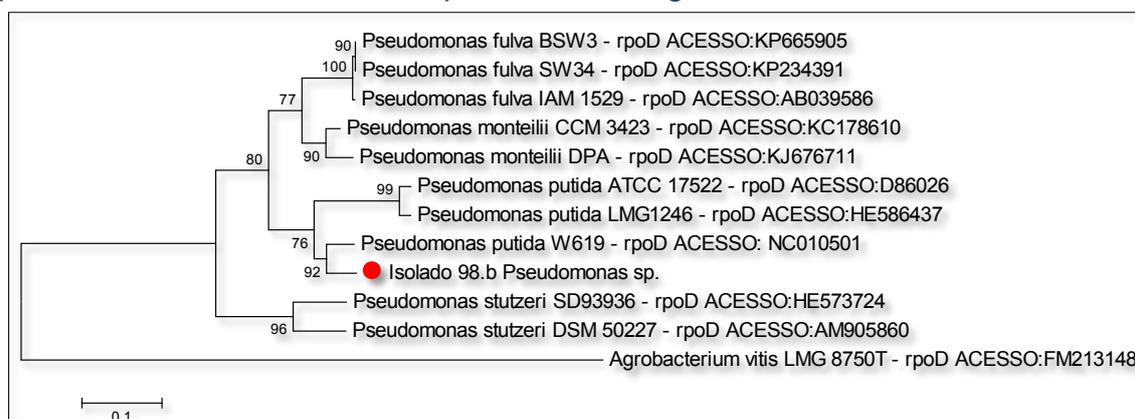


Figura 33 - Árvore fenética com base nas sequências da região 16S *r*RNA do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*



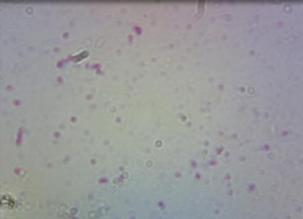
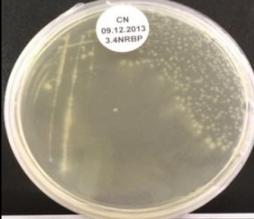
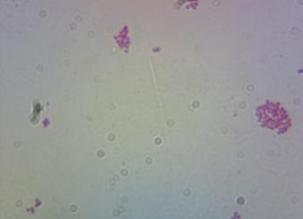
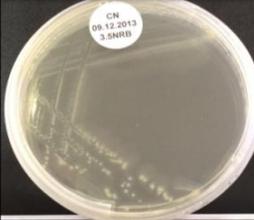
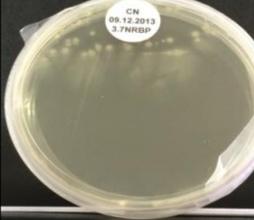
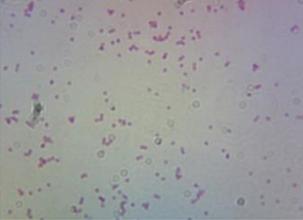
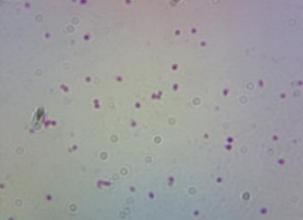
Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). As bolinhas vermelhas destacam os isolados.

Figura 34 - Árvore fenética com base nas sequências do gene *rpoD* do isolado 98.b previamente identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*



Obs.: Dendograma construído empregando-se a metodologia “neighbour-joining”. As distâncias foram calculadas pelo modelo de “Jukes-Cantor, sendo que a barra de escala indica a distância gênica de 0.005. Foi realizado o teste de robustez “Bootstrap” com 1000 replicações. O número próximo dos nós indica a porcentagem obtida (apenas aquela acima de 60%). As bolinhas vermelhas destacam os isolados.

Quadro 7 - Imagens das características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados de 69.a até 90.a.

ISOLADO	CONCLUSÃO (MALDI + 16S + Características Bioquímicas)	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
69.a	<i>Cupriavidus sp</i>		
69.b	<i>Cupriavidus sp</i>		
74.a	<i>Cupriavidus sp</i>		
76.a	<i>Ralstonia pickettii</i>		
80.a	<i>Cupriavidus sp</i>		
90.a	<i>Cupriavidus sp</i>		

Quadro 8 - Imagens das características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados de 98.a até 125.e.

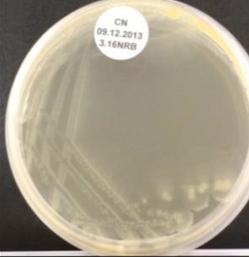
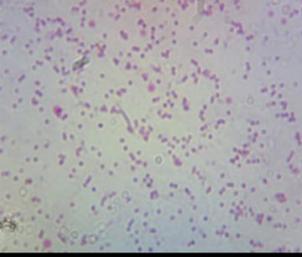
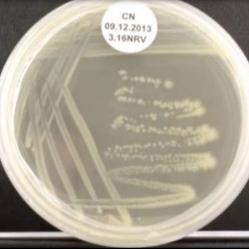
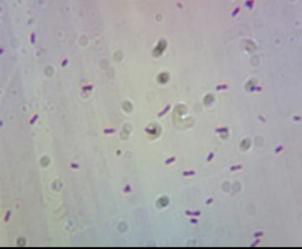
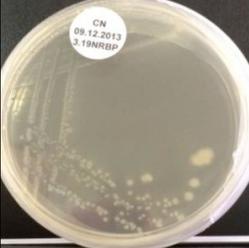
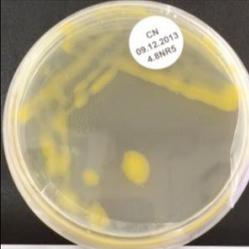
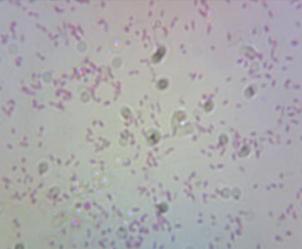
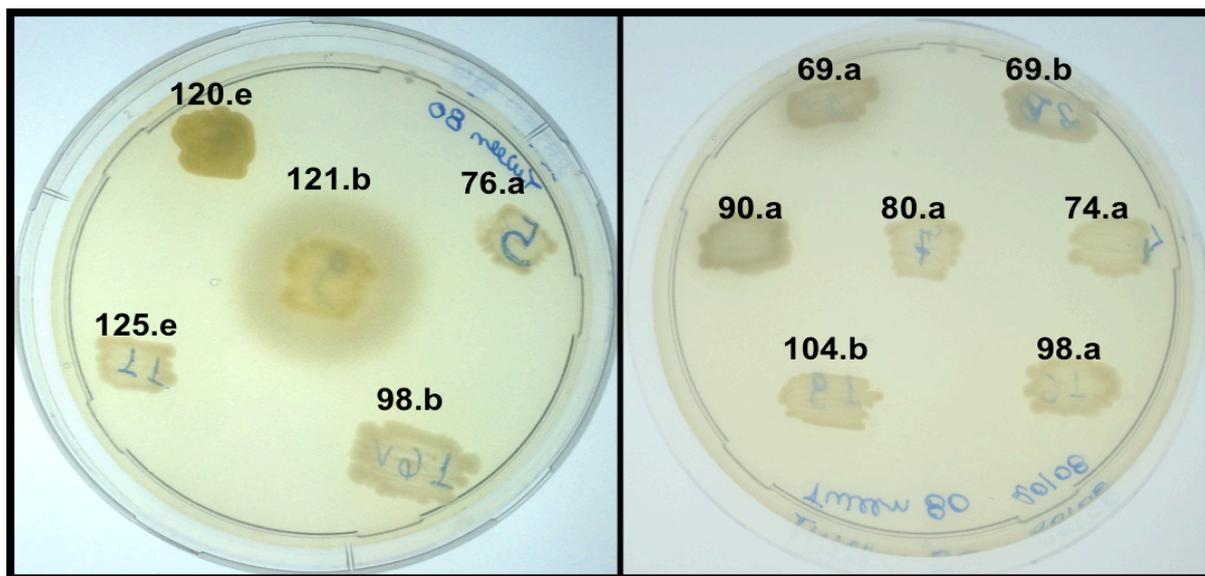
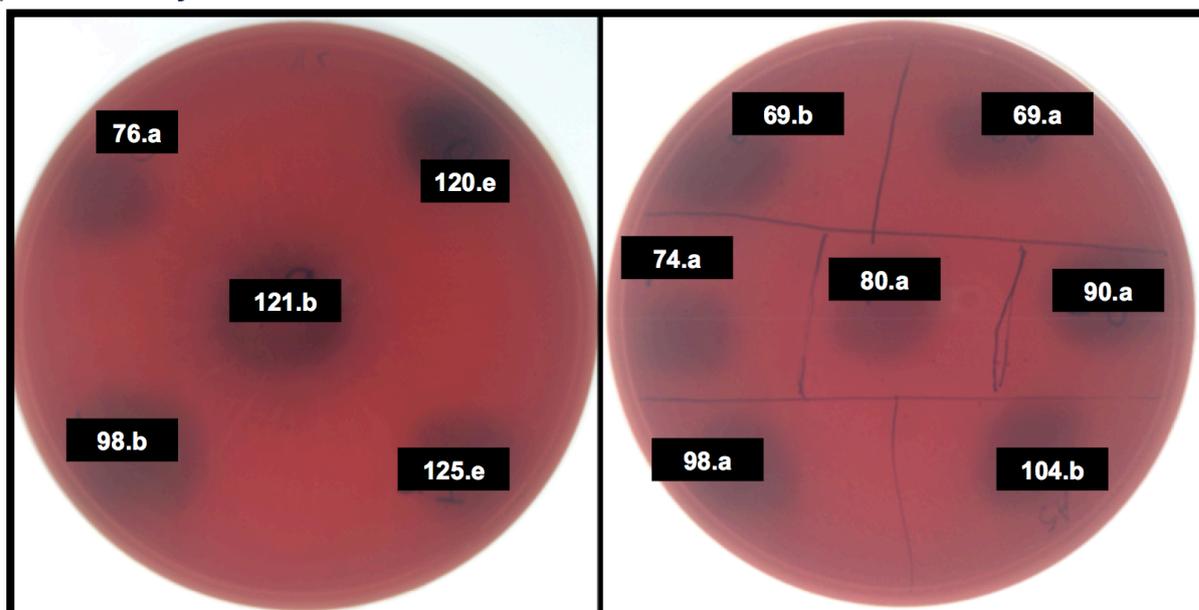
ISOLADO	CONCLUSÃO (MALDI + 16S+ Características Bioquímicas)	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
98.a	<i>Cupriavidus sp</i>		
98.b	<i>Pseudomonas sp</i>		
104.b	<i>Cupriavidus sp</i>		
120.e	<i>Novosphingobium sp</i>		
121.b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
125.e	<i>Herbaspirillum huttiense</i>		

Figura 35 – Imagens do crescimento das colônias em meio TSM acrescido de Tween 80.



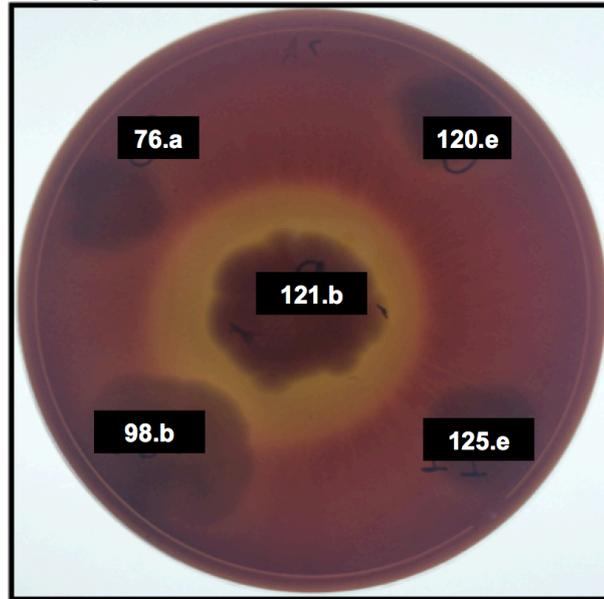
Obs: Foi possível observar a precipitação de Tween 80 apenas para os isolados 69.a, 90.a e 121.b.

Figura 36 - Imagens do crescimento dos isolados em meio Ágar Sangue, após 48h para verificação de hemólise.



Obs: Foi possível observar a formação de halo proveniente de hemólise apenas para o isolado 121.b.

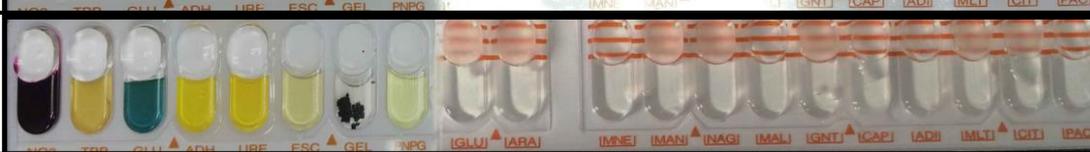
Figura 37 - Imagem do crescimento dos isolados em meio Ágar Sangue, após 96h para confirmação da formação do halo do isolado 121.b.



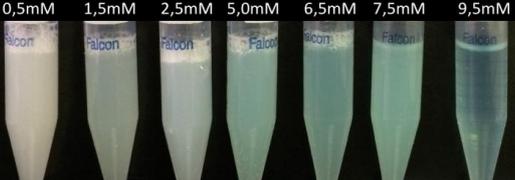
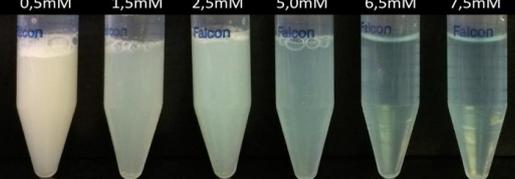
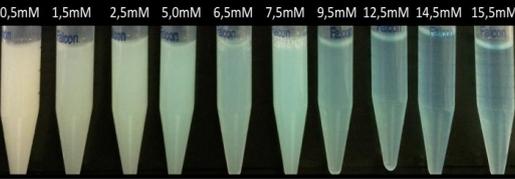
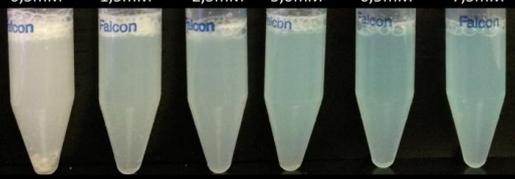
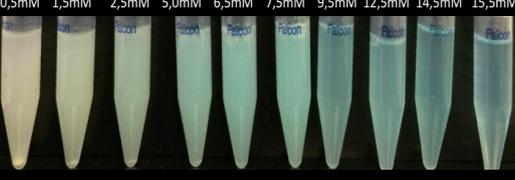
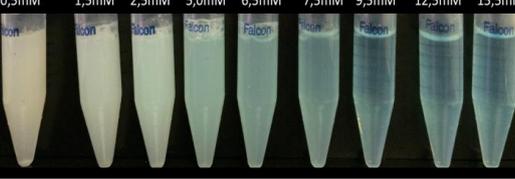
Quadro 9 - Imagens dos resultados KIT API 20NE para os isolados de 69.a até 90.a.

ISOLADO	RESULTADO DO KIT API 20NE																			
69.a	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC
69.b	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC
74.a	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC
76.a	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC
80.a	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC
90.a	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC

Quadro 10 - Imagens dos resultados KIT API 20NE para os isolados de 98.a até 125.e.

ISOLADO	RESULTADO DO KIT API 20NE																			
98.a																				
98.b																				
104.b																				
120.e																				
121.b																				
125.e																				

Quadro 11 – Imagens dos resultados do teste de mínima concentração inibitória dos isolados 69.a até 90.a.

ISOLADO	CONCLUSÃO (MALDI + 16S + Características Bioquímicas)	RESULTADO DO TESTE DE MÍNIMA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
69.a	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 69.a</p>  <p>0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM</p>
69.b	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 69.b</p>  <p>0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM</p>
74.a	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 74.a</p>  <p>0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 14,5mM 15,5mM</p>
76.a	<i>Ralstonia pickettii</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 76.a</p>  <p>0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM</p>
80.a	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 80.a</p>  <p>0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 14,5mM 15,5mM</p>
90.a	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 90.a</p>  <p>0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 15,5mM</p>

Quadro 12 - Imagens dos resultados do teste de mínima concentração inibitória dos isolados 98.a até 125.e

ISOLADO	CONCLUSÃO (MALDI + 16S + Características Bioquímicas)	RESULTADO DO TESTE DE MÍNIMA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
98.a	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 98.a</p> <p style="text-align: center;">0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 14,5mM 15,5mM</p> 
98.b	<i>Pseudomonas sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 98.b</p> <p style="text-align: center;">0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 14,5mM 15,5mM</p> 
104.b	<i>Cupriavidus sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 105.b</p> <p style="text-align: center;">0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 14,5mM 15,5mM</p> 
120.e	<i>Novosphingobium sp</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 120.e</p> <p style="text-align: center;">0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 15,5mM</p> 
121.b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 121.a</p> <p style="text-align: center;">0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 10,0mM 12,5mM 15,5mM</p> 
125.e	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	<p style="text-align: center;">Isolado 125.e</p> <p style="text-align: center;">0,5mM 1,5mM 2,5mM 5,0mM 6,5mM 7,5mM 9,5mM 12,5mM 15,5mM</p> 