LOUISE HASE GRACIOSO

**Caracterização da comunidade bacteriana de uma área de
processamento de cobre e estudo do mecanismo de resistência
a este metal**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto Butantan e
Instituto de Pesquisas Tecnológicas para
obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2017

LOUISE HASE GRACIOSO

**Caracterização da comunidade bacteriana de uma área de processamento
de cobre e estudo do mecanismo de resistência a este metal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dr(a). Elen Aquino Perpetuo

Versão corrigida. A versão original eletrônica,
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
da USP (BDTD).

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Hase Gracioso, Louise
Caracterização da comunidade bacteriana de uma
área de processamento de cobre e estudo do
mecanismo de resistência a este metal / Louise
Hase Gracioso; orientadora Elen Aquino Perpetuo. --
São Paulo, 2017.
103 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vale. 2. Metagenômica. 3. Resistência. 4.
Cobre. 5. Proteômica. I. Aquino Perpetuo, Elen ,
orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Louise Hase Gracioso

Título da Tese: Caracterização da comunidade bacteriana de uma área de processamento de cobre e estudo do mecanismo de resistência a este metal

Orientador(a): Dra. Elen Aquino Perpetuo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

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 Nº **654/14** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização da comunidade bacteriana de uma área de processamento de cobre e identificação do mecanismo a metais pesados*" sob a responsabilidade de **Louise Hase Gracioso**, 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 nº466 de 2012.

São Paulo, 29 de abril de 2014.

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

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

Dedico aos meus pais Eliana e Antonio que tanto me auxiliaram com paciência, amor e companherismo!

Agradecimentos

Todas as vezes que venço uma etapa na minha vida e principalmente na carreira profissional, sinto o profundo desejo de agradecer. Foram longos 4 anos, numa etapa que tive horas de alegria, horas de ansiedade a cada amostra, a cada resultado, mas cheguei até aqui.

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde mental e física possibilitando que realizasse essa tese, desde a iniciação até a finalização deste trabalho.

Agradeço a minha família; aos meus pais que sempre me apoiaram, me auxiliaram, me deram conselhos, aguentando meu estresse durante todo periodo e me incentivando sempre, sem eles eu nada seria. E não poderia deixar de falar também das minhas irmãs Larissa, Ludmilla e Livy que acompanharam todo esse processo, elas fazem parte do meu alicerce, me ajudando diariamente a enfrentar as dificuldades da vida, tanto pessoal, como profissional. Aos meus sobrinhos Bruno, Barbara, Maria Eduarda e João Luiz, agradeço imensamente todo o carinho e todas as risadas dadas nos momentos de estresse, angústia, principalmente quando estava distante. Ao meu sobrinho Arthur que mesmo tão pequeno foi essencial, me mostrando que a felicidade pode existir até com uma surpresa tão inesperada. E não menos importante agradeço aos meus cunhados Marcio, Rodrigo e Vagner por todas vezes que me ajudaram tanto a distrair, principalmente nas horas mais cruciais.

Agradeço a minha orientadora Elen Aquino, por ter me dado a oportunidade de crescer profissionalmente, desde a Iniciação Científica e continuar me acompanhando até hoje. Obrigada por todas as conversas, orientações e inclusive puxões de orelhas. Com toda certeza, sem você eu não teria chegado onde cheguei!

Obrigada ao pesquisador e grande amigo Bruno Karolski por sempre teimar comigo e disso sair grandes ideias e soluções para os problemas. Obrigada, também por todas as risadas e descontração dentro e fora dos laboratórios.

Obrigada as minhas grandes amigas Marcela, Ingrid, Letícia e Felipe por sempre estarem comigo em todos os momentos, pela força dentro e fora do Cepema, e nos laboratórios. Com vocês eu ri, chorei e enfrentei todos os obstáculos presentes durante esses quatro anos.

Não posso esquecer também dos meus amigos da Galera +ou- (Livy, Vagner, Hallyçom, Japa, Cid, Vó, Dani, Mama, Tiziu e Lê- Christus) meu muito obrigada! Estiveram sempre presentes me fazendo rir e esquecer das dificuldades.

Agradeço a todos do laboratório do Cepema: Nilson, Raphaela, Luciano, Renata que sempre ajudaram na realização do meu Doutorado com as análises ou com os momentos de descontração, como os almoços tão divertidos. Agradeço também ao pessoal do laboratório em São Paulo: Anita, Meiriellen, Lidianne pelo auxílio nas análises e ao Hugo por estar sempre disposto a ajudar. Agradeço ao professor Claudio Oller e ao novo coordenador do CEPEMA Jorge Tenório pela infra-estrutura laboratorial.

Agradeço ainda ao BNDES e a Vale pelo financiamento do projeto que possibilitou a melhoria na infra-estrutura, a compra de material para o desenvolvimento da pesquisa e também a coleta das amostras na mina de Sossego.

Agradeço também a Profa. Debora Rodrigues pela oportunidade, fora do Brasil assim me proporcionando uma grande experiência de aprender novas técnicas em seu laboratório na Universidade de Houston, e também aperfeiçoando o inglês. Pude, ainda, conhecer pessoas incríveis que me ajudaram tanto nesta fase: Rodrigo, Hang, Pasan, Enrico, Jing-Jing, Iya, Mary meu muito obrigada!

Agradecimento a agência de fomento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–**FAPESP**, pela concessão da bolsa de Doutorado (**processos 2013/11020-2**) e da bolsa BEPE (**2015/18089-3**), sem as quais seria praticamente impossível a conclusão da presente tese no formato que ela foi desenvolvida.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone Beauvoir

RESUMO

GRACIOSO, L. H. **Caracterização da comunidade bacteriana de uma área de processamento de cobre e estudo do mecanismo de resistência a este metal.** 2017. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O conhecimento da diversidade microbiana ambiental constitui um objeto de grande valor para o desenvolvimento de processos biotecnológicos para a recuperação de áreas degradadas e contaminadas com compostos tóxicos e recalcitrantes, pois muitas espécies de micro-organismos são capazes de degradar ou auxiliar na transformação de tais substâncias. Utilizando-se da técnica de metagenômica é possível fazer a correta avaliação da diversidade bacteriana presentes em seus ambientes naturais. Este trabalho visou caracterizar a diversidade bacteriana presente em uma área de mineração de cobre. Os resultados obtidos pela metagenômica mostraram que o filo mais abundante das bactérias classificadas foi o proteobacteria e 66% deste filo apresentou como classe mais representativa a Betaproteobacteria. Entre tantos fatores que afetam a comunidade bacteriana, foi possível ver neste trabalho que o pH e a concentração de cobre foram influenciadores. A diversidade de bactérias encontradas no solo de fora da mina mostrou-se diferente daquele encontrado dentro da mina, mostrando que a ação da mineração poderia ter modificado a comunidade microbiana nativa do local. 21 bactérias foram isoladas das amostras coletadas na mina de Sossego, destas 21, 11 foram utilizadas para o estudo da presença do gene de resistência ao cobre *cop*. 54% das bactérias estudadas tiveram a amplificação deste gene. Na tentativa de elucidar o mecanismo de resistência ao cobre presente nos isolados, foram escolhidas 2 cepas resistentes a altas concentrações de cobre: *Acinetobacter* sp. e *Enterobacter* sp. Os resultados de proteômica mostraram que as duas cepas possuem mecanismos diferentes de resistência. *Acinetobacter* sp. teve a expressão de duas proteínas CopA e CopB em diferentes condições de cultivos (200 ppm de cobre 6 h de cultivo; 200 ppm e 24 h de cultivo e 72 h de cultivo em 450 ppm de cobre). Com esses resultados foi possível elucidar que esta cepa tem o mesmo mecanismo de resistência encontrado em *Enterococcus hirae*, onde a proteína CopA tem como função o influxo de cobre e a proteína CopB o efluxo do excesso de cobre intracelular. Já a bactéria *Enterobacter* sp. teve expressão apenas de proteínas de membranas e nenhuma proteína propriamente conhecida como de resistência à cobre. Este resultado foi corroborado por técnica de PCR, no qual não houve expressão para esse gene. Possivelmente as proteínas de membrana externa estão responsáveis pela homeostase do cobre realizada por esta cepa.

Palavras-chaves: Bioprospecção. Metagenômica. Resistência ao cobre. Proteômica.

ABSTRACT

GRACIOSO, L. H. **Characterization of bacterial community of a copper processing area and study of the mechanism of resistance to this metal.** 2017. 103 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The knowledge of environmental microbial diversity constitutes an object of great value to the development of biotechnological processes for the recovery of degraded areas and contaminated with toxic and recalcitrant compounds, because many species of microorganisms are able to degrade or assist in the processing of such substances. Using the metagenomics technique, it is possible to make the correct assessment of the bacterial diversity present in their natural environments. This work aimed to characterize the bacterial diversity present in a copper mining area. The results obtained by metagenomics showed that the most abundant phylum of bacteria classified was the proteobacteria and 66% of this phylum presented as more representative the class Betaproteobacteria. Among the many factors affecting the bacterial community, it was possible to see in this work that the pH and the concentration of copper were influencers. Diversity of bacteria found in soil outside the mine proved to be different from the one found inside the mine, showing that mining action could have modified the native microbial community site. 21 bacteria were isolated from samples collected in the Sossego mine, these 21 bacteria, 11 were used to study the presence of the gene for resistance to copper *cop*. 54% of the bacteria studied had this gene amplification. To elucidate the mechanism of resistance to copper present in isolated, 2 were selected strains resistant to high concentrations of copper: *Acinetobacter* sp. and *Enterobacter* sp. Proteomics results showed that both strains have different mechanisms of resistance. *Acinetobacter* sp. strain had the expression of two proteins and CopB Cup under different conditions of crops (200 ppm of 6:00 cultivation covers; 200 ppm and 12:00 am from cultivation and 72 h of cultivation in 450 ppm copper). With these results, it was possible to elucidate that this strain has the same mechanism of resistance found in *Enterococcus hirae*, where CopA protein as the influx and efflux of CopB protein excess intracellular copper. Already the bacterium *Enterobacter* sp. had only membrane protein expression and no actual protein known as resistance to copper. This result was corroborated by PCR technique, in which there was no expression of this gene. Possibly the outer membrane proteins are responsible for homeostasis of copper held by this strain.

Keywords: Bioprospection. Metagenomics. Copper resistance. Proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo do operon cop e homeostase do cobre em <i>E. hirae</i>	32
Figura 2 - Homeostase de cobre em <i>E. coli</i>	34
Figura 3 - Tipos de proteômicas e suas aplicações na biologia.	36
Figura 4 - Mapa de localização da lagoa de rejeitos.	42
Figura 5 - Procedimento do isolamento de colônias, a partir do crescimento celular em meio seletivo contendo cloreto de cobre.	47
Figura 6 - Fluxograma das atividades que foram desenvolvidas no laboratório após o isolamento dos micro-organismos em cobre.	51
Figura 7 - Representação dos locais de coleta e nomenclatura das amostras. (Fonte: Google Earth).	54
Figura 8 - As letras S, L e S+L representam respectivamente amostras sólidas, líquidas e amostras contendo partes sólida e líquida.	55
Figura 9 - Géis de agarose realizado para verificação de amplificação do gene 16S por reação em cadeia de polimerase.	57
Figura 10 - Diagrama de dispersão da análise de coordenadas principais (PCoA) separando as amostras em três grupos com similaridades quanto a gênero.	58
Figura 11 - Dendrograma das amostras estudadas, agrupando por similaridade de gênero.	59
Figura 12 - Gráfico de representatividade dos gêneros encontrados na amostra coletada da lagoa de rejeitos na mina de cobre Sossego – PA.	60
Figura 13 - Representação da diversidade bacteriana encontrada nas amostras de solo e líquida agrupadas por suas similaridades.	61
Figura 14 - Representação da diversidade bacteriana encontrada na amostra líquida 11. ..	62
Figura 15 - Representação da diversidade bacteriana encontrada nas amostras de solo 10, 13 e solo controle agrupadas por suas similaridades.	63
Figura 16 - Representação gráfica das bactérias isoladas da mina de Sossego. Isolamento seletivo utilizando cobre em diferentes concentrações e MJS como meio de crescimento.	64
Figura 17 - Gel de eletroforese em agarose comprovando a não eficácia do iniciador degenerativo descrito anteriormente na literatura.	64

Figura 18 - Gel de eletroforese comprovando a amplificação do iniciador para o gene de resistência CopA.	65
Figura 19 - Espectro de identificação realizado por espectrometria de massas (MALDI-TOF), baseando-se em fingerprint das proteínas ribossomais.	66
Figura 20 - Gráfico de máxima absorbância alcançado pela cepa <i>Acinetobacter sp.</i> em diferentes concentrações de cobre.	67
Figura 21 - Categoria funcional de todas as proteínas identificadas em <i>Acinetobacter</i> em todas as condições de cultivos.	68
Figura 22 - Gel de eletroforese bidimensional da cepa <i>Acinetobacter sp</i> em todas as condições de cultivos estudadas.	69
Figura 23 - Esquema do ciclo de Krebs.	70
Figura 24 - Região no mapa de eletroforese 2D mostrando a expressão da proteína peroxiredoxina recortada no spot 1, encontrada em todas as condições de cultivo.	75
Figura 25. Esquema de funcionamento das proteínas da grande família cheporona	76
Figura 26 - Localização da proteína Omp38 (spot 4) em todos os géis de eletroforese bidimensional de todas as condições de cultivo.	77
Figura 27 - Gel de eletroforese bidimensional de todas as condições de cultivo, mostrando a expressão da proteína hipotética no spot 2.	78
Figura 28. Possível mecanismo de homeostase do cobre realizado pela cepa <i>Acinetobacter pitii</i> isolada da mina de Sossego no Pará.	80
Figura 29 - Interação entre as proteínas CopA e CopB analisada por STRING.	81
Figura 30 - Espectro de identificação realizado por espectrometria de massas (MALDI-TOF), baseando-se em fingerprint das proteínas ribossomais.	82
Figura 31 - Gráfico de máxima absorbância alcançado pela cepa <i>Enterobacter</i> em diferentes concentrações de cobre.	82
Figura 32 - Categoria funcional de todas as proteínas identificadas em <i>Enterobacter sp.</i> em todas as condições de cultivos.	83
Figura 33 - Gel de eletroforese bidimensional da cepa <i>Enterobacter sp.</i> em todas as condições de cultivos estudadas.	84
Figura 34 - Gel de eletroforese bidimensional, mostrando a expressão da OmpX no spot 11.	88
Figura 35. Possível mecanismo de homesotase do cobre realizado pela cepa <i>Enterobacter cloacae</i> isolada da mina de Sossego no Pará.	89

Figura 36. Esquema de funcionamento das proteínas DnaK e GroeL.	90
Figura 37. Mecanismo de funcionamento de proteínas de secreção Hcp. Em verde mostrando a formação do tubo secretor.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores padrão de cobre permitidos por lei para descartes em diferentes ambientes e em diferentes meios físicos.....	23
Tabela 2 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.	44
Tabela 3 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.	44
Tabela 4 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.	48
Tabela 5 - Sequências dos iniciadores desenhados para todos os gêneros isolados da mina de cobre, para a realização da investigação da presença do gene copA.	49
Tabela 6 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.	50
Tabela 7 - Tabela com valores de metais encontrados nas amostras líquidas e de solo coletadas na mina de Sossego.	55
Tabela 8 - Proteínas identificadas por MALDI- TOF/TOF da cepa isolada <i>Acinetobacter</i> sp. em diferentes condições de cultivo sem cobre e com cobre adicionado.	73
Tabela 9 - Continuação tabela 08.	74
Tabela 10 - Proteínas identificadas por MALDI- TOF/TOF da cepa isolada <i>Enterobacter</i> sp. em diferentes condições de cultivo sem cobre e com cobre adicionado.	86
Tabela 11 - Continuação tabela 10.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila
ATCC - American Type Culture Collection
ATP – Adenosina trifosfato
BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”
BTEX- benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CopA – Proteína de resistência a cobre A
CopB – Proteína de resistência a cobre B
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP – Proteínas de cobre
CPS – Processo celular e sinalização
Cu – Cobre
DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNAr – Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTPs – Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT – Ditioneitol
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBL – European Molecular Biology Laboratory
FU – Função hipotética
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RNA – Ácido ribonucleico
RNAr – Ácido ribonucleico ribossomal
UFC – Unidade formadora de colônia
ISP – Armazenamento e processamento celular
M – Metabolismo
MCO- Multi copper oxidase
MIC – Mínima concentração inibitória
MotB – Proteína de motilidade
MS – Espectrometria de Massas
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NCBI - “National Center for Biotechnology Information”

NH_4HCO_3 – Bicarbonato de amônio

Omp – Proteína de membrana externa

pb- Pares de base

pI – Ponto isoelétrico

PM – Peso molecular

ppm- Partes por milhão

RPD – Ribossomal Database Project

rpm – Rotações por minuto

RND – *Resistance-nodulation-cell-division*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TFA – Ácido trifluoroacético

T-RFLP - Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

UNIPROT - Universal Protein Resource

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 <i>Cobre e a Vale</i>	24
1.2 <i>Diversidade bacteriana de solos e sua importância</i>	26
1.2.1 <u>Metagenômica</u>	28
1.2.2 <u>Influência dos metais na diversidade bacteriana</u>	29
1.3 <i>Resistência a metais</i>	31
1.4 <i>Proteômica</i>	35
1.4.1 <u>Proteômica do metabolismo de cobre por bactérias</u>	38
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 <i>Coletas de amostras</i>	42
3.2 <i>Quantificação de metais</i>	42
3.3 <i>Identificação da comunidade bacteriana por sequenciamento</i>	43
3.3.1 <u>Extração do DNA</u>	43
3.3.2 <u>PCR e sequenciamento MiSeq (Illumina)</u>	43
3.4 <i>Isolamento de micro-organismos</i>	45
3.5 <i>Identificação dos micro-organismos isolados</i>	45
3.5.1 <u>Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas MALDI-TOF</u>	45
3.5.2 <u>Identificação pela técnica de 16S - Extração de DNA e amplificação do gene da subunidade ribossomal menor (16S)</u>	48
3.6 <i>Identificação do gene de resistência copA</i>	49
3.7 <i>Protômica</i>	51
3.7.1 <u>Preparação das amostras</u>	51
3.7.2 <u>Eletroforese 2D</u>	52
3.7.3 <u>Digestão com tripsina</u>	52
3.7.4 <u>Identificação das proteínas através das massas dos peptídeos - “fingerprinting” - e busca em banco de dados</u>	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 <i>Caracterização da Diversidade bacteriana da área</i>	54
4.1.2 <u>Extração DNA total</u>	56
4.1.2 <u>PCR 16S</u>	57
4.1.3 <u>Diversidade da comunidade bacteriana</u>	57
4.2 <i>Investigação do gene copA</i>	63

<i>4.3 Proteômica</i>	65
<i>4.3.1 Acinetobacter sp.</i>	65
<i>4.3.2 Enterobacter sp.</i>	81
5 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS*	96

1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um elemento essencial para eucariotos e bactérias, pois é utilizado como cofator catalítico e estrutural para muitos processos bioquímicos (BANCI et al., 2010). Esse elemento atua como cofator de muitas metaloenzimas incluindo a superóxido dismutase (defesa antioxidante) e a citocromo c oxidase (cadeia de transporte de elétrons). Também está envolvido na aquisição e no transporte de ferro, na transdução de sinal, no transporte e ativação de oxigênio e na aquisição de ATP via respiração oxidativa. Como o cobre possui uma característica catalítica, quando em excesso livre na célula, o mesmo reage com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio, causando danos a ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. Por estas razões, a homeostase do cobre é cautelosamente controlada (LALIOTI et al., 2009). Apesar do cobre ser um cofator essencial para um número de metaloenzimas envolvidas no metabolismo de energia e de defesa como antioxidante, apenas quantidades mínimas são necessárias. Em excesso, o cobre é extremamente tóxico, por isso as células possuem um rigoroso controle homeostático no transporte de membrana e transporte intracelular (O'HALLORAN; CULOTTA, 2000).

Em seres humanos, o cobre é rapidamente absorvido no estômago e no intestino, tendo sua concentração controlada no organismo por um mecanismo de homeostase que envolve a indução e síntese de metalotioneínas. Apesar de este mecanismo prevenir parte da toxicidade do cobre, a exposição a níveis excessivos pode resultar em danos à saúde, afetando o fígado e os rins, resultando em anemia e imunotoxicidade. Os sintomas mais comuns relacionados a exposição a altas concentrações de cobre é a disfunção intestinal, seguida de náusea, vômito e dor abdominal. Em casos de superexposição ao cobre tem sido constatado o risco de câncer de pulmão e de estômago (ATSDR, 2004)

Por estas razões e com base na toxicidade do cobre, o CONAMA determinou valores limites para diferentes meios, conforme mostra a tabela 01 (CETESB, 2012).

Tabela 1 - Valores padrão de cobre permitidos por lei para descartes em diferentes ambientes e em diferentes meios físicos.

Meio	Concentração	Comentário	Referência
Efluente 1	1,0 mg/L	VM	
		(Padrão De lançamento)	
Solo	60 mg/kg*	Valor de Prevenção	CONAMA 420/2009
	200 mg/kg*	VI cenário agrícola-APMax	
	400 mg/kg*	VI cenário residencial	
	600 mg/kg*	VI cenário industrial	
Água potável	2 mg/L	Padrão de potabilidade	PORTARIA 2914/2011
Água	2000 µg/L	VMP (consumo humano)	CONAMA 396/2008
Subterrânea	500 µg/L	VMP (dessedentação)	
	200 µg/L	VMP (irrigação)	
	1000 µg/L	VMP (recreação)	
Águas doces	0,009 mg/L	VM (classes 1 e 2)	CONAMA 357/2005
	0,013 mg/L	VM (classe 3)	
Águas salinas	0,005 mg/L	VM (classe 1)	CONAMA 357/2005
	7,8 µg/L	VM (classe 2)	
Águas	0,005 mg/L	VM (classe 1)	CONAMA 357/2005
Salobras	7,8 µg/L	VM (classe 2)	

l= cobre dissolvido; * = peso seco; APMax= Área de Proteção Máxima; VI= Valor de Investigação; VMP = Valor Máximo Permitido; VM = Valor Máximo

Fonte: Cetesb, 2012

O cobre é descrito por atuar, positiva ou negativamente, na virulência de algumas bactérias, fungos e vírus. Em *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), por exemplo, a resistência ao cobre é essencial para o sucesso da infecção. Isso ocorre porque o mecanismo de defesa dos mamíferos é o controle da infecção por Mtb utilizando o Cu (aumentando a concentração deste metal). Em humanos após a infecção pulmonar por Mtb são induzidas proteínas que redirecionam o Cu para o fagossoma onde encontra-se o Mtb. Com as concentrações elevadas deste metal, há o aumento de radicais hidroxilo tóxicos gerados a partir do peróxido de hidrogênio (reação catalisada pelo Cu^+). Para se livrar dos efeitos tóxicos de Cu^+ livre, a bactéria Mtb utiliza-se dos mecanismos de resistência ao cobre para permanecer viva durante a infecção (WOLSCHEENDORF et al., 2011). Para o fungo patógeno de plantas *Botrytis cinerea*, o cobre é fundamental para sua virulência, visto que mutantes defeituosos na expressão de uma proteína transportadora de cobre

(ATPase BcCcc2) foram não-virulentos em modelo de infecção de folhas de tomate (SAITOH et al., 2010). Esses e outros estudos demonstram a importância da elucidação dos papéis relacionados à utilização e homeostase desse micronutriente.

O elemento cobre é encontrado em uma variedade de minerais na crosta da Terra. Seu uso é muito abrangente, e vai desde atividades de aquecimento, arrefecimento e refrigeração, fiação elétrica, eletrônica, geração e transmissão de energia até aplicações automotivas e produtos antimicrobianos. O minério de cobre pode ser extraído através de 2 métodos de mineração, a céu aberto ou subterrânea. No entanto, a atividade de mineração do cobre vem resultando no aumento da poluição do meio ambiente devido aos resíduos que contêm altos teores de cobre (HUANG et al., 2010). Os rejeitos possuem baixas concentrações de macronutrientes, especialmente o nitrogênio, não favorecendo o crescimento das plantas. Ainda, esses rejeitos podem conter concentrações elevadas de metais tóxicos, o que pode ser particularmente problemático, pois estes rejeitos possuem o pH baixo. Em tais casos, a fertilidade do solo e comunidades microbianas são drasticamente reduzidas (PEPPER et al., 2012).

1.1 Cobre

O cobre é até hoje um dos mais importantes metais para a humanidade com ampla distribuição na natureza. Pode ser encontrado como sulfureto, óxido, carbonato, pirita de cobre (calcopirita, CuFeS_2), calcocita (Cu_2S), cuprita (Cu_2O), e malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3 (\text{OH})_2$) (TYLECOTE, 1992).

Na forma metálica, o cobre, possui propriedades de condutividade elétrica e térmica, resistência à corrosão, maleabilidade e ductilidade, e por isso tem sido utilizado para uma variedade de aplicações (ALTIMIRA et al., 2012).

Especificamente na área de mineração, o mês de junho de 2004 pode ser considerado como um importante marco e divisor da história da mineração de cobre no Brasil. Nesta data, a Companhia Vale do Rio Doce – a Vale – deu início à produção e à comercialização do concentrado de cobre da mina Sossego, na Província Mineral de Carajás, no município de Canaã dos Carajás, estado do Pará (BNDES, 2001)

Com esse evento, a mineração brasileira mais que triplicou a sua produção de concentrado, passando de um patamar médio de 30.000 toneladas anuais de cobre contido, observado no período 1998-2003, para mais de 100.000 toneladas já em 2004, vindo a atingir 216.000 toneladas em 2008.

A mina Sossego é fruto de um amplo e bem-sucedido programa de exploração mineral para metais básicos incorporados pela Vale, a partir de meados da década de 1970, na Região de Carajás. Este programa culmina com a descoberta, a caracterização e o desenvolvimento de vários e importantes depósitos de minério de cobre, de médio a grande porte, considerados de classe internacional, muitos deles com amplas possibilidades de se tornarem minas nos cinco próximos anos. Além de Sossego, ali se encontram os depósitos de Salobo, Alemão, Cristalino, Alvo 118, Pojuca, Gameleira dentre outros, todos encravados na Província Mineral de Carajás, cujos recursos e reservas podem colocá-la entre as mais importantes províncias cupríferas do mundo. Estimuladas pelo sucesso da Vale e pelo favorável ambiente metalogenético para cobre e demais metais básicos, outras empresas investem na região, como é o caso da líder mundial do setor de cobre, a chilena Corporación Nacional del Cobre - Codelco, que descobre o depósito de Boa Esperança, em Tucumã, vindo a vendê-lo, posteriormente, à Mineração Caraíba S/A (FARIAS, 2010).

Como todo processo industrial, a mineração gera enormes quantidades de rejeitos, os quais são considerados estéreis (na mineração de cobre, o termo estéril está relacionado a rejeitos com baixo teor de cobre, os quais não são considerados economicamente viáveis para extração). Apesar de denominados estéreis, estes rejeitos ainda contêm uma quantidade significativa de minério (aproximadamente 0,07% de cobre), se considerado o volume gerado (VASCONCELOS, 2012). Diante disto, e num cenário cada vez mais sustentável, fica evidente a busca por soluções no âmbito da recuperação de áreas degradadas por atividades extrativistas, bem como o reaproveitamento de matérias primas.

O uso de micro-organismos em processos de remediação de áreas degradadas e/ou recuperação de minérios, vêm se tornando uma alternativa ambiental e economicamente viável. Por esta razão, a Vale juntamente com a Universidade de São (USP) propuseram um projeto ao BNDES, visando o aproveitamento do cobre dos rejeitos e ao mesmo tempo a descontaminação de efluentes metálicos, através do uso dos micro-organismos presentes na Mina de Sossego (PA). Além de aumentar o retorno econômico da mineração, a tecnologia pode reduzir o impacto ambiental da própria atividade. Se todo esse minério contido na lagoa de rejeitos puder ser recuperado, a Vale poderá ter uma receita bruta de US\$ 1,4 bilhão, valor superior ao US\$ 1,2 bilhão investido pela companhia entre 1997 e 2004 para colocar a mina em operação. Neste parceria com a USP, foram investidos, durante 5 anos, cerca de R\$ 15 milhões, dos quais R\$ 3 milhões foram desembolsados pela Vale e R\$ 12 milhões pelo BNDES (VASCONCELOS; 2012).

Ainda, o conhecimento sobre a microbiota presente nestas áreas, permite avaliar o real potencial biotecnológico no desenvolvimento de bioprocessos, os quais poderão, talvez, ser aplicados *in loco*.

1.2 Diversidade bacteriana de solos e sua importância

Os micro-organismos constituem as formas de vida mais abundantes e diversificadas presentes na natureza (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998) e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção dos ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (CANHOS; MANFIO, 2001).

Entre todos os organismos, as bactérias apresentam maior diversidade e quantidade (WARD; WELLER; BATESON, 1990). Muitos tipos de bactérias podem ser encontrados no solo e isoladas do mesmo. Alguns exemplos são bactérias autotróficas e heterotróficas; móveis e imóveis, anaeróbias e aeróbias; digestoras de celulose; oxidantes de enxofre; fixadoras de nitrogênio; mesófilas, termófilas e psicrófilas; entre outras. Porém, somente com a microscopia convencional não é possível detectar a maioria das bactérias presentes, pois estas apresentam-se aderidas a partícula de solo e sedimento (MELO, VALADARES-INGLIS; NASS; VALOIS, 2002).

Apesar da grande importância destes seres para a manutenção da biosfera, estima-se que apenas uma pequena fração das espécies microbianas existentes tenha sido descrita e caracterizada. Em virtude do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular baseadas em análises de sequências específicas do RNA ribossomal 16S ou de genes que os codificam, está surgindo um novo cenário para os estudos de caracterização e identificação dos micro-organismos no meio ambiente.

O conhecimento da diversidade microbiana no solo é essencial para a definição de estratégias para a preservação de biomassa e também para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associada a algum distúrbio, incluindo a mineração. Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota dos solos pode contribuir para a descoberta de genes codificadores de novas enzimas, enzimas com atividade ótima em condições ambientais extremas e peptídeos com atividade de interesse (RODRIGUES, 2007).

A bioinformática, que é uma ciência que emprega métodos computacionais, matemáticos e estatísticos para organizar e analisar dados biológicos em grande escala e

de maneira integrada, vem apoiando o desenvolvimento deste novo cenário de identificação microbiológica (OGATA, 2005).

A correta avaliação da diversidade bacteriana é altamente dependente da metodologia aplicada, pois se sabe que em uma comunidade microbiana podem existir micro-organismos cultiváveis e não cultiváveis em laboratório. Por isso, experimentos envolvendo clonagem da sequência do DNA que codifica o gene ribossomal 16S, quando recuperados do meio ambiente, fornecem uma noção mais precisa sobre a identidade dos membros da comunidade bacteriana. Porém, essa metodologia tem como desvantagem o fato de ser extremamente trabalhosa e demorada (RODRIGUES, 2007).

Segundo Amann e Ludwig (2000), tais sequências de RNAr 16S são consideradas como importantes marcadores moleculares porque:

- são essenciais para a síntese de proteínas e estão presentes em todos os organismos;
- são conservadas estrutural e funcionalmente;
- apresentam tanto regiões conservadas como variáveis e altamente variáveis, nas estruturas primária e secundárias;
- apresentam aparente ausência de transferência gênica horizontal;
- têm tamanho satisfatório, com cerca de 1500 nucleotídeos, suficientes para fazer inferências filogenéticas.

Portanto, além do isolamento, caracterização e identificação dos micro-organismos cultiváveis, métodos independentes de cultivo podem ajudar a dimensionar a comunidade bacteriana encontrada em um determinado ecossistema. Alguns pesquisadores acreditam que estes métodos possibilitaram explorar a "caixa preta" da diversidade microbiana existente em solos e sedimentos (TIEDJE; ASUMING-BREMPONG, 1999).

As técnicas moleculares contribuem para um melhor entendimento sobre a estrutura e a funcionalidade da comunidade microbiana nos permitindo obter importantes informações sobre um número muito maior de espécies, a distribuição geográfica, as relações ecológicas, a atividade celular e a proporção numérica entre diferentes populações microbianas em seus habitats. Essas informações permitem o desenvolvimento de novas estratégias de isolamento e cultivo de novos organismos em laboratório, permitindo assim o estudo mais aprofundado sobre a morfologia, a fisiologia e a bioquímica dessas células e contribuindo para o entendimento sobre os ciclos naturais ou processos desenvolvidos pelo homem (NAKAYAMA, 2005).

1.2.1 Metagenômica

O termo metagenômica foi originalmente utilizado por Handelsman et al., (1998) e é atualmente definida como o estudo da comunidade microbiana diretamente de seus ambientes naturais utilizando técnicas modernas de genômica, sem a necessidade de cultivo.

Desde então muitos trabalhos têm sido desenvolvidos na busca do conhecimento da diversidade bacteriana, principalmente de solos. Um trabalho realizado por Karolski, (2013) visou o estudar a comunidade bacteriana de solos contaminados ou não contaminados com BTEX. Através da metagenômica, foi possível desenhar um panorama metabólico geral identificando os genes relevantes e os que tinham potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos de procariotos conhecidos e desconhecidos.

Outro exemplo de estudo da diversidade bacteriana foi desenvolvido por Lopatina et al., (2016) onde o objetivo foi realizar um estudo metagenômico comparativo da neve da antártica. Os resultados mostraram uma clara evidência da deposição de bactérias marinhas até mesmo nas estações de pesquisa próximas ao mar aberto.

Com outra abordagem para a metagenômica Wirth et al., (2015) analisaram a comunidade bacteriana presente em reatores com co-cultura de algas e bactérias produzindo biogás. Os resultados mostraram que as bactérias que conviviam com as algas no sistema anaeróbico predominaram e aumentaram sua biomassa, enquanto que as algas não foram afetadas pela mudança na composição da comunidade bacteriana.

Os procariotos existentes em solo são ainda uma grande incógnita para a ciência, por isso, a ciência foca nos estudos de metagenômica das comunidades microbianas na tentativa de entender quem são e o que fazem (KAROLSKI, 2013). Estes trabalhos estudam não apenas ambientes inóspitos, desabitados e desprovidos de contato humano, como estudam também ambientes que sofrem com atividades antropogênicas e com contaminação, como por exemplo, o diesel (JUNG; PHILIPPOT; PARK, 2016).

Desse modo além do isolamento, caracterização e identificação dos micro-organismos cultiváveis, métodos independentes de cultivo podem ajudar a dimensionar a comunidade bacteriana encontrada em um determinado ecossistema.

1.2.2 Influência dos metais na diversidade bacteriana

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos até hoje demonstrando os efeitos dos metais tóxicos sobre a diversidade da comunidade bacteriana, sendo a grande maioria deles em solos contaminados com estes contaminantes. Muitos estudos tentam estabelecer a concentração de cobre e de outros metais que podem afetar a comunidade bacteriana, mas desde 1989 (BAATH, 1989) não há um consenso de um valor de concentração mínimo. Dos trabalhos verificados e que atestaram diferenças na comunidade bacteriana causadas pelos metais, existiram variações de mais de cem vezes entre eles. Essa grande diferença entre esses estudos provavelmente pode estar correlacionada com a biodisponibilidade dos metais nos solos estudados, que dependem principalmente das características físico-química de cada solo (GILLER; WITTER; MCGRATH, 1998). A química do cobre no solo é complicada e a forma que este metal afeta os micro-organismos ainda não está bem estabelecida (TOM-PETERSEN et al., 2003).

Ao analisar solos contaminados com metais (variando as concentrações de cobre em 500 a 14.400 mg/Kg de solo), Ellis et al. (2003) constataram que a contaminação com metais não teve um efeito significativo na diversidade genética das bactérias no solo, porém o estado fisiológico foi afetado.

Dell'Amico et al., (2008) analisaram a diversidade bacteriana de dois solos com concentrações diferentes de cobre que há tempos estavam sob influência de contaminação com o metal. Os resultados provenientes da técnica de DGGE (método não cultivável) mostraram que a composição de espécie da comunidade bacteriana total foi diferente nos dois locais e que ambos tinham o mesmo grau de diferença da biodiversidade e dominância. Os resultados das bactérias cultivadas destes solos foram: no solo com menor concentração de cobre (9 mg/Kg de solo) as bactérias Gram-positivas foram isoladas em maior número, já no solo com concentração maior de cobre (30 mg/Kg de solo) as bactérias mais isoladas foram Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas possuem apenas uma membrana, sendo assim mais fácil a translocação dos íons de metais e, além disso, as bactérias Gram-positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano aumentando as chances de ligação de metal (SAMUELSON et al., 2000). Por estas razões, poderia ser explicado o aumento de bactérias Gram-negativas com o aumento da concentração do cobre.

O efeito da contaminação por mercúrio, por um longo período na comunidade microbiana foi estudada por Müller et al., (2001). Três solos foram estudados contendo

diferentes concentrações de mercúrio. Os resultados das análises por DGGE mostraram que o solo que continha valores maiores deste metal tóxico teve a estrutura da comunidade alterada e a diversidade diminuída. Dos micro-organismos cultivados, as bactérias eram menos diversas, porém continham uma proporção maior de cepas mais resistentes e de crescimento acelerado. Já na biomassa fúngicas não houve diferenças significativas para os três solos.

Utilizando a técnica de polimorfismo terminal de fragmentos de restrição (T-RFLP) Tom-Petersen et al. (2003) constataram o impacto causado pelo cobre na comunidade bacteriana, sendo vista uma diferença já em domínio destes micro-organismos levando-se em consideração a classificação biológica da vida. Foi visto também um impacto no grupo dos *Rhizobium*-*Agrobacterium* e, por isso, este grupo foi utilizado como um indicador da toxicidade do cobre.

Um estudo recente (XIE et al., 2016) mostrou o efeito de cádmio (Cd) na comunidade microbiana de solo e também na variedade genética de plantas (bermudagrass). Os resultados obtidos mostraram que a bioatividade total, a riqueza e a diversidade microbiana diminuíram com o aumento da concentração de Cd. As diversidades genéticas das plantas foram maiores em locais contaminados do que em locais não contaminados.

Outro estudo desenvolvido por Turpeinen et al. (2004) utilizando, também, a técnica de T-RFLP mostrou que a contaminação de solo com arsênio alterou permanentemente a estrutura da comunidade bacteriana. E ainda, as bactérias que foram cultivadas de solos que continham maiores concentrações de arsênio se mostraram mais resistente a este metal. Com isso, eles concluíram que combinando métodos dependente e independente de cultura foi possível sugerir que as bactérias são capazes de responder à contaminação por metal e a atividade metabólica manteve-se através de mudanças na estrutura da comunidade microbiana e por seleção de resistência.

Com esses resultados demonstrados, é possível afirmar que plantas, fungos e bactérias são mantidos em locais contaminados com metais tóxicos porque estes contaminantes promovem uma pressão ambiental e consequentemente uma seleção, mantendo somente os organismos resistentes. Essa pressão seletiva pode ser utilizada para estudo e bioprospecção de organismos resistentes a estas condições e verificação de seu potencial para biorremediação (ANDREAZZA et al., 2010).

A resistência aos metais tóxicos é comumente encontrada em bactérias coletadas de amostras ambientais tais como solo, água e ar devido a altas concentrações de metais tóxicos encontrados na atmosfera (SHOEB et al., 2012). Ainda segundo Shoeb et al. (2012) em condições laboratoriais, através da transferência de plasmídeos e monitoramento da manutenção do respectivo fenótipo via conjugação e transformação, foi possível demonstrar como as linhagens tolerantes a múltiplos estresses, como alta resistência a metais, são geradas na natureza.

1.3 Resistência a metais

A liberação de espécies de metais tóxicos consiste num dos problemas de poluição ambientais mais relevantes desde a revolução industrial, principalmente porque os metais tóxicos não são degradados e, portanto, permanecem no ambiente. Nesta situação, ambientes contaminados com metais mantém o processo seletivo em populações bacterianas nativas por longo período de tempo. Mesmo alguns ecossistemas naturais podem conter altas concentrações de metais tóxicos e, por isso, não é surpreendente que genes de resistência aos metais sejam facilmente encontrados em bactérias contidas em amostras ambientais. Além de ser encontrado resistência aos metais, alguns trabalhos demonstraram que as cepas que resistiam aos metais eram capazes de resistir também a antibióticos (LULI et al., 1983; PELLETT; BIGLEY; GRIMES, 1983; SABRY; GHOZLAN; ABOU-ZEID, 1997). Um trabalho realizado por FILALI et al., (2000) isolou bactérias resistentes a mercúrio e a cádmio, e testou ainda a resistência dessas bactérias isoladas frente a antibióticos. Os resultados mostraram uma resistência notável a todos os 10 antibióticos testados. Desde 1977, a resistência a metais e a antibióticos são associadas, pois, em alguns casos, a resistência a metais e a antibióticos são mediadas pelo mesmo plasmídeo (NAKAHARA et al., 1977) e essa resistência pode ser transferidas entre os micro-organismos por conjugação ou transdução (HARNETT; GYLES, 1984).

Uma célula pode desenvolver sistemas de resistência a metais como uma tentativa de proteger os componentes celulares sensíveis. Através da limitação do acesso de metais ou alteração dos componentes, a sensibilidade destas estruturas é diminuída (ROUCH et al., 1995). Diversos micro-organismos adaptaram-se com sucesso à presença de variados metais pelo uso de mecanismos de resistência codificados por cromossomos, plasmídeos ou transposons (SABRY et al., 1997).

A maioria destes mecanismos de resistência é mediada por plasmídeos, o que fornece uma vantagem competitiva sobre outros organismos quando metais estão presentes no ambiente, e são altamente específicos para um determinado cátion ou ânion (SILVER; MISRA, 1984; TREVORS, 1987 apud BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). Há sistemas de resistência para os metais essenciais (nutrientes) em grandes quantidades e não essenciais, que não têm nenhum papel biológico. Eles não apenas protegem o organismo em um ambiente inóspito como também realizam um importante papel na ciclagem de metais tóxicos na biosfera (WILLIAMS; SILVER, 1984)

Existem diferenças entre sistemas de resistência a metais de origem cromossômica e plasmídeos. Os sistemas de resistência a metais essenciais de origem cromossômica são mais complexos do que os sistemas plasmídeos, que são geralmente mecanismos de efluxo de íons tóxicos (SYMANSKI, 2005). Em geral, são admitidos seis mecanismos envolvidos na resistência a metais, a saber: exclusão de metais por barreira de permeabilidade, transporte ativo de metais através da célula/organismo; sequestro intracelular de metais por proteínas de ligação; sequestro extracelular; detoxificação enzimática do metal para forma menos tóxica; redução da sensibilidade dos metais de alvos celulares (PERPETUO; BARBIERI; OLLER NASCIMENTO, 2011; ROUCH; LEE; MORBY, 1995).

O mecanismo de transporte e resistência mais bem estudado hoje é o da bactéria Gram positiva *Enterococcus hirae* (conhecida anteriormente como *Streptococcus faecalis*). Os genes que conferem resistência ao cobre em bactérias são frequentemente encontrados em plasmídeos e organizados em um único operon. O sistema *cop* de *Enterococcus* é regulado em duas condições; quando há falta de cobre e a CopA (captação de cobre) é ativada, ou quando há excesso de cobre e a CopB (extrusão de cobre) é ativada (fig.01) (ODERMATT; SOLIOZ, 1995). O gene de resistência ao cobre é codificado pelos *cop* genes (*copA*, *copB*, *copC* e *copD*) nos gêneros *Cupriavidus metallidurans*, *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas aeruginosa*. O gene *copA* que codifica uma oxidase multi-cobre é um dos genes determinantes envolvidos no mecanismo de resistência ao cobre em bactérias Gram negativas. Ele é responsável por codificar uma oxidase que oxida o cobre I para uma forma menos tóxica, o cobre II (RADEMACHER; MASEPOHL, 2012).

Figura 1 - Modelo do operon *cop* e homeostase do cobre em *E. hirae*.

A redutase extracelular CorA fornece cobre (I) para a absorção pela CopA. Dentro da célula, o cobre é encaminhado da ATPase CopA para o repressor CopY pela chaperona de cobre CopZ. Quando ligado ao CopY (sendo este o promotor), a expressão dos quatro genes de *cop* é permitida. No caso de excesso, o cobre ligado a CopZ pode ser entregue a CopB ATPase que inicia sua exportação. Os números indicam a quantidade de aminoácidos das respectivas proteínas (Fonte: Solioz; Stoyanov, 2003).

Para enfrentar concentrações de cobre desfavoráveis, a maioria das bactérias utiliza mecanismos específicos de defesa que são induzidos pelo cobre. Os mecanismos utilizados são do tipo ATPases (atuam como transportadores específicos por acoplamento utilizando energia da hidrólise do ATP para a transferência de íon através das membranas citoplasmáticas). Estas são os principais componentes da homeostase que realizam o transporte do cobre em todas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Além disso, muitas bactérias sintetizam sistemas de efluxo de cobre com vários componentes pertencentes à família RND (*resistance-nodulation-cell-division*) ou MCOs (multi copper oxidase). Membros representativos destas proteínas de homeostase de cobre são: cobre-ATPase CopA, o sistema RND CusCFBA, e o MCO CueO de *Escherichia coli* (fig. 02) (RENSING; GRASS, 2003).

Figura 2 - Homeostase de cobre em *E. coli*.

Íons Cu^+ e Cu^{2+} entram no periplasma (exibido em cinza), provavelmente através de porinas abrangendo a membrana externa. ComC reduz a permeabilidade da membrana externa. É desconhecido se o ComC interage com porinas. Em ambientes com concentrações de cobre baixas, a transcrição da ComC é reprimida pelo comR (não mostrado). Íons Cu^+ entram no periplasma para o citoplasma por um mecanismo desconhecido, enquanto que os íons Cu^{2+} não atravessam o citoplasma. O efluxo de cobre envolve a CopA ATPase e a CusCFBA sistema multicomponente. O multi-cobre oxidase CueO oxida no periplasma Cu^+ para o Cu^{2+} (Fonte: Rademacher; Masepohl, 2012).

Outros micro-organismos defendem-se da presença de íons de metais tóxicos através da síntese de peptídeos ricos em cisteína, tais como a glutathione (GSH), fitoquelatinas (PCs) ou de metalotioneínas (MTs). Esses peptídeos ligam-se aos íons metálicos sequestrando-os sob uma forma biologicamente inativa (BIONDO, 2008; AQUINO; BARBIERI; OLLER NASCIMENTO, 2011). Neste aspecto, é possível que a biomassa seja utilizada na “captura” do íon metálico para posterior reaproveitamento do mesmo.

No entanto, para entender o mecanismo de resistência a estes metais, bem como a sua localização na célula, estudos detalhados devem ser realizados.

Embora os efeitos dos metais tóxicos sobre a fisiologia da célula possam ser estudados através de proteínas individuais, a proteômica permitiu que estes efeitos pudessem ser visualizados numa escala muito maior (WASHBURN; YATES, 2000).

Analisando o proteoma de um organismo é possível obter uma visão de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico, por este ser altamente dinâmico e dependente do estado da célula (GODOVAC-ZIMMERMANN; BROWN, 2001). Isto porque o proteoma não é estático e muda com o desenvolvimento do organismo em face à qualquer mudança no seu ambiente (SILVEIRA, 2009). Em resposta a estímulos ou diferentes condições de cultivo, as proteínas podem sofrer alterações em seus padrões de expressão, modificação pós-traducional ou localização celular. Um mesmo genoma pode potencialmente originar um número infinito de proteomas, e desta maneira, o proteoma é uma ferramenta que vem complementar o estudo do genoma (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

1.4 Proteômica

Com a introdução do gel bidimensional por O'Farrell (mapeamento de proteína de *E.coli*), Klose (rato), e Scheele (cobaias), em 1975 iniciavam-se então os estudos de proteínas. No entanto, as proteínas podiam ser separadas e visualizadas, mas não podiam ainda ser identificadas (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Em 1995 iniciou-se a utilização do termo proteômica sendo este definido como: a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas em uma célula ou em um tecido (WILKINS, 1997)

O desenvolvimento da tecnologia de espectrometria de massas (MS) foi o avanço mais importante na identificação de proteínas. Na última década, a sensibilidade de análise dos resultados e precisão para a identificação de proteínas por MS aumentaram várias ordens de grandeza, tolerando até mistura de proteínas. Esse avanço possibilitou a substituição do sequenciamento de Edman, o qual era o método mais utilizado para identificação de proteínas (ANDERSEN; MANN, 2000).

A proteômica tem se mostrado promissora em diferentes áreas da biologia (fig. 03). O objetivo da proteômica é, não só identificar todas as proteínas de uma célula, mas também criar um mapa tridimensional completo da célula indicando onde as proteínas estão localizadas e suas funções (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

A grande maioria dos estudos de proteômica ambiental foca nas investigações com micro-organismos cultivados em laboratório. Estes micro-organismos são estudados por causa de suas capacidades de tolerar, degradar, ou precipitar compostos tóxicos, ou a sua versatilidade no uso de doadores de elétrons, aceptores de elétrons ou fontes de carbono e de energia. Essas qualidades tornam estes organismos atraentes para a biotecnologia

ambiental e a proteômica nos dá uma melhor compreensão das suas funções em determinados habitats (LACERDA; REARDON, 2009).

Figura 3 - Tipos de proteômicas e suas aplicações na biologia (adaptado de Graves e Haystead, 2002).

Embora a proteômica seja um campo jovem que ainda está em desenvolvimento, muitas pesquisas destinam-se ao mapeamento de todas as proteínas de uma célula (Quadro 01). Esta abordagem de "proteína total" também está sendo usado em experimentos comparativos, que comparam as células normais e as células com algum tipo de estresse, podendo assim identificar marcadores moleculares do estado da célula (GODOVAC-ZIMMERMANN; BROWN, 2001).

Quadro 01 - Estudos de proteômica realizados com diferentes organismos e diferentes condições de cultivo.

Organismos	Condição	Referência
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Radiação gamma	(ZHANG et al., 2005)
<i>Enterobacter liquefaciens strain</i>	Cobalto	(MARRERO et al., 2004)
<i>Escherichia coli</i>	Ácido hipocloroso	(DUKAN et al., 1998)
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Cobre	(BAKER-AUSTIN, 2005)
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Arsênio	(BAKER-AUSTIN et al., 2007)
<i>Ralstonia metallidurans</i>	Metais tóxicos	(MERGEAY et al., 2003)
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	Alta e baixa temperatura	(WANG et al., 2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	(FUTCHER et al., 1999)
<i>Achromobacter sp.</i>	Fenol	(GRACIOSO; et al., 2013)
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Cobre	(ALMÁRCEGUI et al., 2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cobre, zinco e cádmio	(POIRIER et al., 2008)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Baixa temperatura e com metais	(POIRIER et al., 2014)
<i>Escherichia coli</i>	Ferro	(LOK et al., 2008)
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Cobre	(MONCHY et al., 2006)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Benzoato de metila	(KIM; CHOI; KAHNG, 2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	Naftoquinona	(AUGUSTO DA COSTA; DUTA, 2001)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	Estresse oxidativo	(LEE; HWANG; HWANG, 2011)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sais biliares, anaerobiose	(PAYNE et al., 2013)
<i>Triticum aestivum L.</i> (planta)	Cobre	(LI et al., 2013)

1.4.1 Proteômica do metabolismo de cobre por bactérias

O estudo de proteômica com metais (inclusive o cobre) tem impactado a compreensão da interação micro-organismo/mineral (MARTINEZ; VERA; BOBADILLA-FAZZINI, 2015). Com uma infinidade de objetivos, estes estudos visam elucidar as proteínas que estão envolvidas com a sobrevivência dos micro-organismos frente aos metais tóxicos.

O importante aspecto da proteômica é a possibilidade de identificar as proteínas diferencialmente expressas pelas células expostas a diferentes condições ambientais (VALENZUELA et al., 2006). As duas principais técnicas utilizadas e comumente denominadas de *top-down* ou *bottom-up* são: a eletroforese bidimensional em gel e identificação total de proteínas, respectivamente. Para identificação total das proteínas é utilizado a cromatografia líquida (nano-LC) acoplada a espectrometria de massas (MS/MS). Com esta técnica a mistura de proteínas de uma célula sofre a clivagem proteolítica e os peptídeos gerados nesta clivagem são então identificados (MS). Esta técnica de *bottom-up* tem como vantagem a alta eficiência de identificação proteica total da célula inteira. Alternativamente, na abordagem proteômica *top-down*, as proteínas são separadas em gel por seus pesos moleculares e por seu ponto isoeletrico, e através da comparação de géis (em diferentes condições de crescimento) a proteína alvo é selecionada e digerida para identificação. Esta técnica torna-se poderosa para uma análise abrangente das modificações das proteínas expressas (CHAIT, 2006; NG et al., 2016; SOWELL et al., 2004; ZHANG; GE, 2011). A eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D PAGE) possui como vantagem a sua alta reprodutibilidade, podendo assim fazer múltiplas comparações das amostras. Com isso, é possível correlacionar diretamente as alterações das expressões observadas dentro da célula (VALENZUELA et al., 2006). Com estas observações, a proteômica desenvolvida neste estudo foi do tipo *top-down*, sendo possível identificar proteínas alvos que tiveram suas expressões modificadas com a presença do metal tóxico cobre, podendo assim elucidar os mecanismos de defesa das bactérias isolada na mina Sossego-PA.

Os estudos das proteínas expressas na presença de cobre pode estar relacionado a utilização do cobre como nova promessa terapêutica a bactérias patogênicas, como é o caso do estudo realizado por Ng et al. (2014) que observou que em uma cepa de *Proteus hauseri*, bactéria responsável por infecções do trato urinário, perdia sua motilidade devido ao estresse causado pelo cobre. Um outro estudo com a mesma espécie *Proteus hauseri*

(NG et al., 2016) teve como objetivo verificar se o cobre afetava na motilidade, mas também se na presença de cobre esta cepa expressava em maior quantidade a enzima *multi-copper oxidase (laccase)*, enzima esta induzida pela presença de cobre e que possui uma significativa importância industrial como remoção de corantes, biorremediação e também como biocombustível (CHEN et al., 2010, 2012; ZHENG et al., 2013).

Ainda envolvido com estudo da patogenicidade, Sun et al., (2011) realizou o estudo de metaloproteômica com intuito de identificar e caracterizar proteínas e peptídeos que possuem ligações com metais. Os metais são responsáveis pela sobrevivência e infecção das bactérias nos hospedeiros, por isso Sun estudou o proteoma de uma cepa de *Streptococcus pneumoniae* a fim de encontrar “motivos” de ligação a cobre e a zinco. A resistência ao cobre emergiu como determinante de virulência dos patógenos microbiano. Guo et al., (2015) estudaram o proteoma de uma cepa de *Streptococcus pneumoniae* resistente a cobre e que causa uma variedade de doenças incluindo a meningite. Por isso o estudo de resistência das cepas patogênicas faz-se essencial, podendo usar o cobre como novo agente terapêutico ou produzir novos agentes que poderiam inativar as proteínas que fazem com que estas cepas possuam a resistência a este metal.

Um outro foco para o estudo de proteoma com cobre pode estar envolvido com o melhoramento da biolixiviação como nos estudos realizados por Orell et al., (2013), onde os mecanismos de resistência a cobre de uma cepa de *Sulfolobus metallicus* determinantes para a biolixiviação foram caracterizados. Também nos estudos realizados por Almárcegui et al., (2014) e Martínez-Bussenius et al., (2016) foi obtida a identificação das proteínas presentes em uma cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma bactéria extremófila utilizada nos processos de biominação para recuperação de cobre.

Outra abordagem para o estudo de proteômica com cobre foi desenvolvido por Kao et al., (2004) que visaram analisar a proteômica quantitativa da regulação metabólica por íons de cobre de uma cepa de *Methylococcus capsulatus*, pois os íons cobre funcionam como um interruptor, ativando a oxidação do metano.

É possível também utilizar esta técnica para elucidar os mecanismos de resistência ao cobre de cepas como *Escherichia coli* (NANDAKUMAR et al., 2011), *Cupriavidus metallidurans* (MONCHY et al., 2006), *Pseudomonas fluorescens* (SHARMA et al., 2006) e *Kineococcus radiotolerans* (BAGWELL et al., 2010). Todos esses estudos incluindo esse trabalho, visaram elucidar os mecanismos de resistência de cepas isoladas (neste especificamente isoladas da mina de cobre) a fim de poder compreender a fisiologia destas

cepas e buscar potencial para novas técnicas biotecnológicas na recuperação do cobre e restauração de áreas ambientais.

Diante de tantas questões, estudos e tentativas de se conhecer comunidades microbianas relacionadas a ambientes com altas concentrações de metais, este trabalho visou caracterizar a diversidade da comunidade bacteriana presente em uma área de processamento de cobre (Mina do Sossego, Canaã dos Carajás, PA) e também isolar cepas resistentes a altas concentrações deste metal tóxico. Impulsionados ainda pelas questões que permanecem em aberto relacionadas ao metabolismo microbiológico de metais, mais especificamente a do cobre, tivemos por objetivo estudar o mecanismo de resistência ao metal de alguns micro-organismos isolados através de estudos de proteômica. As duas abordagens de nosso trabalho unem-se na busca de informações, que em seu estágio final de desenvolvimento, pretendem a melhoria, ou até mesmo um alicerce, para o desenvolvimento de técnicas de biorremediação da área contaminada e recuperação do cobre.

2 OBJETIVOS

- Identificar os isolados bacterianos cultiváveis das amostras coletadas da mina de cobre Sossego-PA;
- Selecionar os isolados bacterianos resistentes a altas concentrações de cobre;
- Comparar a diversidade bacteriana dos locais amostrados e relacionar diferenças da comunidade às diferentes concentrações de cobre;
- Estudar o mecanismo de resistência ao cobre através da técnica de proteômica.
- Identificar diferentes tipos de metabolismo de bactérias resistentes a cobre, utilizando a técnica de proteômica;
- Identificar genes de bactérias responsáveis pela expressão de proteínas identificadas e relacionadas ao metabolismos do cobre.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas de amostras

Como parte inicial do projeto foram coletadas amostras de solo e água da lagoa de rejeitos da Mina do Sossego, as quais foram adequadamente identificadas e estocadas. A localização aproximada da região de coleta do material é mostrada na Figura 04.

Figura 4 - Mapa de localização da lagoa de rejeitos.

Em detalhe, a área de exploração de cobre evidenciando a mina de onde são retirados os minerais para processamento do metal. (Fonte: Google Earth)

3.2 Quantificação de metais

As análises das amostras coletadas quanto aos valores de metais tóxicos foram realizadas utilizando a técnica de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES- Varian 720-ES, Agilent - Palo Alto, California/EUA). Para isso as amostras foram digeridas em micro-ondas (MARSSXpress – CEM, Reino Unido) utilizando diferentes protocolos:

Amostra líquida – foi utilizado 9 mL da amostra coletada e 1 mL de ácido nítrico concentrado (100%). O protocolo de digestão utilizado foi o EPA 3015. Após a digestão a

amostra foi filtrada com filtros 0,45 µm e diluídas 1:10, após diluição foram analisadas em ICP.

Amostras de solos – os solos foram secados a 105 °C por 24 h. após a secagem foi pesado 0,1g de solo e adicionado 5 mL de ácido nítrico concentrado (100%). O protocolo de digestão utilizado foi EPA 3051. Após a digestão a amostra foi filtrada com filtros 0,45 µm e diluídas 7 vezes. Logo após este processo as amostras foram analisadas em ICP.

3.3 Identificação da comunidade bacteriana por sequenciamento

3.3.1 Extração do DNA

Os DNAs presentes na amostra de solo foram extraídos utilizando o Kit Mobio Ultra Clean soil DNA (MoBio Laboratories, EUA), conforme instruções do fabricante.

Os DNAs presentes em amostras líquidas foram extraídos com Kit Mobio Ultra Clean water DNA (MoBio Laboratories, EUA). A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose a 1% (Henry et al., 2004).

3.3.2 PCR e sequenciamento MiSeq (Illumina)

O procedimento de sequenciamento foi realizado pelo Laboratório Multiusuários Centralizado – USP, localizado no campus da ESALQ em Piracicaba utilizando-se os procedimentos já estabelecidos pelo laboratório. O resumo das etapas de sequenciamento e os respectivos produtos e valores utilizados estão escritos de forma sucinta abaixo.

Primeira amplificação foi realizada com iniciadores das regiões V3 e V4 do gene 16S (KLINDWORTH et al., 2013) (*Forward-5'* **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG** e *reverse* - **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC**, em negrito o adaptador Illumina).

O protocolo para a reação em cadeia de polimerase está descrito na tabela 02.

Tabela 2 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.

Reação	Volume
DNA (5 ng/μL)	2,5 μL
<i>Foward Primer</i> 10 uM	0,5 μL
<i>Reverse Primer</i> 10 uM	0,5 μL
2x KAPA HiFi <i>Hot Start Ready Mix</i>	12,5 μL
Água grau PCR	9,0 μL
Volume final	25,0 μL

E o programa para o termociclador foi: 95 °C por 3 minutos e 25 ciclos de:

- 95 °C por 30 segundos
- 55 °C por 30 segundos
- 72 °C por 30 segundos
- 72 °C por 5 minutos
- ∞ a 4 °C.

A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 1,5% de agarose.

A segunda PCR foi de ligação dos adaptadores, em negrito acima. E o protocolo utilizado está descrito na tabela 03.

Tabela 3 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.

Reação	Volume
Produto da 1ª PCR purificado	5,0 μL
<i>Nextera XT Index Primer 1</i> (N7xx)	5,0 μL
<i>Nextera XT Index Primer 2</i> (S5xx)	5,0 μL
2x KAPA HiFi <i>Hot Start Ready Mix</i>	25,0 μL
Água grau PCR	10,0 μL
Volume final	50,0 μL

E o programa no termociclador utilizado foi 95 °C por 3 minutos e 12 ciclos de:

- 95 °C por 30 segundos
- 55 °C por 30 segundos
- 72 °C por 30 segundos
- 72 °C por 5 minutos
- ∞ a 4 °C.

A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 1,5% de agarose.

Após a quantificação da 2ª PCR pelo Qubit (Thermo Fischer Scientific), foram verificadas as concentrações de todas as bibliotecas e normalizadas todas para uma mesma concentração. Depois de normalizada as bibliotecas, foram adicionados neste tubo 3 µL a 5 µL de cada biblioteca, misturadas bem e armazenadas a -20 °C, para posterior quantificação por qPCR.

A concentração utilizada para todas as bibliotecas foi de 99,9 ng/µL e depois foi feito o pool com todas as bibliotecas, usando 4 µL de cada.

Este pool foi quantificado via qPCR para estimar a real concentração em nM, com o kit “KAPA Library Quantification” (KAPA Biosystems) para posterior carregamento na forma *paired-end* (2 x 300 bp) no equipamento MiSeq (Illumina).

3.4 Isolamento de micro-organismos

A seleção de micro-organismos resistentes a cobre foi realizada pela doutora Avanzi, (2016) utilizando o seguinte protocolo: a inoculação de uma amostra de solo (1 g) ou água (1 mL) em meio “MJS” de VALLS et al., (2000). Este meio consiste em 12,5 mM HEPES; 50 mM NaCl; 20 mM NH₄Cl; 1 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,05 mM MnCl₂; 0,8% casaminoácidos; 0,005% tiamina; 0,10% de glicose, 0,50% de glicerol, 10,0 mg/L de anfotericina B, adicionado de 1mM de cobre (CuCl₂). A Incubação ocorreu em agitador de bancada (Infors HT, Modelo Multitron Pro – Bottmingen Suíça) a 28 °C e 150 rpm. A avaliação do crescimento celular foi feita após 2 dias (48 h) e 1 mL deste “pré-inóculo” foi incubado em diferentes concentrações de cobre (160 a 650 ppm) por 48 h, a 28 °C e 180 rpm (fig. 05). Após 48 h foram realizados o plaqueamento em placa de Petri e seus isolados identificados. Parte de cada cultivo foi estocado utilizando 2 mL suplementado com 30% glicerol em freezer -80 °C, para análises posteriores.

3.5 Identificação dos micro-organismos isolados

3.5.1 Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas MALDI-TOF

Inicialmente, a identificação taxonômica foi realizada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, a qual fornece perfis protéicos de cada linhagem isolada. A metodologia empregada foi a sugerida pela Bruker Daltonics - Massachusetts, EUA. Em resumo, as células de uma única colônia foram transferidas da placa de Petri diretamente para a placa de 96 poços de aço polido (Bruker Daltonics GmbH), cobertas com 1 µL da

solução matriz (que consiste numa solução saturada de α -ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico em 50% acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético) e secas à temperatura ambiente (25 °C).

As medidas foram realizadas com o espectrômetro de massas LT Microflex (Bruker Daltonics), usando o software FlexControl (versão 3.0, Bruker Daltonics). Os espectros foram gravados no modo linear positiva (frequência laser, 20 Hz; uma fonte de íons de tensão, 20 kV; tensão lente, 7,5 kV; faixa de massa, de 2 a 20 kDa). Para cada espectro, serão tiradas 240 espectros e 50 tiros de laser a partir de diferentes posições da amostra alvo (modo automático).

Os espectros foram então importados para o software Biotyper (versão 2.0, Bruker Daltonics), processados através de configurações-padrão, e os resultados apresentados em uma tabela de classificação. Essa classificação trata-se de um processo de correspondência de padrão proposto pelo fabricante Biotyper MALDI-TOF (MS), com pontuações que variam de 0-3. Pontuações menores que 1,7 são consideradas como baixa identificação; pontuações entre 1,7 e 1,9 são consideradas como ID confiável para gênero, e pontuações maiores que 1,9 são consideradas como ID confiável para identificação de espécies.

Figura 5 - Procedimento do isolamento de colônias, a partir do crescimento celular em meio seletivo contendo cloreto de cobre.

3.5.2 Identificação pela técnica de 16S - Extração de DNA e amplificação do gene da subunidade ribossomal menor (16S).

Foi realizada também a identificação molecular (gene 16S) das cepas isoladas. Os micro-organismos foram identificados através de extração do DNA baseando-se no protocolo de Chen; Kuo, (1993). A amplificação dos nucleotídeos do gene que codifica o RNAr 16S foi realizada através de PCR (reação de polimerização em cadeia) com o seguinte protocolo (tabela 04):

Tabela 4 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.

Reação	Volume
<i>ReadyMixTM Taq PCR Reaction</i>	25 µL
Mix com MgCl ₂	
DNA (50 ng)	1 µL
<i>Foward Primer</i> 10 uM	1 µL
<i>Reverse Primer</i> 10 uM	1 µL
Água grau PCR	19 µL
Volume final	50,0 µL

Os iniciadores utilizados foram 347F (5'-GGAGGCAGCAGTRRGAAT-3') e 803R (5'-CTACCRGGGTATCTAATCC-3'). A reação foi calculada para uma margem de segurança de 10% sendo que o volume final para cada reação foi de 50 µL. As amostras foram submetidas em um termociclador (Master Cycler, Eppendorf - Hamburg, Germany) com a 94 °C por 1 minuto e a 30 ciclos de:

- 94 °C por 30 segundos;
- 55 °C por 30 segundos;
- 72 °C por 60 segundos;
- 72 °C por 7 min.
- ∞ a 4 °C.

A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 0,8% de agarose, conforme descrito por (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A sequência obtida do gene 16S foi analisada pelo sequenciador de DNA ABI modelo 3130 (Applied Biosystems - Califórnia, EUA) e o kit de sequenciamento ABI Prism (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit V 3.1, Perkin-Elmer). Estas sequências obtidas para as linhagens isoladas foram comparadas com sequências conhecidas do banco de dados (*Ribossomal Database Project* - RDP) e NCBI.

3.6 Identificação do gene de resistência *copA*

3.6.1 Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados baseando-se nas sequências das proteínas CopA depositadas no banco de dados UNIPROT. Dois softwares foram utilizados, primeiramente foi usado o software MEGA 7 (versão 7.0.14) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) para comparação das sequências e verificação das similaridades e regiões conservadas em sequências de proteínas.

Após o alinhamento e seleção das regiões conservadas das proteínas por suas similaridades, foi utilizado o software FastPCR (versão 6.5.80) (KALENDAR; LEE; SCHULMAN, 2014) para o desenho de iniciadores. Foi realizada a tradução das sequências de aminoácidos para as suas respectivas sequências de ácidos nucleicos e então o iniciador foi desenhado. Na tabela 05 abaixo encontra a lista de iniciadores desenhados com seus respectivos gêneros.

Tabela 5 - Sequências dos iniciadores desenhados para todos os gêneros isolados da mina de cobre, para a realização da investigação da presença do gene *copA*.

Nome	Sequência (5'-3')
CoprunF2*	GGASDTACTGGTRBCAC
CoprunR1*	TGNHGCATCATSGTRTCRTT
<i>Forward Citrobacter</i>	NCTNGGNATHCCNGTNATGGT
<i>Reverse Citrobacter</i>	DATNGGYTCNCCNGTNAGCA
<i>Forward Acinetobacter</i>	GNCTNTTYTCNTCNACNTGGGT
<i>Reverse Acinetobacter</i>	TCCACATNGANCGRTCYTGCCA
<i>Forward Pseudomonas</i>	TYGTNAAYGCNTCNGCNATGTC
<i>Reverse Pseudomonas</i>	CGNACYTCNCGRAACATNCCCA
<i>Forward Klebsiella</i>	CNTGGTTYGAYGARGCNATGCT
<i>Reverse Klebsiella</i>	GTNGGRTRTCNCCNGTNAGCA
<i>Forward Ralstonia</i>	YTGGACNGAYGARGAYCCNATGC
<i>Reverse Ralstonia</i>	GNGCRTANCCNGTNCGRGCCAT
<i>Forward Stenotrophomonas</i>	GCNCNTNTCNGAYCGNGGNATGT
<i>Reverse Stenotrophomonas</i>	ATNCCRTGNCCCATRTCNGCCA
<i>Forward Burkholderia</i>	GNGCRTANCCNGTNCGRGCCAT
<i>Reverse Burkholderia</i>	YTGGACNGAYGARGAYCCNATGC
<i>Forward Rhodococcus</i>	GNCAYGGNACNGCNACNATGGA
<i>Reverse Rhodococcus</i>	TNCCNGTYTGNGCRTCYTCNACC
<i>Forward Bacillus</i>	THACNTTYGCNGTNTGGATC
<i>Reverse Bacillus</i>	DATCATNACNACRTCNAGNCCCA
<i>Forward Enterobacter</i>	CNATGAARCGNTTYCGNTGGCA
<i>Reverse Enterobacter</i>	GDATNGGYTCNCCNGTNAGCA
<i>Forward Cupriavidus</i>	YTGGACNGAYGARGAYCCNATGC
<i>Reverse Cupriavidus</i>	CRTCNAGRRTGTNCGNGCCAT

3.6.2 Amplificação do gene *copA*

A amplificação dos nucleotídeos do gene que codifica CopA foi realizada através de PCR (reação de polimerização em cadeia) com o seguinte protocolo na tabela 06:

Tabela 6 - Protocolo de concentração dos reagentes utilizados para a reação de PCR.

Reação	Volume
<i>ReadyMixTM Taq PCR Reaction</i>	25 µL
Mix com MgCl ₂	
DNA (50 ng)	2 µL
Foward Primer 10 uM	2 µL
Reverse Primer 10 uM	2 µL
Água grau PCR	19 µL
Volume final	50,0 µL

A reação foi calculada para uma margem de segurança de 10% sendo que o volume final para cada reação foi de 50 µL. Em um termociclador (Master Cycler, Eppendorf Hamburg, Germany) as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo de reação 94°C por 3 min e então a 30 ciclos de:

- 94 °C por 1 minuto
- 53 °C por 1 minuto
- 72 °C por 2 minuto
- 72 °C por 7 minuto
- ∞ a 4 °C.

A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 0,8% de agarose, conforme descrito por (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.7 Mínima concentração inibitória (MIC)

O teste de mínima concentração inibitória (MIC) foi realizado com objetivo de escolher as concentrações de cobre que foram utilizadas para o cultivo o qual foram extraídas as proteínas. Para isso, utilizaram-se tubos cônicos em volume final de 30 mL com concentrações crescentes de cloreto de cobre (1mM, 3mM, 5mM e 7 mM) em meio MJS líquido. A densidade ótica (DO) teve início em 0,1 ($\lambda=600$ nm) e após 8h de cultivo, a DO foi lida novamente. A cada concentração de cobre diferente, o espectrofotômetro foi zerado com uma solução controle, pois com o aumento da concentração de cobre a coloração do meio MJS tornava-se mais azul.

3.8 Proteômica

Como dito anteriormente, a proteômica tem sido empregada em muitos estudos de microbiologia ambiental e têm tido um grande impacto nos campos da biodegradação e biorremediação (KIM et al., 2007) por ser uma técnica efetiva que permite a identificação das proteínas envolvidas nestes processos, bem como de suas funções. Através da proteômica é possível saber quais proteínas estão sendo realmente expressas num determinado momento, por uma determinada célula (análise do proteoma).

A Figura 06 representa o fluxograma das atividades desenvolvidas para o estudo do proteoma.

Figura 6 - Fluxograma das atividades que foram desenvolvidas no laboratório após o isolamento dos micro-organismos em cobre.

3.8.1 Preparação das amostras

As bactérias resistentes ao cobre foram crescidas em meio MJS (controle) e em meio MJS acrescido de cloreto de cobre em diferentes concentrações (65 a 450 ppm). A extração das proteínas foi realizada conforme descrito por Plesa et al., (2006). As células

foram centrifugadas (Hitachi, CR22N - Tóquio, Japão) a 6000 rpm, o precipitado lavado uma vez com o mesmo volume de água e ressuspensionado em 10 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 8) suplementado com EDTA (1mM) e inibidor de protease (Sigma). As células foram rompidas por sonicação [Digital Sonifier 450, Branson – Danbury, EUA] (cinco vezes com pulsos de 30 s no modo *on* e 1 min no modo *off*) em gelo. O extrato foi então clarificado por centrifugação durante 30 min a 15.000 rpm e 4 °C. A fração sobrenadante, contendo as proteínas solúveis foram utilizadas imediatamente ou estocadas a -20 °C.

3.8.2 Eletroforese 2D

A eletroforese 2D foi realizada segundo Santos et al., (2005). Para a focalização isoeletrica, as amostras de proteínas (aproximadamente 250 µg) foram diluídas em 250 µL de tampão 1 (GE Healthcare - Nova York, Estados Unidos) e aplicadas em fitas imobilizadas (Immobiline Dry Strip, 13 cm) com gradiente de pH variando de 3 a 10 por 16 horas. Para a primeira dimensão foi utilizado o Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) com focalização isoeletrica realizada em 4 etapas (500 V até o acúmulo de 500 V.h, 1000 V até o acúmulo de 800 V.h, 6000 V até o acúmulo de 7000 V.h e 8000 V até o acúmulo de 16000 V.h). Após a completa focalização isoeletrica, as fitas de IPG foram incubadas em solução de equilíbrio por 15 min. A segunda dimensão foi realizada em um gel SDS PAGE 12% utilizando um sistema GE Healthcare (SE 600 Ruby, 14x16 cm).

Os géis contendo as proteínas foram corados com azul de Coomassie, escaneados e analisados por um sistema de aquisição de imagens conectado a um micro computador. As imagens foram analisadas através do software (Image Master Classic 2D, GE Healthcare).

3.8.3 Digestão com tripsina

Spots das proteínas de interesse foram recortados dos géis de poliacrilamida com tamanhos aproximados de 1 mm³. Para a descoloração, os *spots* recortados foram inseridos em tubos do tipo *ependorf* e lavados com tampão de lavagem por 4 horas, sendo este passo repetido mais uma vez por 16 horas. Após este passo, foram adicionados aos tubos 200 µL de 25 mM NH₄HCO₃ em 50% ACN (acetonitrila) sendo estes agitados intensamente por 10 min. Os *spots* descoloridos foram então secos por 30 min em um secador rotativo a vácuo – SpeedVac - (Hetodrywinner - MaxydryIyo). Para redução e alquilação foram realizadas as seguintes etapas: foram adicionados 40 µL (ou o suficiente para recobrir os fragmentos) de 10 mM de DTT em 25 mM NH₄HCO₃ e incubado por 1 hora a 56 °C, sendo o sobrenadante removido e o tubo deixado em temperatura ambiente.

Após este passo foi adicionado ao mesmo volume 55 mM de iodocetamida em 25 mM NH_4HCO_3 , incubado a temperatura ambiente por 45 min no escuro e agitando-se intensamente e ocasionalmente. Este sobrenadante foi removido e lavado com 100 μL de 25 mM NH_4HCO_3 e agitado intensamente por 10 min. Para desidratar os pedaços do gel, foram utilizados 100 μL de 25 mM NH_4HCO_3 em 50% ACN, agitando-se intensamente por 5 min, removendo e descartando o sobrenadante. Os dois últimos passos foram repetidos e então os fragmentos dos géis foram secos com auxílio de um SpeedVac (Shevchenko et al., 1996).

A digestão com tripsina foi realizada utilizando o Kit *Trypsin Singles, Proteomics Grade* (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Alemanha) e o protocolo foi realizado conforme instruções do fabricante.

Após a digestão as proteínas foram secas por SpeedVac e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até análise em Espectrometria de Massas.

3.8.4 Identificação das proteínas através das massas dos peptídeos - “fingerprinting” - e busca em banco de dados

Os peptídeos foram ressuspensos em uma solução contendo 50% acetonitrila e 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) e transferidos para uma placa do MALDI-TOF/TOF utilizando uma solução matriz contendo 10 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvido em 1 mL de uma solução contendo 50% acetonitrila e 0,1% de TFA.

Todos os espectros foram obtidos usando ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (SUCKAU et al., 2003) com *Smartbeam*TM laser operando a 1 kHz Bruker (UltraFlex, Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA).

A ionização foi realizada no modo *positive reflected*, seguindo os parâmetros de voltagem do instrumento: *Fonte de íon 1*: 25,00 kV, *Fonte de íon 2*: 22,35 kV, *Lente*: 8,1 kV, *Refletor 1*: 26,45 kV, *Refletor 2*: 13,45 kV, *PIE delay* 110ns e supressão de matriz a $m/z < 500$.

Os dados foram registrados no alcance de m/z de 700 a 3.500.

A fragmentação do peptídeo foi realizada pela metodologia LIFT com os seguintes parâmetros do instrumento: *Fonte de íons 1*: 7,5 kV, *fonte de íons 2*: 6,8 kV, *Lente*: 3,5 kV, *Refletor 1*: 29,5 kV, *Refletor 2* : 13,95 kV, *LIFT 1*, 19,00 kV, *LIFT 2*: 2,9 kV e supressão matricial em $m/z < 500$.

A interpretação espectral e a sequência de peptídeos foram realizadas utilizando o software FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics - Massachusetts, EUA). Os espectros dos

peptídeos gerados foram analisados pelo software Mascot e comparados com o banco de dados do NCBI e UNIPROT.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação da diversidade bacteriana da área

Para identificação da diversidade bacteriana da mina de Sossego foi realizado coletas em locais diferentes da mina com diferenças de concentração de cobre. Sendo realizada uma coleta fora da mina, em uma área onde não havia ação da mineração (ponto L na figura 07).

Esta coleta foi realizada no mês de março de 2014 onde 15 amostras foram coletadas na mina de Sossego (Canaã dos Carajás, PA.). Na figura 07 estão marcados os pontos de coleta realizados na mina por foto de satélite. Destas 15 amostras, foram 10 amostras de solo (nomeadas de 1S a 14S) e 5 amostras líquidas (nomeadas de 5L a 15L). A figura 08 ilustra as fotos dos locais amostrados (as amostras de número 13S, 13L e 14S são variações do local 10 e a amostra 15 é representativa do fundo da cava de onde se extrai o minério de cobre processado pela Vale, por isso não há fotos representando estes locais).

Figura 7 - Representação dos locais de coleta e nomenclatura das amostras. (Fonte: Google Earth).

Figura 8 - As letras S, L e S+L representam respectivamente amostras sólidas, líquidas e amostras contendo partes sólida e líquida.

As letras ao lado do nome das amostras correlacionam com os pontos representados na figura 07.

Na tabela 07 estão os valores encontrados de metal nas amostras coletadas.

Tabela 7 - Tabela com valores de metais encontrados nas amostras líquidas e de solo coletadas na mina de Sossego.

Amostras	pH	Concentração (ppm)						
		Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
9L	6	0,91	0,49	0,45	0,47	0,48	0,55	1,00
10L	5	0,91	0,49	15,56	0,53	0,86	0,85	0,76
11L	5	0,91	0,49	0,64	0,50	0,56	0,56	0,79
5L	7	0,91	0,49	1,44	1,63	0,49	0,56	0,87
Solo	-	0,00	0,70	117,00	959,50	24,50	0,00	5,00
1S	-	22,36	29,83	65,59	670,18	26,43	41,08	46,63
2S	-	22,04	30,43	62,04	862,29	27,29	41,94	51,41
3S	-	22,47	30,93	83,47	1187,38	27,63	46,52	45,94
4S	-	0,00	0,55	144,00	125,00	1,00	0,00	3,50
5S	-	22,55	30,17	49,53	1082,24	26,50	45,21	45,76
8S	-	22,14	29,52	41,25	543,72	35,82	38,26	47,65
10SL	-	22,30	30,73	664,62	2057,80	38,97	45,56	49,59
13 S	-	22,52	30,94	414,45	2141,54	41,35	47,18	45,10
14 S	-	22,09	30,19	1419,38	915,17	32,41	42,22	44,42

4.1.2 Extração DNA total

Para todas as amostras coletadas, foram realizadas tentativas de extração de DNA total, tanto das amostras líquidas como sólidas. No entanto, das 10 amostras de solo, foi possível fazer a extração de DNA total somente de 4 amostras, sendo uma de um solo controle sem presença de cobre. Das amostras 2, 3, 6, 14 não foi possível a obtenção de DNA (dados não mostrados).

As amostras 2, 3 e 6 foram coletadas em local onde depositam-se os rejeitos do processo de extração de cobre, às margens da lagoa. Este local apresenta um tipo de sedimento oriundo do processo de extração de cobre, de baixa granulometria, pouca matéria orgânica, baixa umidade, desprovido de cobertura vegetal e sujeito a grandes variações diárias de temperatura. Estas características podem explicar a ausência ou baixa diversidade de micro-organismos como comprovado pela baixa quantidade de DNA total extraído pelo método utilizado. Já a amostra 14 é proveniente de uma área de tratamento de efluente, através de precipitação, com alta concentração de cobre (1.419,38 ppm, tabela 07). Apesar de este local apresentar características mais amenas, comparadas aos outros locais analisados, e poder propiciar um aumento da microbiota, a alta concentração de cobre pode diminuir a microbiota ali presente. O cobre, em altas concentrações, é muito tóxico para células vivas, pois interage com grupos tiol livres, desestabiliza cofatores como ferro-enxofre, compete com outros metais na ligação em proteína, e, possivelmente, leva à formação de oxigênio reativo (CHILLAPPAGARI et al., 2010; HINIKER; COLLET; BARDWELL, 2005; MACOMBER; IMLAY, 2009). Deste modo, pode ser um fator de forte seleção na microbiota local impedindo o aumento desta comunidade e resultando em baixa quantidade de DNA extraído. Por outro lado, analisando-se o lado técnico da extração, a grande quantidade de cobre pode ter interferido na qualidade da extração de DNA. Como não temos parâmetros técnicos para avaliar a atividade do cobre nos reagentes presentes no kit de extração, esta hipótese também não pode ser descartada. O cobre tem o poder redutor e liga-se a tióis que são ácidos. Um trabalho realizado por Henneberger *et al.*, (2006) estudou a extração de DNA de solos ácidos vulcânicos utilizando o mesmo kit de extração PowerSoil DNA isolation (MoBio Laboratories) e também não obteve sucesso na extração.

Das amostras líquidas foram extraídos DNA de 3 amostras das 5 coletadas. As amostras de que não foi possível a obtenção de DNA, foram as amostras 9, 10. A amostra 9 foi coletada em local onde não havia muita matéria orgânica em suspensão e isso pode ter

acarretado uma diminuição dos micro-organismos, não sendo possível a extração de DNA deste local. A técnica de extração foi eficiente para algumas amostras (dados não mostrados). Por esta razão, acreditamos que a ausência de DNA está relacionada à ausência de micro-organismos no local.

4.1.2 PCR 16S

A primeira PCR realizada foi para amplificação da região V3 e V4 do gene 16S, e a segunda PCR para a ligação dos adaptadores NEXTERA XT. Observando a figura 09 é possível verificar que ambas as PCR obtiveram amplificação e a partir da reação em cadeia de polimerase foi possível realizar o sequenciamento na plataforma do MiSeq da Illumina.

Figura 9 - Géis de agarose realizado para verificação de amplificação do gene 16S por reação em cadeia de polimerase.

1- lagoa; 2- 10 liquido; 3- solo 4; 4- 11 liquido; 5- solo 13; 6- solo 5; 7- solo 8; 8- solo 10; 9- solo controle; CP- controle positivo; CN – controle negativo.

4.1.3 Diversidade da comunidade bacteriana

Ao analisarmos a diversidade microbiana em uma comunidade, são pontos chaves para descrevê-la adequadamente os aspectos como a diversidade filogenética e a diversidade funcional microbiana (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

Todas as amostras, tanto de solo quanto as amostras líquidas, tiveram em comum a presença do filo proteobacteria como o mais abundante. O mesmo resultado já foi descrito na literatura (BESAURY et al., 2013; PIRES, 2010; ELLIS et al., 2003). Dentro desse filo as classes mais abundantes foram: Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria, sendo o mais representativo a classe Betaproteobacteria, aparecendo em 6 amostras dentre as 9 amostras estudadas.

Utilizando o programa Metagenomics 16S, versão 1.0.1.0 (através da plataforma do Illumina), foi possível realizar o agrupamento das amostras baseando-se nos gêneros encontrados nas amostras (fig. 10).

Figura 10 - Diagrama de dispersão da análise de coordenadas principais (PCoA) separando as amostras em três grupos com similaridades quanto a gênero.

O diagrama de dispersão mostra uma análise de coordenadas principais (PCoA) da abundância relativa normalizada de todas as amostras, medindo a diferença da classificação taxonômica entre elas e, para este estudo foi utilizado a classificação taxonômica em gênero. A dispersão das amostras foi realizada em três grandes grupos, sendo que dois destes grupos foram separados em dois pequenos, podendo ser visualizado

com mais clareza no dendrograma, o qual mostra o agrupamento hierárquico das amostras baseando-se em classificações quanto a gênero, como mostra a figura 11.

A amostra que mostrou-se contendo uma diferença significativa da diversidade bacteriana, fazendo parte de um pequeno grupo isolado, foi a da lagoa. O gênero classificado mais representativo nesta amostra foi *Bacillus* (8,98%, figura 12). Este mesmo gênero já foi encontrado em trabalho realizado por Besaury et al. (2013), o qual realizou um estudo da diversidade bacteriana de sedimento marinho contaminado com cobre e também já foi encontrado em estudos de micro-organismos resistentes a cobre isolados de solo contaminado com metais tóxicos (ANDREAZZA et al., 2012; TUNALI; ÇABUK; AKAR, 2006).

Figura 11 - Dendrograma das amostras estudadas, agrupando por similaridade de gênero.

O agrupamento foi realizado conforme a semelhança de gêneros identificados pela sequência de 16S rRNA. A cor dos quadrados e dos colchetes são os mesmos encontrados no diagrama de dispersão.

Figura 12 - Gráfico de representatividade dos gêneros encontrados na amostra coletada da lagoa de rejeitos na mina de cobre Sossego – PA.

Muitos fatores influenciam na diversidade microbiana em diferentes habitats como, por exemplo: temperatura, umidade, nutrientes, pH, presença de contaminantes entre outros (BLACKWOOD et al., 2007; FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003; PIRES, 2010; ROESCH et al., 2007).

A amostra da lagoa, além de possuir um valor de cobre bem abaixo (0,45 ppm) do encontrado nas outras amostras, também possuía um valor de pH diferente das amostras líquidas coletadas, podendo estes serem os fatores que fizeram com que esta amostra apresentasse uma diferença significativa na diversidade bacteriana.

As amostras líquidas 10 e 11 juntamente com as amostras de solo 4, 5 e 8 foram agrupadas em um grande grupo com similaridades na diversidade microbiana encontrada. Deste grande grupo, as amostras de solo 8 e 5 foram as que apareceram diretamente ligadas com alto grau de similaridade. Estas amostras apresentaram *Limnobacter* como gênero mais representativo, com 14% e 19%, respectivamente (fig. 13). Além disso, apresentavam em comum quase a mesma concentração de cobre, 41 e 49 ppm e altas concentrações de ferro, 500 ppm e 1000 ppm, respectivamente, como ilustra a tabela 07.

A amostra de solo 4 também apresentou como gênero mais representativo o *Limnobacter*, porém com porcentagens mais baixa (7 %) que o encontrado nos solos 5 e 8 (fig. 13). Essa diferença significativa pode ser devido à alta concentração de cobre encontrada nesse solo (144 ppm) e baixa concentração de ferro (125 ppm).

As amostras líquidas 10 e 11 foram agrupadas neste grupo, porém elas não apresentaram alta similaridade entre elas (dendrograma, figura 11). A amostra líquida 10, assim como nas outras amostras deste grande grupo, apresentou como gênero mais representativo classificado o *Limnobacter* tendo uma porcentagem muito maior que as

outras amostras (26%). Já a amostra líquida 11 apresentou como gênero mais abundante classificado, o *Thiobacillus*, com representatividade de 8% (fig. 14). Ambas essas amostras possuíam o mesmo pH 5, porém os valores de cobre presentes nestas amostras podem ter favorecido esta diferença significativa na distribuição da diversidade bacteriana. A amostra 10 possuía 15 ppm de cobre, o que pode ter favorecido também para o aparecimento de *Limnobacter*. Assim como nas amostras de solo, nenhum estudo foi encontrado com este gênero na presença de metais tóxicos. Já a amostra 11 possuía baixas concentrações tanto de cobre como de ferro, 0,64 ppm e 0,50 ppm, respectivamente.

Figura 13 - Representação da diversidade bacteriana encontrada nas amostras de solo e líquida agrupadas por suas similaridades.

Figura 14 - Representação da diversidade bacteriana encontrada na amostra líquida 11.

As três últimas amostras analisadas e agrupadas por sua similaridade foram: solo 13 e 10 e o solo coletado fora da área de mineração, denominado de solo controle. Neste grupo foram encontrados os maiores valores de gêneros não classificados, aproximadamente 30% das sequências não tiveram classificação. Os solos 10 e 13 estão diretamente ligados com maiores similaridades, ambos apresentaram com maior representatividade o gênero *Runella* 4% e 8 %, respectivamente (fig. 15). Este gênero também apareceu nas amostras de solo 5 e 8, sendo em maior número nessas amostras. Todas essas amostras tinham em comum a presença de cobre e ferro, porém as amostras de solo 10 e 13 apresentaram concentrações muito mais elevadas. O solo 10 apresentou concentração de cobre 650 ppm e ferro 2000 ppm, já a amostra de solo 13 apresentou 400 ppm de cobre e 2141 ppm de ferro. Os valores elevados destes contaminantes podem explicar a diminuição da presença de *Runella* nestes solos. No entanto, esta é somente uma hipótese e neste sentido, nenhum estudo pôde corroborar com a hipótese deste gênero estar presente nestes solos pela presença de cobre.

Já o solo controle (coletado fora do perímetro da mina de cobre) apresentou diversidade bem diferente de todos os solos coletados de dentro da mina, tendo como gêneros mais abundantes, todos eles com aproximadamente 4%, os gêneros classificados *Koribacter*, *Chthoniobacter* e *Edaphobacter* (fig. 15). A análise de metais deste solo apresentou cobre e ferro em altas concentrações, 117 ppm e 959 ppm, respectivamente. Estes resultados mostram que não só presença de cobre é capaz de modificar a diversidade bacteriana, mas que a diferença dos gêneros encontrados dentro e fora da mina pode ser devida a ação da mineração e isto pode ter modificado a diversidade bacteriana nativa presente nesta área.

Figura 15 - Representação da diversidade bacteriana encontrada nas amostras de solo 10, 13 e solo controle agrupadas por suas similaridades.

A partir dos resultados da descrição da comunidade bacteriana proveniente da mina de cobre, será possível abrir caminhos para futuras pesquisas envolvendo biorremediação, biolixiviação e até mesmo bioprospecção de enzimas e compostos biotecnológicos.

4.2 Investigação do gene *cop A*

Das 21 bactérias isoladas da mina de Sossego (AVANZI et al., 2016) foram encontrados 11 gêneros distintos sendo eles: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Citrobacter*, *Cupriavidus*, *Klebsiella* e *Ralstonia*. Na figura 16 é possível ver a diversidade das bactérias isoladas e, dos 11 gêneros isolados o gênero mais representativo é o *Pseudomonas*, totalizando 6 cepas das 21 obtidas. Para os outros 4 gêneros também foram isolados mais de uma cepa, sendo eles: *Acinetobacter* (3 cepas), *Bacillus* (2 cepas), *Burkholderia* (2 cepas), *Stenotrophomonas* (2 cepas).

Figura 16 - Representação gráfica das bactérias isoladas da mina de Sossego. Isolamento seletivo utilizando cobre em diferentes concentrações e MJS como meio de crescimento.

Deste modo, para a investigação do gene de resistência *copA*, o critério de escolha de obtenção de uma cepa para cada gênero foi a máxima concentração de cobre que a cepa foi capaz de tolerar.

O gene *copA* é um dos genes determinantes na resistência ao cobre em bactérias (LEJON; PASCAULT; RANJARD, 2010). Por este motivo foi desenvolvido um estudo para detecção desses genes nas cepas isoladas da mina de Sossego. Para isso iniciadores foram desenhados baseando-se nas sequências das proteínas *copA* depositadas no banco de dados UNIPROT. Para cada gênero foi desenhado um iniciador diferente, pois com o iniciador degenerativo descrito na literatura (ALTIMIRA et al., 2012; LEJON et al., 2007; LEJON; PASCAULT; RANJARD, 2010) não obtivemos sucesso para estas cepas (Fig. 17).

Figura 17 - Gel de eletroforese em agarose comprovando a não eficácia do iniciador degenerativo descrito na literatura para amplificar o gene *copA*.

M- Marcador; A- *Acinetobacter*; B- *Burkholderia*; 6- *Enterobacter*; 89- *Bacillus*; 104- *Pseudomonas*; 59- *Stenotrophomonas*; 92- *Rodhococcus*; 86- *Citrobacter*; 87- *Cupriavidus*; 94- *Klebsiella*; 103- *Ralstonia*.

Através do gel de eletroforese foi possível verificar se houve amplificação do gene de resistência em algumas cepas (fig. 18). Das 11 cepas testadas 6 apresentaram amplificação para o gene *copA* e três delas não foram amplificadas. O fato deste gene não aparecer em todas as cepas resistentes a cobre já foi reportado em outros estudos. KUNITO et al., (1997) encontraram a distribuição deste gene em apenas 16% das bactérias isoladas de três diferentes solos e LEJON; PASCAULT; RANJARD, (2010) encontraram em 14% das bactérias isoladas, ou seja 37 cepas das 270 estudadas. Destas 37, 54% pertenciam ao gênero *Ralstonia* e 10% ao gênero *Bacillus*. Estes resultados mostram que nem todas as bactérias abrigam o gene de *cop* como um determinante na resistência ao cobre, e que podem existir outros mecanismos envolvidos na adaptação bacteriana frente ao cobre (KUNITO et al., 2001).

Figura 18 - Gel de eletroforese comprovando a amplificação do iniciador para o gene de resistência *copA*.

Ma- Marcador; A- *Acinetobacter*; B- *Burkholderia*; 6- *Enterobacter*; 89- *Bacillus*; 104- *Pseudomonas*; 59- *Stenotrophomonas*; 92- *Rodhococcus*; 86- *Citrobacter*; 87- *Cupriavidus*; 94- *Klebsiella*; 103- *Ralstonia*.

4.3 Proteômica

Das 21 bactérias isoladas, o estudo das proteínas expressas na presença de cobre foi realizado em duas cepas, que toleravam altas concentrações de cobre. A cepa identificada como *Acinetobacter* apresentou MIC no valor de 550 ppm e houve expressão para o gene de resistência *copA* e a cepa de *Enterobacter* apresentou MIC de 500 ppm de cobre (BALTAZAR, 2017) e na investigação do gene *copA* não houve amplificação, sugerindo que esta cepa possui outro mecanismo de resistência.

4.3.1 *Acinetobacter* sp.

A cepa isolada da mina de Sossego da amostra de solo 04 (a qual continha 144 ppm de cobre) foi tolerante a altas concentrações de cobre. A identificação foi realizada por

MALDI-TOF e posteriormente confirmada por amplificação do gene 16S rRNA. O espectro gerado pela técnica de espectrometria de massas (fig. 19) e comparado ao banco de dados resultou em um *score* de 2.6 para a *Acinetobacter pitii* e a identificação molecular resultou em 98% de similaridade com o mesmo gênero.

Figura 19 - Espectro de identificação realizado por espectrometria de massas (MALDI-TOF), baseando-se em fingerprint das proteínas ribossomais.

Para realização do gel de eletroforese 2D foi determinado primeiramente o MIC, para então realizar-se o cultivo em diferentes concentrações de cobre, com o intuito de extração e identificação das proteínas que pudessem conferir a resistência do micro-organismo à este metal.

Para realização do ensaio de MIC todas as absorbâncias dos cultivos iniciais foram padronizadas em 0,09 (DO 600 nm). Através da figura 20 é possível observar que a medida da absorbância dos cultivos aumentou até a concentração de 450 ppm, e apresentou o maior crescimento em 200 ppm de cobre. Até 300 ppm, houve crescimento celular em 6 h de cultivo e na concentração de 450 ppm, o cultivo levou em 72h para apresentar algum crescimento, sugerindo que esta concentração de cobre é tóxica a esta cepa. A partir de 550 ppm, o cultivo foi significativamente inibido pela presença do cobre (dados não mostrados).

Figura 20 - Gráfico de máxima absorbância alcançado pela cepa *Acinetobacter* sp. em diferentes concentrações de cobre.

A partir dos resultados do MIC, foi então realizado o estudo de proteômica nas seguintes condições:

- Cultivo sem cobre, a fim de comparar as proteínas expressas;
- Cultivo em 65 ppm de cobre por 6 horas;
- Cultivo em 200 ppm de cobre por 6 horas;
- Cultivo em 200 ppm de cobre por 24 horas;
- Cultivo em 450 ppm de cobre por 72 horas.

Para a identificação das proteínas a cepa *Acinetobacter* sp. foi cultivada primeiramente em meio MJS sem suplementação de cobre por 24 horas. Após esse período, as células foram transferidas para Erlenmeyers (250 mL) contendo meio MJS com e sem adição de cobre. Na concentração de 200 ppm de cobre, foram realizadas diferentes condições de cultivo, pois nesta concentração foi observado um maior crescimento. Deste modo, foram utilizados os crescimentos tanto na fase exponencial (6 h de cultivo) como na fase estacionária (24 h de crescimento), com o objetivo de verificar a diferença de expressão nas proteínas nas diferentes fases de crescimento.

Figura 21 - Categoria funcional de todas as proteínas identificadas em *Acinetobacter* em todas as condições de cultivos.

O crescimento celular e a viabilidade das células não foram modificadas quando a cepa foi exposta a até 200 ppm de cobre. Porém as expressões das proteínas essenciais para sobrevivência tiveram suas expressões alteradas. Das 44 proteínas que foram identificadas, 44% estão envolvidas em processos celulares e sinalização (fig. 21), tais como o *turnover* de proteína, chaperonas, parede celular e membrana.

Na eletroforese bidimensional foram utilizadas fitas de policrílimida para a separação das proteínas através dos pontos isoeletricos variando o pH de 3 a 10. O marcador molecular utilizado era de peso molecular de 90 kDa a 14,4 kDa (fig. 22).

Figura 22 - Gel de eletroforese bidimensional da cepa *Acinetobacter* sp em todas as condições de cultivos estudadas.

Com crescimento em meio MJS em A – sem cobre (controle); B – 65 ppm de cobre e 6h de cultivo; C – 200 ppm de cobre e 6 h de cultivo; D – 200 ppm de cobre e 24 h de cultivo; E – 450 ppm de cobre e 72 h de cultivo. Os *spots* numerados são os que foram recortados e digeridos com tripsina para posterior identificação por espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF).

4.3.1.1 Metabolismo

As proteínas de metabolismo são proteínas que estão envolvidas em consumo de carboidrato, metabolismo secundário como biossíntese e catabolismo, produção e conversão de energia.

Nos *spots* 11 (Piruvato diquinase), 20 (piruvato / 2-oxoglutarato desidrogenase), 24 (Malato-desidrogenase), 25 (Malato-desidrogenase), 26 (succinil-CoA sintetase subunidade beta), 32 (Acetil-CoA carboxilase), 35 (carboxilase biotina), 36 (serina hidroximetil transferase) e 41 (Succinil-CoA ligase) identificamos proteínas envolvidas no ciclo do ácido tri carboxílico (TCA- figura 23), ou seja, proteínas envolvidas na produção de energia.

Figura 23 - Esquema do ciclo de Krebs (fonte: Caygill, 2015).

No *spot* 14 foi identificada a proteína Diidrolipoil desidrogenase. Esta proteína participa de reações de óxido-redução dentro da célula, inclusive em reações do TCA (MITCHELL et al., 2014). A expressão destas proteínas não ocorreu simultaneamente em

todas as condições, porém era visto a presença de pelo menos uma dessas proteínas em diferentes géis em diferentes cultivos.

Duas proteínas foram encontradas na condição de cultivo de 200 ppm de cobre com 6 horas de crescimento que foram: Glutamato desidrogenase (*spot* 29) e Aspartato aminotransferase (*spot* 34). Essas proteínas estão envolvidas no uso de amino ácido como fonte de carbono, e no *spot* 37 foi identificado uma dTDP-glucose 4,6-dehydratase, sendo esta enzima responsável por utilizar a glicose como substrato (outra fonte de carbono). Com estes resultados podemos sugerir que a cepa *Acinetobacter* em sua fase exponencial na presença de cobre controla sua via metabólica para obtenção de energia e, utiliza-se de toda a fonte de carbono presente no meio MJS: glicose, glicerol e aminoácido. A expressão das proteínas relacionadas a obtenção de energia apresentou as principais mudanças em relação ao controle. Com isso ela poderia obter uma resposta ao estresse causado pela presença do metal tóxico. Já foi visto na literatura que a mudança de temperatura pode estimular diferentes caminhos metabólicos a partir do uso de diferentes carboidratos. Assim, mais energia seria rapidamente gerada para superar o estresse causado pelo frio (SARDESAI; BABU, 2001). A presença de metal deve ser entendida como um estresse para a célula, que solicita mais energia para produzir proteínas e construir estruturas intra e extracelulares para apoiar e evitar a desestabilização celular pelo cobre. Essa mesma regulação de proteína no metabolismo de carboidratos, também já foi observada em *Pseudomonas fluorescens* quando na presença de excesso de metal (POIRIER et al., 2014).

Outras quatro proteínas foram identificadas como proteínas de metabolismo (tabela 08 e 09), todas elas foram encontradas na condição de 200 ppm de cobre e 6 horas de cultivo sendo elas: alquil sulfatase (*spot* 28, encontrada também em 65 ppm de cobre e 6 horas de cultivo), inosina-5-monofosfatase desidrogenase (*spot* 19), e ATP sintase subunidade α (*spot* 22) e subunidade β (*spot* 23), encontrada também em 200 ppm de cobre e 24 horas de cultivo). Normalmente, os micro-organismos utilizam uma série de sulfatases, com diferentes especificidades de substrato, com objetivo de usar ésteres de sulfato como carbono e/ou como fonte de enxofre (HAGELUEKEN et al., 2006).

A proteína inosina (*spot* 19) participa do primeiro passo de formação de nucleotídeo de guanina, sendo esta responsável pela formação da biossíntese de GMP monofosfato (GEER et al., 2010). Consequentemente esta proteína desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento celular. As proteínas ATP sintase (β e α subunidades) são proteínas que tem como função produzir ATP a partir de ADP, sendo a

subunidade α a responsável por controlar esse mecanismo. A acentuada expressão dessas proteínas geradores de energia corrobora o fato que para enfrentar o estresse causado pelo cobre a cepa *Acinetobacter* sp. pode regular suas vias metabólicas de forma a gerar energia.

Após 24 h de crescimento foi identificada uma proteína fundamental na via glicolítica: a enolase (*spot* 42). A presença desta proteína mostra que mesmo na fase estacionária, a glicose ainda continuava sendo usada como fonte de carbono para geração de energia. Um estudo realizado por Sharma et al. (2006) mostrou que o mesmo fato foi observado em uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

Tabela 8 - Proteínas identificadas por MALDI- TOF/TOF da cepa isolada *Acinetobacter* sp. em diferentes condições de cultivo sem cobre e com cobre adicionado.

<i>Spot</i>	PM	PI	Proteína Identificada	Score	Categoria Funcional
1	23400	7,8	Peroxirredoxinas	138	CPS
2	37262	9,14	Proteína hipotética conservada	181	FU
3	35518	8,09	flavoproteína de transferência de elétron	90	CPS
4	42162	7,54	Proteína de membrana externa Omp 38	112	CPS
5	42162	7,54	RNA polimerase DNA-dependente, subunidade α	97	ISP
6	48296	7,55	Fator de elongação Tu 1	184	CPS
7	57867	8,18	Fator trigger	88	CPS
8	59215	7,97	Chaperonina	129	CPS
9	67105	7,86	Proteína ribossomal 30S S1	134	CPS
10	67105	7,86	Fator de elongação G	161	CPS
11	80545	7,7	Piruvato, diquinase	153	M
12	76379	7,29	Receptor de sideróforo TonB-dependente	177	CPS
13	73397	6,45	Proteína hipotética F928_02447	129	FU
14	53302	6,01	Diidrolipoil desidrogenase	130	M
15	13250	5,52	Hfq proteína de ligação a RNA	103	ISP
16	28106	8,84	Proteína de resistência associada ao precursor Carbapenem	115	CPS
17	72551	8,47	Chaperona dnaK	233	CPS
18	72079	5,12	Alquil sulfatase	185	M
19	57495	5,98	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase	90	M
20	54498	6,33	Piruvato / 2-oxoglutarato desidrogenase	98	M
21	47182	6,22	Proteína de ligação íon metálica ABC transportadora	83	M
22	54162	7,65	ATP sintase subunidade α	113	M

Tabela 9 - Continuação tabela 08.

<i>Spot</i>	PM	PI	Proteína	Score	Categoria funcional
23	52191	7,89	ATP sintase subunidade β	112	M
24	32155	8,16	Malato-desidrogenase	84	M
25	92770	7,33	Acetil-CoA carboxilase	250	M
26	40634	8,14	Succinil-CoA sintetase subunidade beta	156	M
27	63742	5,87	Proteína de resistência a cobre A	95	CP
28	42270	6,41	Histidina - tRNA ligase	96	ISP
29	42270	6,41	Glutamato desidrogenase	87	M
30	10741	5,96	Proteína de ligação a DNA <i>cold-shock</i>	77	CPS
31	14345	6,87	Proteína ribossomal 30S S6	100	CPS
32	15299	7,63	Acetil-CoA carboxilase, a proteína transportadora de biotina carboxilas	82	M
33	14040	6,04	Proteína hipotética ABSDF3489	82	FU
34	54331	7,16	Aspartato aminotransferase	261	M
35	53557	7,29	Carboxilase biotina	142	M
36	49143	7,23	Serina hidroximetil transferase	83	CPS
37	38639	7,84	dTDP glicose-4,6-desidratase	99	M
38	35246	8,11	Proteína de resistência a cobre B	199	CP
39	16594	6,95	Proteína ribossomal 50S L9	204	CPS
40	37956	7,56	Fator de elongação Ts	104	CPS
41	43336	7,91	Succinil-CoA ligase (formação ADP) subunidade β	402	M
42	46604	7,86	Enolase	130	M
43	55115	7,49	Chaperonina GroEL	92	CPS

PM- peso molecular; PI – ponto isoeletrico; M - Metabolismo; CPS – Processo celular e sinalização; ISP – Armazenamento e processamento de informação; FU – Proteínas hipotéticas; CP – Proteína de cobre; Score – aceitável acima de 80.

Uma outra proteína de membrana foi encontrada no *spot* 3 e identificada como flavoproteína de transferência de elétrons. Esta proteína é um aceptor de elétrons para desidrogenases específicas, transferindo elétrons para o sistema respiratório (FINN et al., 2014). Em outras palavras, esta proteína está relacionada a produção de energia na célula. Outras duas proteínas com função de produzir energia e localizadas na membrana foram identificadas como ATP sintase subunidade α e β . A expressão dessas proteínas induzidas pela presença do cobre refletiria a intensa energia despendida para sobreviver à estes compostos tóxicos.

4.3.1.2 Processamento celular e sinalização

A primeira proteína expressa em todas as condições de cultivo (fig. 24) encontrada no *spot* 1, é uma proteína essencial envolvida na defesa celular para o estresse oxidativo chamada de peroxiredoxina (GEER et al., 2010).

Figura 24 - Região no mapa de eletroforese 2D mostrando a expressão da proteína peroxiredoxina recortada no *spot* 1, encontrada em todas as condições de cultivo.

Sete proteínas envolvidas com a biossíntese de proteínas foram identificadas: fator de elongação Tu, 30S ribossomal S e S6, fator de elongação G, 50S ribossomal fator de elongação Ts e histidina-tRNA ligase. Essas proteínas apareceram nos cultivos sem cobre e com cobre, mas tiveram suas expressões aumentadas quando foram expostas ao metal. Uma explicação para isso pode ser o fato que com cobre, a bactéria tenha que produzir mais proteínas para tolerar o estresse causado. Por isso três chaperonas foram identificadas em *Acinetobacter* sp. (*spots* 7, 8 e 17). As proteínas da família das chaperonas têm como função auxiliar no dobramento de outras proteínas, com auxílio de ATP (figura 25), este processo pode ocorrer durante a síntese de novas proteínas ou quando a célula encontra-se em estresse (MITCHELL et al., 2014).

Figura 25. Esquema de funcionamento das proteínas da grande família chaperona (fonte: Moran, 2011)

Outras três proteínas relacionadas às condições de estresse foram expressas em *Acinetobacter* sp. quando esta foi cultivada na presença de cobre. São elas: proteína de membrana associada a resistência carbapenem (*spot* 16), a proteína *cold-shock* (*spot* 30) e a chaperonina GroEL (*spot* 43). A proteína carbapenem desempenha um papel na resistência aos antibióticos e transporte de ornitina (MUSSI et al., 2007). Em um estudo realizado com *Acinetobacter baumannii* houve a expressão da mesma proteína quando esta cepa foi cultivada com LB acrescida de ferro (NWUGO et al., 2011). A proteína *cold-shock* geralmente é expressa quando as bactérias são crescidas em temperaturas abaixo de suas condições ótimas, sendo responsável pela regulação nas taxas ou na extensão da transcrição (ERMOLENKO; MAKHATADZE, 2002). Esta proteína também foi encontrada em outro estudo realizado por Bagwell et al., (2010) com uma cepa de *Kineococcus* em resposta também a exposição ao cobre. No *spot* 43 foi identificada a proteína chaperonina GroEL. Esta proteína tem sua expressão induzida quando a célula encontra-se em período de estresse e tem como função prevenir o dobramento incorreto, promovendo a montagem correta dos polipeptídeos desdobrados durante o período de estresse celular (FINN et al., 2014). Esta proteína foi encontrada apenas no cultivo de 450 ppm de cobre e 72 h de exposição ao composto tóxico, podendo ser uma proteína que auxilia na sobrevivência desta cepa frente ao cobre, sendo assim, uma proteína relacionada a resistência.

A proteína TonB sideróforo identificada no *spot* 12 é uma proteína que interage com as proteínas receptoras da membrana externa e faz a absorção de substratos específicos para o espaço periplásmico (absorção dependente de energia gerada pela força

motriz) (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014) Alguns exemplos são: quelatos férricos, vitamina B12, complexos de níquel e carboidratos (NOINAJ et al., 2010). Alguns estudos propuseram a participação de proteínas da família de transporte TonB-dependente no transporte de cobre para dentro da célula (ARGÜELLO; RAIMUNDA; PADILLA-BENAVIDES, 2013), baseando-se em análises fenotípicas (HASSANI et al., 2010; KOCH et al., 2000; LEWINSON; LEE; REES, 2009; ODERMATT et al., 1993; TOTTEY et al., 2012).

No *spot* 4 foi identificada uma proteína de membrana 38 (Opm38), sendo esta proteína da família das porinas. Estas proteínas funcionam como um filtro molecular de substâncias hidrofílicas, isto é, proteínas dessa família tem um papel importante no transporte pela membrana de nutrientes e íons ao periplasma (GALDIERO; GALDIERO; PEDONE, 2007). Em bactérias Gram-negativas, o mecanismo de resistência a compostos tóxicos está envolvido com a alteração da permeabilidade da membrana (DI MODUGNO et al., 1994) e a expressão desta proteína Opm38 em todas as condições de cultivo pode estar envolvida no mecanismo de resistência ao cobre (fig. 26).

Figura 26 - Localização da proteína Opm38 (*spot* 4) em todos os géis de eletroforese bidimensional de todas as condições de cultivo.

A proteína identificada no *spot* 21, proteína de ligação íon metálica ABC transportadora, fica localizada no periplasma (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014). A família destas proteínas está envolvida em importação e exportação de uma ampla variedade de substratos que podem variar de nutrientes a osmoprotetores como pequenos açúcares, aminoácidos, pequenos peptídeos a metais, ânions, quelantes de ferro (sideróforos) e vitamina B12 (DAVIDSON; CHEN, 2004). Em bactérias, esse sistema é essencial na entrada de nutrientes (SAURIN; HOFNUNG; DASSA, 1999). Em *Synechocystis* sp. (cianobactérias) esta proteína é um canal de entrada no periplasma de metais como Mn, Zn e Fe (BANERJEE et al., 2003; RUKHMAN et al., 2005). Na cepa de *Acinetobacter* sp., deste estudo, a proteína ABC transportadora foi expressa na presença de

60 ppm de cobre e, portanto, podemos sugerir que, provavelmente este seja o primeiro passo para entrada do íon de cobre na célula.

4.3.1.3 Armazenamento e processamento de informações

Proteínas envolvidas em armazenamento e processamento de informação são proteínas envolvidas em processamento e modificação de RNA, replicação, recombinação e transcrição.

Na cepa isolada da mina de cobre *Acinetobacter* sp. e estudada neste trabalho, foi identificada uma única proteína deste grupo funcional. Localizada no *spot* 15, foi identificada a proteína de ligação a RNA Hfq. Esta proteína é uma chaperona de RNA que se liga a pequenos RNAs (sRNAs) funcionando como um regulador na pós-tradução de mRNA em resposta ao estresse (e podem se ligar também, com alta especificidade, a RNA transportador) (FINN et al., 2014)

4.3.1.4 Proteínas hipotéticas

Três proteínas hipotéticas foram identificadas e através do banco de dados *Conserved Domain Database* (CDD) foi possível encontrar domínios conservados para estas três proteínas.

No *spot* 2 foi encontrado um domínio conservado para proteínas da família das porinas, como a proteína Omp38, identificada no *spot* 4. Esta proteína também foi encontrada em todas as condições de cultivos (fig. 27).

Figura 27 - Gel de eletroforese bidimensional de todas as condições de cultivo, mostrando a expressão da proteína hipotética no *spot* 2.

No *spot* 13 foi identificada uma proteína hipotética F928_02447, com domínio conservado para TonB, da mesma família da proteína identificada no *spot* 12. Todas essas proteínas são proteínas de membrana interna e, a identidade dessas proteínas sugere que os primeiros passos para resistência ao cobre seja a mudança da permeabilidade da membrana permitindo assim, a homeostase do cobre dentro e fora da célula.

A última proteína identificada teve expressão quando a cepa de *Acinetobacter* foi exposta a 200 ppm de cobre em 24 horas de cultivo, sendo identificada como proteína hipotética ABSDF3489 (*spot* 33). Esta proteína tem o domínio conservado para a superfamília da *raiA* (inibidor A associado ao ribossomo). Proteínas dessa família são expressas quando a célula se encontra em estresse. Elas se ligam a subunidades ribossômicas ajudando a neutralizar a codificação errada, reduzindo assim os erros de tradução (GEER et al., 2010).

4.3.1.5 Proteínas relacionadas a cobre

O sistema de homeostase do cobre pode ser diferente em bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas. O sistema de efluxo do cobre já foi bem estudado, caracterizado e identificado, porém o sistema de influxo ainda é pouco conhecido (ARGÜELLO; RAIMUNDA; PADILLA-BENAVIDES, 2013).

Na cepa estudada, duas proteínas relacionadas a cobre foram identificadas: proteína de resistência a cobre A, CopA (*spot* 27), e proteína de resistência a cobre B, CopB (*spot* 38). A presença desta proteína foi corroborada com o estudo realizado neste trabalho de investigação do gene *copA*, onde houve a amplificação deste gene na cepa usada para estudar a proteômica, como visto na figura 18.

Em *E. coli* a proteína CopA já foi bem descrita, sendo uma proteína do tipo P-type ATPase a qual age na extrusão do cobre em excesso no citoplasma. A proteína CopB ainda não foi descrita para espécie *E. coli* (FAN; ROSEN, 2002; PORTELLA et al., 2003; RENSING; GRASS, 2003; TOM-PETERSEN et al., 2003).

Em *Enterococcus hirae*, a qual o mecanismo de homeostase do cobre é o mais bem estudado até hoje, muitos trabalhos sugeriam que o sistema *cop* de regulação ao cobre funciona em duas condições. Primeiro, quando há pouca quantidade de cobre intracelular, a proteína CopA é ativada para entrada de cobre na célula, ou então quando há excesso de cobre intracelular, a proteína CopB é ativada para a extrusão do cobre (ODERMATT; SOLIOZ, 1995; SOLIOZ; STOYANOV, 2003).

Com base nestes dados, foi observado que a concentração de cobre de 200 ppm no meio extracelular é tóxica para a célula e, a cepa estudada então alteraria a permeabilidade da membrana, iniciando a expressão das proteínas de membrana externa (sendo esta então, provavelmente a primeira forma de absorção de cobre). Em 6 horas de cultivo a proteína CopA foi expressa, aumentando a concentração de cobre na parte interna da célula. O

crescente aumento da concentração de cobre no interior causou uma intoxicação na célula e então a proteína CopB começou a ser expressa para extrusão do excesso de cobre para o meio extracelular. Em 400 ppm de cobre a proteína CopA não teve expressão acentuada, apenas a proteína CopB. Estes resultados corroboram que o primeiro passo para homeostase do cobre na célula é realizado pelas proteínas de membrana e a CopB é expressa para remover o excesso de cobre (figura 28).

Figura 28. Possível mecanismo de homeostase do cobre realizado pela cepa *Acinetobacter pitii* isolada da mina de Sossego no Pará.

Com o auxílio do banco de dados STRING (SZKLARCZYK et al., 2015) foi possível relacionar a interação da proteína copA com a proteína copB em *Acinetobacter* ATCC (Id: 525244). O STRING é uma ferramenta que vêm sendo muito utilizada (CRESTANI, 2011; GUO et al., 2015; ZOU et al., 2015), pois se conecta a vários outros bancos de dados permitindo a visualização da interação direta entre as proteínas e associações funcionais (interação proteína-proteína, vias biológicas e funções moleculares).

A figura 29 ilustra a interação direta entre as proteínas CopA e CopB na cepa *Acinetobacter* ATCC. Os genes dessas proteínas são vizinhos e possuem uma co-ocorrência (podendo estar no mesmo operon assim como em *Enterococcus hirae*, já citado anteriormente).

A proteína copA para esta cepa depositada nos bancos de dados, possui interação com outras duas proteínas relacionadas ao cobre: CopR e CopS. A CopR é uma proteína

reguladora também, assim como CopA e CopB, e a CopS é uma proteína responsável por sinalização.

Essas duas proteínas têm interação com a CopA por possuírem genes vizinhos. A co-ocorrência de genes foram determinadas experimentalmente e as proteínas CopR e CopS podem ter ocorrido por fusão de genes.

Figura 29 - Interação entre as proteínas CopA e CopB analisada por STRING.

4.3.2 *Enterobacter* sp.

A cepa de *Enterobacter cloacae* isolada da amostra coletada de solo 13 (com concentração de cobre de aproximadamente 400 ppm), também teve seu estudo de proteoma realizado na presença de cobre. Esta bactéria foi isolada, identificada (fig. 30) e o estudo do MIC realizado por Baltazar, (2017). O valor de MIC encontrado para esta cepa foi de 500 ppm de cobre e, com isso foi possível realizar o cultivo para a proteômica nas mesmas condições realizadas pela cepa anterior.

Figura 30 - Espectro de identificação realizado por espectrometria de massas (MALDI-TOF), baseando-se em fingerprint das proteínas ribossomais.

Na figura 31 é possível visualizar o crescimento celular através do aumento da absorbância nos cultivos realizados para a extração de proteína. Assim, como na cepa *Acinetobacter* sp., houve um maior crescimento quando cultivada com 200 ppm de cobre. Por esta razão, os cultivos também foram realizados nesta concentração em 6 e 24 horas.

Figura 31 - Gráfico de máxima absorbância alcançado pela cepa *Enterobacter* em diferentes concentrações de cobre.

Das 38 proteínas selecionadas, digeridas com tripsina e identificadas no MALDI-TOF/TOF, 37% eram proteínas envolvidas em processamento celular e sinalização (fig. 32); 29% proteínas envolvidas no metabolismo celular, ou seja, responsável por pela quebra dos carboidratos e formação de ATP, geradoras de energia e 21% das proteínas identificadas eram proteínas hipotéticas, que podem ter funções encontradas através de domínios conservados.

Figura 32 - Categoria funcional de todas as proteínas identificadas em *Enterobacter* sp. em todas as condições de cultivos.

A figura 33 ilustra o gel de eletroforese bidimensional de todos os cultivos realizados para a cepa *Enterobacter coaccae*.

Figura 33 - Gel de eletroforese bidimensional da cepa *Enterobacter* sp em todas as condições de cultivos estudadas.

Com crescimento em meio MJS em A – sem cobre (controle); B – 65 ppm de cobre e 6 h de cultivo; C – 200 ppm de cobre e 6 h de cultivo; D – 200 ppm de cobre e 24 h de cultivo; E – 450 ppm de cobre e 72 h de cultivo. Os *spots* numerados são os que foram recortados e digeridos com tripsina para posterior identificação por espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF).

4.3.2.1 Metabolismo

As proteínas identificadas envolvidas com o metabolismo dos carboidratos e síntese de energia foram encontradas nos *spots*: 02, 05, 14, 15, 18, 23, 30, 31, 34 e 36 (tabela 10 e 11).

Nos *spots* 2 e 34 foram identificadas ATP sintase α e β subunidade, respectivamente. Além destas duas proteínas relacionadas à produção de energia (ATP), foi identificada também no *spot* 30 a proteína malato desidrogenase, sendo esta uma proteína envolvida no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA).

As outras proteínas identificadas estavam relacionadas às vias de degradação de carboidratos. A proteína fosfogliceromutase identificada nos *spots* 5 e 36 é uma proteína relacionada tanto à via glicolítica (quando a glicose é utilizada como fonte de carbono) como na gliconeogênese (quando não há presença de glicose e outros substratos contendo carbono são utilizados como fonte de energia) (FINN et al., 2014). Outras proteínas relacionadas à via glicolítica e à gliconeogênese foram identificadas nos *spots* 14 e 23. No *spot* 14 a proteína foi identificada como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e no *spot* 23 identificada como frutose-bifosfato aldolase. Como o meio de cultivo MJS possui uma ampla variedade de fontes de carbono como glicose, aminoácidos e glicerol, não foi possível afirmar, se estas proteínas expressas, que possuem a função tanto na via glicolítica como na gliconeogênese, estavam funcionando para uma via ou para a outra. No *spot* 31 foi identificada a fosfoglicerato quinase, uma proteína essencial à via glicolítica, utilizando como fonte de carbono a glicose.

A proteína do *spot* 15, oriunda dos cultivos de 60 ppm de cobre e 200 ppm após 24 horas, foi identificada como glicerol quinase, proteína esta responsável pela degradação de glicerol. O glicerol também era um dos componentes do meio MJS, e a presença desta proteína reforça a ideia que a cepa de *Enterobacter* utiliza-se de todas as fontes de carbono presentes para obtenção de energia.

A proteína do *spot* 18 encontrada apenas em 200 ppm de cobre e 6 horas de cultivo, foi identificada como arabinose 5-fosfato isomerase, proteína esta envolvida na via de degradação de carboidratos. Esta proteína necessita de metais como co-fatores, podendo ligar-se de forma seletiva e não covalente a qualquer íon metálico (JONES et al., 2014). A identificação desta proteína a relacionou com outro gênero (Tabela 10), mas este fato já foi reportado na literatura com o gênero *Enterobacter* na presença de metais (JASENEC et al., 2009; MARRERO et al., 2004).

Tabela 10 - Proteínas identificadas por MALDI- TOF/TOF da cepa isolada *Enterobacter* sp. em diferentes condições de cultivo sem cobre e com cobre adicionado.

Spot	PM	PI	Proteína Identificada	Score	Categoria Funcional	Gênero
1	39231	8,82	Porina	110	CPS	<i>Enterobacter</i>
2	50182	8,06	ATP sintase beta subunidade	178	M	<i>Enterobacter</i>
3	53184	7,78	Proteína 30S ribossomal S1	126	CPS	<i>Enterobacter cloacae</i>
4	44525	7,41	Fator de elongação Tu	173	CPS	<i>Escherichia coli</i>
5	28331	6,10	Fosfogliceromutase	120	M	<i>Enterobacter aerogenes</i>
6	37675	7,88	Proteína de membrana externa A (OmpA)	107	CPS	<i>Enterobacter cloacae</i>
7	37730	7,09	OmpA/MotB domínio	106	CPS	<i>Enterobacter</i>
8	39870	8,99	Proteína de membrana externa C (OmpC)	87	CPS	<i>Enterobacter cloacae</i>
9	16204	6,87	Proteína hipotética	127	FU	<i>Desulfovibrio putrefaciens</i>
10	15574	4,93	Proteína 50S ribossomal L9	89	CPS	<i>Enterobacter aerogenes</i>
11	14798	7,78	Proteína de membrana externa X	94	CPS	<i>Enterobacter sp.</i>
12	29059	7,68	Proteína hipotética	88	FU	<i>Enterobacter asburiae</i>
13	33053	7,99	ABC transportador ATP protein de ligação	98	CPS	<i>Silanimonas lenta</i>
14	36031	5,55	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	92	M	<i>Enterobacter cloacae</i>
15	56321	7,14	Glicerol quinase	184	M	<i>Enterobacter cloacae</i>
16	30269	6,16	Proteína hipotética, parcial	87	FU	<i>Escherichia coli</i>
17	20051	8,59	Regulador de transcrição, parcial	81	ISP	<i>Acinetobacter baumannii</i>
18	33921	6,76	Arabinose 5-fosfato isomerase	93	M	<i>Lentisphaera araneosa</i>
19	23007	6,06	Superoxide dismutase	89	CPS	<i>Enterobacter sp.</i>
20	82749	7,44	Proteína de membrana externa FepA	155	CPS	<i>Enterobacter</i>
21	49554	4,76	Serina endoprotease	112	CPS	<i>Enterobacter</i>
22	53738	4,58	Família regulador transcrição GntR	81	ISP	<i>Burkholderia cepacia complex</i>

Tabela 11 - Continuação tabela 10.

Spot	PM	PI	Proteína Identificada	Score	Categoria Funcional	Gênero
23	38214	5,70	Frutose-bisfosfato aldolase	112	M	<i>Enterobacter cloacae</i>
24	34412	5,49	Proteína primossomal DnaI	82	ISP	<i>Spiroplasma eriocheiri</i>
25	38264	7,17	Fator de elongação Tu, partial	151	CPS	<i>Enterobacter cloacae</i>
26	40132	7,70	Proteína GroEL, parcial	99	CPS	<i>Enterobacter cloacae</i>
27	69148	7,79	Chaperona molecular DnaK	141	CPS	<i>Enterobacter</i>
28	20519	6,79	Proteína hipotética	81	FU	<i>Aeromonas</i>
29	23541	6,87	Proteína hipotética CORMATOL_00724	85	FU	<i>Corynebacterium matruchotii ATCC 33806</i>
30	32659	6,69	Malato desidrogenase	110	M	<i>Enterobacter cloacae complex</i>
31	41249	7,07	Fosfoglicero quinase	152	M	<i>Enterobacter cloacae</i>
32	77112	7,42	Poliribonucleotídeo nucleotidiltransferase	104	ISP	<i>Enterobacter</i>
33	89354	7,54	Proteína de membrana externa BamA	110	CSP	<i>Enterobacteriaceae</i>
34	53760	6,68	ATP F0F1 sintase subunidade alpha, parcial	103	M	<i>Enterobacter cloacae</i>
35	19971	7,96	Proteína hipotética	81	FU	<i>Lactobacillus kunkeei</i>
36	20884	8,39	Fosfogliceromutase	86	M	<i>Ruminococcus sp.</i>
37	16996	6,64	Proteína hipotética	97	FU	<i>Enterobacteriaceae</i>
38	4980	6,50	Domínio de proteína NUDIX	84	CSP	<i>Bacillus cereus</i>

PM- peso molecular; PI – ponto isoeletrico; M - Metabolismo; CPS – Processo celular e sinalização; ISP – Armazenamento e processamento de informação; FU – Proteínas hipotéticas; Score – aceitável acima de 80

4.3.2.2 Processo celular e sinalização

De todas as proteínas de processamento celular e sinalização identificadas para *Enterobacter* sp., seis delas eram proteínas de membrana externa (Omp) da família das porinas, de bactérias Gram-negativas. Foram identificadas como: *spot* 01 porina, *spot* 6 OmpA, *spot* 7 OmpA e MotB, *spot* 8 OmpC, *spot* 11 OmpX e *spot* 33 Omp/BamA. Todas essas proteínas da família Omp são porinas que tem como função formar um canal na membrana externa permitindo a difusão passiva de pequenas moléculas e íons para o citoplasma (FINN et al., 2014). A proteína MotB está relacionada a motilidade celular, envolvida com um complexo que forma um canal de próton necessária para locomoção do flagelo, muito provável que o domínio OmpA sirva para ancorar o complexo com a membrana celular (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014), por isso as duas proteínas encontradas no *spot* 7.

As proteínas nos *spots* 1, 6 e 7 foram encontradas em todas as condições de cultivos e a proteína 11 foi expressa em todos os cultivos que foram suplementados com cobre, apresentando uma diferença significativa na expressão quando cultivado com 450 ppm de cobre (fig. 34).

Figura 34 - Gel de eletroforese bidimensional, mostrando a expressão da OmpX no *spot* 11.

Diferentes cultivos: a. 60 ppm de cobre e 6 horas de crescimento; b. 200 ppm de cobre e 6 h de crescimento; c. 200 ppm de cobre e 24 h de cultivo e em d. 450 ppm de cobre e 72 h de cultivo.

Nesta cepa estudada de *Enterobacter* isolada da mina de Sossego no Pará, não houve a expressão de proteínas envolvidas com a homeostase do cobre do tipo Cop como aquelas encontradas em *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli* e em *Acinetobacter pittii* (encontradas neste estudo). No estudo do gene *copA*, realizado neste trabalho, a bactéria *Enterobacter* também não apresentou a amplificação para este gene. Como reportado anteriormente, na bactéria *Escherichia coli* a primeira entrada de cobre para o periplasma é realizado por proteínas de membrana do tipo porinas (RADEMACHER; MASEPOHL, 2012). Esta proteína também foi expressa e identificada na cepa *Enterobacter* (*spot* 1) e além destas, ainda foram expressas mais 6 proteínas de membrana externa do tipo Omp, as quais são proteínas da família das porinas. Com isso, podemos supor que a homeostase do

cobre realizada por esta cepa seja realizada através destas proteínas, sendo elas então, responsáveis pela entrada e saída do cobre na célula (figura 35).

Figura 35. Possível mecanismo de homeostase do cobre realizado pela cepa *Enterobacter cloacae* isolada da mina de Sossego no Pará.

Um trabalho realizado por Nwugo et al., (2011) observou que em uma cepa de *Acinetobacter baumannii* a proteína OmpA poderia fazer um papel crucial na aquisição de ferro. Eles realizaram testes com cepas ATTC e mutantes e viram uma diferença significativa no crescimento destas cepas.

Nos *spots* 13 e 20 foram identificadas duas outras proteínas de membranas sendo elas, respectivamente: proteína de ligação ABC transportadora e receptor de membrana externa FepA. A proteína ABC transportadora está envolvida na importação e exportação de uma variedade de substratos variando de pequenos íons a macromoléculas. A principal função dessas proteínas é fornecer nutrientes essenciais às bactérias, sendo esta uma proteína específica de procariontes (MITCHELL et al., 2014).

A proteína FepA identificada no *spot* 20 faz parte da família das proteínas TonB. As proteínas pertencentes a esta família possuem função de ligação com alta afinidade e absorção (dependente de energia) com alguns substratos específicos como o ferro (podendo ser substratos com pouca permeabilidade). Como esta proteína tem função de receptora e está presente na membrana externa, ela pode ter a função molecular de combinar mensagens intracelulares e extracelulares para uma mudança na atividade celular (sinalização) (JONES et al., 2014).

Todas essas proteínas de membrana podem estar relacionadas à homeostase de cobre realizado pela cepa isolada *Enterobacter*, pois das 38 proteínas identificadas não foi encontrada proteínas relacionadas à resistência a cobre.

Outras quatro proteínas relacionadas à síntese de novas proteínas também foram identificadas, sendo elas: 30S ribossomal (*spot 3*), fator de elongação Tu (*spot 4 e 25*), 50S ribossomal (*spot 10*).

No *spot 19* foi identificada a proteína superoxide dismutase. Esta proteína tem como função de neutralizar os radicais que são normalmente produzidos dentro da célula e que são tóxicos para o sistema biológico (FINN et al., 2014).

No *spot 21* foi identificada a proteína serine endoprotease. Esta proteína tem o domínio conservado para PDZ tripsina-serine endoprotease. As proteínas que possuem este domínio são oligoméricas e estão envolvidas na resposta ao choque térmico, função chaperona e apoptose (GEER et al., 2010).

No cultivo de 200 ppm e 24 horas de exposição ao cobre foram identificadas duas proteínas relacionadas às condições de estresse celular, encontradas nos *spots 26 e 27* (fig. 32). No *spot 27* foi identificada a chaperona dnaK. Esta é uma proteína induzida pela condição de estresse e funciona para proteger as proteínas no meio intracelular de agregação irreversível nos período de estresse celular (MITCHELL et al., 2014). Já a proteína identificada no *spot 26*, foi a proteína GroEL que tem como função prevenir o dobramento incorreto e promover a montagem correta dos polipeptídios desdobrados durante o período de estresse celular (figura 36). Após o período de 24 horas de exposição ao metal, estas proteínas foram expressas mostrando que estas são proteínas essenciais para resistência ao cobre, pois promovem o bom funcionamento intracelular após a exposição ao composto tóxico.

Figura 36. Esquema de funcionamento das proteínas DnaK e GroEL (fonte: Teter, S. e Hartl, 2001).

A última proteína identificada como sendo desta categoria funcional, foi encontrada no *spot* 38 e tem como domínio NUDIX. Esta proteína foi expressa apenas na presença de 450 ppm de cobre e 72h de cultivo. A função das proteínas que tem como domínio NUDIX é catalisar a hidrólise dos nucleosídeos difosfatos. Esta proteína pode ainda ter outros tipos de substratos sendo eles: trifosfatos de nucleósido intactos e oxidativamente danificados, polifosfatos de dinucleósido, açúcares de nucleótido e enzimas dinucleotídicas. Estes substratos são metabólitos ou moléculas de sinalização celular que requerem regulação durante diferentes estágios do ciclo celular ou durante períodos de estresse. A principal função desta enzima é remover o excesso de nucleotídeos dos reservatórios e manter a viabilidade celular, servindo assim como vigilância e enzimas de "limpeza doméstica" (GEER et al., 2010).

4.3.2.3 Armazenamento e processamento de informação

Duas proteínas com funções de regular a transcrição foram expressas e identificadas, sendo elas: regulador de transcrição parcial (*spot* 17) e GntR família de regulador de transcrição (*spot* 22). A expressão dessas proteínas na presença de cobre mostra que todo o processamento de informação, iniciando na formação de RNA usando DNA, é regulado para tolerar a presença de um composto tóxico.

A proteína identificada no *spot* 32 foi a poli-ribonucleotídeo nucleotídl-transferase. Esta proteína tem como função a degradação do RNA mensageiro na direção 3'-5'. Esta proteína controla também a qualidade do precursor do RNA ribossomal (GEER et al., 2010).

A proteína primossomal Dnal (*spot* 24) pertence a superfamília das proteínas AAA+ ATPases. As proteínas dessa superfamília têm uma variedade de funções. Algumas dessas funções podem estar relacionadas a processamento celular como: facilitar o dobramento e desdobramento de proteínas, montagem e desmontagem do complexo de proteínas, transporte e degradação de proteínas. Além dessas funções esta superfamília AAA+ ATPases tem como função também: a replicação, recombinação, reparação e transcrição (OGURA; WILKINSON, 2001).

4.3.2.4 Proteínas hipotéticas

Sete proteínas hipotéticas foram identificadas e utilizando-se do banco de dados Conserved Domain Database (CDD) foi possível encontrar domínios conservados para três proteínas.

No *spot* 9 foi identificada a proteína hipotética com domínio para a família MarR. Estas proteínas estão envolvidas na resistência a uma variedade de antibióticos, com um sistema de resistência não específico (GEER et al., 2010), podendo esta proteína estar envolvida também na resistência ao cobre, o qual é considerado um bactericida.

Já no *spot* 12 foi identificado o domínio conservado para uma proteína da superfamília PsiA, a qual faz parte de uma variedade de proteínas de enterobactérias. A função desta proteína ainda é desconhecida. No entanto, em *Escherichia coli* acredita-se que esta proteína possa inibir a geração de um sinal de SOS (BAGDASARIAN et al., 1986).

Nos *spots* 16 e 29 não foram identificados domínios para essas duas proteínas hipotéticas. Utilizando-se do banco de dados THE UNIPROT CONSORTIUM, (2014) também não houve a identificação de uma proteína com função específica, sendo considerada proteína não caracterizada. Como estas proteínas foram expressas no cultivo de 200 ppm de cobre e 24h de exposição ao metal, estas poderiam estar envolvidas a resistência ao metal. No entanto, esta hipótese não pôde ser confirmada.

Já no *spot* 28 foi encontrado um domínio para uma proteína reguladora de transcrição. Esta proteína também foi expressa na presença de 200 ppm de cobre e 24 horas de cultivo. A presença dessa proteína mostra que para tolerar o composto tóxico (cobre) esta cepa possui um sistema de controle de genes transcritos muito bem regulados.

A proteína hipotética encontrada no *spot* 35 tem o domínio conservado para *Helix-turn-helix* e possui qualquer função molecular que necessite de uma ligação seletiva e não covalente com DNA (GEER et al., 2010).

A última proteína hipotética identificada (*spot* 37) possui o domínio para Hcp (sistema de secreção). Essas proteínas são expressas até mil cópias por bactérias Gram-negativas e juntas elas se agregam e formam um tubo (figura 37) que irá realizar a secreção, podendo secretar até mesmo o cobre presente dentro da célula. Este mesmo tubo, pode ser utilizado pelas bactérias para penetrar outras bactérias, através de outra proteína de perfuração alocada na ponta deste tubo (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014). Sendo esta uma proteína de secreção e expressa em 450 ppm de cobre, ela poderia estar relacionada com a secreção do cobre quando este encontra-se em valores tóxicos dentro da célula.

Figura 37. Mecanismo de funcionamento de proteínas de secreção Hcp. Em verde mostrando a formação do tubo secretor (fonte: Basler, 2015).

5 CONCLUSÃO

A variedade da diversidade bacteriana encontrada nas amostras da mina de cobre Sossego, localizada no Pará, foi dependente do local coletado, da concentração de metais e do valor de pH. A classe mais abundante encontrada na mina de Sossego foi Betaproteobacteria.

Através do uso de software Metagenomics 16S foi possível separar as amostras por similaridades quanto aos gêneros presentes.

Considerando os valores de pH, houve diferença do gênero mais abundante encontrado nas amostras líquidas. Com pH 7 (encontrado na lagoa de rejeitos) o gênero mais abundante encontrado foi *Bacillus*. Já nas amostras líquidas 10 e 11 que possuíam o mesmo pH 5, houve diferença no gênero mais abundante possivelmente por causa da concentração de cobre. Na amostra líquida 11, onde a concentração de cobre e de ferro eram menores (0,64 ppm e 0,50 ppm respectivamente), o gênero mais abundante foi *Thiobacillus*. Já na amostra líquida 10, a concentração de cobre era 15 ppm e isso possivelmente possa ter favorecido o aparecimento do gênero *Limnobacter*.

Nas amostras de solo que possuíam valores entre 40 a 150 ppm de cobre, o gênero mais abundante encontrado foi *Limnobacter*. E nas amostras que possuíam altas concentrações de cobre (maiores que 400 ppm), o gênero mais abundante foi *Runella*. Possivelmente esta alta concentração de cobre (e também de ferro) fez com que permanecessem neste local apenas micro-organismos do gênero *Runella*, já que este mesmo gênero também foi encontrado nas amostras de solo 5 e 8 (onde o gênero mais

abundante foi o *Limnobacter*), porém a concentração de cobre e ferro eram mais baixas (40 ppm de cobre e 1000 ppm de ferro, aproximadamente).

A amostra coletada fora do local onde não havia a ação da mineração, também apresentou diferença na diversidade bacteriana, com isso podemos sugerir que não somente o pH e a concentração de metais, mas que a ação da mineração também pode ter ser um dos fatores responsáveis pela modificação da diversidade bacteriana nativa presente neste local.

Estes resultados da descrição da comunidade bacteriana da mina de cobre devem abrir caminhos para pesquisas futuras sobre biorremediação e biolixiviação, bem como bioprospecção de enzimas e compostos biotecnológicos.

Ao todo, foram isoladas da mina de Sossego 21 bactérias de 11 gêneros diferentes que foram capazes de tolerar altas concentrações de cobre. Com isso foram estudadas 11 bactérias (uma de cada gênero) quanto a presença do gene de resistência *copA*, onde 6 apresentaram resultado positivo para amplificação e 5 apresentaram resultado negativo, mostrando que este gene está presente em áreas de processamento de cobre.

Neste estudo também foi possível isolar duas cepas de gêneros diferentes que possuíam resistência à altas concentrações de cobre. Quando realizado o estudo de crescimento frente ao cobre, a cepa *Enterobacter* apresentou um maior crescimento que a cepa *Acinetobacter*. Como por exemplo, com 200 ppm de cobre e 6 h de cultivo a cepa *Enterobacter* apresentou uma absorvância ($\lambda = 600$ nm) de 1,573 e a cepa *Acinetobacter* apresentou absorvância de 0,454. Mesmo a cepa *Enterobacter* apresentando um desempenho melhor frente ao cobre, esta cepa não possui o gene de resistência *copA* e também não apresentou expressão de proteínas deste tipo.

Através da proteômica foi possível identificar dois mecanismos de resistência diferentes ao cobre. Foram identificadas 44 proteínas da cepa *Acinetobacter* e 38 proteínas da cepa *Enterobacter*. Para ambas as cepas foram identificadas proteínas com funções básicas, como proteínas de metabolismo, processamento celular, sinalização entre outras. Na presença de cobre, ambas as bactérias expressaram proteínas para utilizar mais de uma fonte de carbono como forma de gerar energia e poder sobreviver frente ao composto tóxico.

Além destas proteínas foi identificado ainda na cepa *Acinetobacter* sp. as proteínas de membranas externas (Omp) e também as proteínas de resistência ao do tipo CopA e CopB. As expressões dessas proteínas sugerem que o mecanismo de resistência desta

bactéria seja similar ao encontrado nas bactérias *Enterococcus*, onde a homeostase do cobre seria realizada com a entrada do cobre na célula pelas proteínas de membrana e pela *copA* e, quando o cobre atingisse a concentração tóxica dentro da célula, as proteínas de membrana e a proteína *copB* ficariam responsáveis pela extrusão do cobre em excesso.

Na cepa *Enterobacter* não houve expressão de proteínas relacionadas especificamente a resistência a metais e esta cepa também mostrou não possuir este gene. Porém muitas proteínas de membrana como as Omp foram expressas nesta bactéria. Uma das hipóteses de homeostase do cobre realizado pela *Enterobacter* seria realizada pelas proteínas de membrana do tipo porina, que fariam com que o cobre entrasse na célula quando este estivesse em valores tóxicos fora da célula assim como ocorre com *Escherichia coli*. Estas mesmas proteínas de membrana retirariam o cobre em excesso presente dentro da célula, quando este estivesse em valores tóxicos no citoplasma.

Deste modo, sugere-se que as cepas de *Acinetobacter* sp. e *Enterobacter* sp utilizadas neste trabalho, apresentam potencial para uso em aplicações de processos biotecnológicos, como recuperação de cobre em rejeitos industriais, pois ambas possuem mecanismo de resistência à este metal. Além disso, o conhecimento destas proteínas envolvidas na resistência destas bactérias na presença de cobre, poderá ser utilizado para melhorar o desempenho de bioprocessos voltados à remoção e reaproveitamento de metais.

REFERÊNCIAS*

- ALMÁRCEGUI, R. J. et al. New Copper Resistance Determinants in the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: A Quantitative Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 2, p. 946–960, 7 fev. 2014.
- ALTIMIRA, F. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 193, 2012.
- AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 5, p. 555–65, dez. 2000.
- ANDERSEN, J. S.; MANN, M. Functional genomics by mass spectrometry. **FEBS Letters**, v. 480, n. 1, p. 25–31, ago. 2000.
- ANDREAZZA, R. et al. PCR-DGGE analysis after Bioleaching Stimulation by Indigenous Microorganisms in Vineyards Soil and Copper Mining Waste. n. August, p. 84–87, 2010.
- ANDREAZZA, R. et al. Characterization of copper-resistant rhizosphere bacteria from *Avena sativa* and *plantago lanceolata* for copper bioreduction and biosorption. **Biological Trace Element Research**, v. 146, n. 1, p. 107–115, 2012.
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. November, p. 73, 2013.
- ATSDR, A. FOR T. S. AND D. R. **TOXICOLOGICAL PROFILE FOR COPPER**. Atlanta, USA: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>>. Acesso em: 18 maio. 2015.
- AUGUSTO DA COSTA, A. C.; DUTA, F. P. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 2001.
- AVANZI, I. R. **Estudo da atividade microbiana na biorremediação de metais tóxicos na região Amazônica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- AVANZI, I. R. et al. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–10, 2016.
- BAATH, E. Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Processes and Populations (a Review). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 47, p. 335–379, 1989.

- BAGDASARIAN, M. M. et al. An inhibitor of SOS induction, specified by a plasmid locus in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 15, p. 5723–5726, 1 ago. 1986.
- BAGWELL, C. E. et al. Proteomic and physiological responses of *Kineococcus radiotolerans* to copper. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 1–13, 2010.
- BAKER-AUSTIN, C. Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon “*Ferroplasma acidarmanus*” Fer1. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2637–2646, 1 ago. 2005.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon “*Ferroplasma acidarmanus*” Fer1. **Extremophiles**, v. 11, n. 3, p. 425–434, 8 maio 2007.
- BALTAZAR, M. D. P. G. **Estudo do potencial de bioabsorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae* isoladas de uma área de mineração**. Brasil: Universidade de São Paulo, 2017.
- BANCI, L. et al. Molecular recognition in copper trafficking. **Natural product reports**, v. 27, n. 5, p. 695–710, maio 2010.
- BANERJEE, S. et al. Structural determinants of metal specificity in the zinc transport protein ZnuA from *synechocystis* 6803. **Journal of molecular biology**, v. 333, n. 5, p. 1061–9, 7 nov. 2003.
- BASLER, M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1679, 2015.
- BESAURY, L. et al. Culture-Dependent and Independent Studies of Microbial Diversity in Highly Copper-Contaminated Chilean Marine Sediments. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 2, p. 311–324, 14 fev. 2013.
- BIONDO, R. **ENGENHARIA GENÉTICA DE *Cupriavidus metallidurans* CH34 PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES *Cupriavidus metallidurans* CH34 PARA A**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- BLACKWOOD, C. B. et al. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. In: **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. XVII–XVIII.
- BNDES; BNDES SETORIAL 13. **O Cobre Brasileiro em Ascensão no Cenário Mundial**. São Paulo: [s.n.].
- BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 198–207, 2000.

- CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos microbiológicos para Biotecnologia**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.redetec.org.br/publique/media/mct_recursos_biologicos.pdf>.
- CETESB. FIT - Ficha de Informação Toxicológica. **Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental**, n. li, p. 0–2, 2012.
- CHAIT, B. T. CHEMISTRY: Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? **Science**, v. 314, n. 5796, p. 65–66, 6 out. 2006.
- CHEN, B. Y. et al. Assessment upon azo dye decolorization and bioelectricity generation by *Proteus hauseri*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4737–4741, jun. 2010.
- CHEN, B. Y. et al. Deciphering simultaneous bioelectricity generation and dye decolorization using *Proteus hauseri*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 502–507, abr. 2012.
- CHEN, W. P.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 9, p. 2260, 11 maio 1993.
- CHILLAPPAGARI, S. et al. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 10, p. 2512–24, maio 2010.
- CRESTANI, J. **INFLUÊNCIA DA ALTERAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRO E COBRE NA FISIOLOGIA E PATOGENICIDADE DE *Cryptococcus gattii*: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS, 2011.
- DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 73, p. 241–268, 2004.
- DELL'AMICO, E. et al. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. **Microbiological Research**, v. 163, n. 6, p. 671–683, 2008.
- DI MODUGNO, E. et al. In vitro activity of the tribactam GV104326 against gram-positive, gram-negative, and anaerobic bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 2362–8, out. 1994.
- DOMINGUES, M. R. **Alinhamento de sequências biológicas com o uso de algoritmos genéticos**. [s.l: s.n.].
- DUKAN, S. et al. Coupling 2D SDS-PAGE with CNBr cleavage and MALDI-TOFMS: a strategy applied to the identification of proteins induced by a hypochlorous acid stress in

- Escherichia coli. **Analytical chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4433–40, 15 out. 1998.
- ELLIS, R. J. et al. Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3223–3230, 1 jun. 2003.
- ERMOLENKO, D. N.; MAKHATADZE, G. I. Bacterial cold-shock proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 11, p. 1902–1913, 1 nov. 2002.
- FAN, B.; ROSEN, B. P. Biochemical characterization of CopA, the Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46987–46992, 2002.
- FARIAS, J. O. G. DE. **MINERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO MINERAL** MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. [s.l: s.n.].
- FIERER, N.; SCHIMEL, J. P.; HOLDEN, P. A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 167–176, jan. 2003.
- FILALI, B. K. et al. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. **Current microbiology**, v. 41, n. 3, p. 151–6, set. 2000.
- FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D222–30, 1 jan. 2014.
- FUTCHER, B. et al. A sampling of the yeast proteome. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 11, p. 7357–68, nov. 1999.
- GALDIERO, S.; GALDIERO, M.; PEDONE, C. β -Barrel membrane bacterial proteins: structure, function, assembly and interaction with lipids. **Current protein & peptide science**, v. 8, p. 63–82, 2007.
- GEER, L. Y. et al. The NCBI BioSystems database. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D492–6, jan. 2010.
- GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 10–11, p. 1389–1414, 1998.
- GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L. R. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass spectrometry reviews**, v. 20, n. 1, p. 1–57, 2001.
- GRACIOSO; L. H. ; BALTAZAR; M. P.G.; AVANZI I. R.; KAROLSKI; B.; GIMENES; L.J.; NASCIMENTO; C.O.; PERPETUO; E.A. Proteome Analysis of Phenol-Degrading Achromobacter sp. Strain C-1, Isolated from an Industrial Area. **Current Proteomics**, v. 9,

n. 4, p. 280–289, 30 nov. 2013.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 1, p. 39–63; table of contents, mar. 2002.

GUO, Z. et al. Proteomic analysis of the copper resistance of *Streptococcus pneumoniae*. **Metalomics : integrated biometal science**, v. 7, n. 3, p. 448–54, 11 mar. 2015.

HAGELUEKEN, G. et al. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 20, p. 7631–6, 16 maio 2006.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245–9, out. 1998.

HARNETT, N. M.; GYLES, C. L. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 930–935, 1984.

HASSANI, B. K. et al. CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19330–7, 18 jun. 2010.

HENNEBERGER, R. M.; WALTER, M. R.; ANITORI, R. P. Extraction of DNA from Acidic, Hydrothermally Modified Volcanic Soils. **Environmental Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 100, 1 jan. 2006.

HENRY, S. et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 59, n. 3, p. 327–35, dez. 2004.

HINIKER, A.; COLLET, J.-F.; BARDWELL, J. C. A. Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33785–91, 7 out. 2005.

HUANG, X. et al. Environmental impact of mining activities on the surface water quality in Tibet: Gyama valley. **The Science of the total environment**, v. 408, n. 19, p. 4177–84, 1 set. 2010.

JASENEC, A. et al. Proteomic profiling of L-cysteine induced selenite resistance in *Enterobacter* sp. YSU. **Proteome science**, v. 7, n. 1, p. 30, 2009.

JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification.

Bioinformatics (Oxford, England), v. 30, n. 9, p. 1236–40, 1 maio 2014.

JUNG, J.; PHILIPPOT, L.; PARK, W. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. **Scientific Reports**, n. October 2015, p. 1–10, 2016.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1116, p. 271–302, 2014.

KAO, W. W.-C. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Metabolic Regulation by Copper Ions in *Methylococcus capsulatus* (Bath). **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51554–51560, 3 dez. 2004.

KAROLSKI, B. Metagenômica comparativa e perfil metabólico in silico de solos no município de Cubatão, SP. 2013.

KIM, S. IL; CHOI, J.-S.; KAHNG, H.-Y. A proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 11, n. 3, p. 280–94, jan. 2007.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. e1–e1, 1 jan. 2013.

KOCH, H.-G. et al. Roles of the ccoGHIS gene products in the biogenesis of the cbb3-type cytochrome c oxidase. **Journal of Molecular Biology**, v. 297, n. 1, p. 49–65, 2000.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.

KUNITO, T. et al. Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 709–717, 1997.

KUNITO, T. et al. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, n. 2, p. 95–102, 2001.

LACERDA, C. M. R.; REARDON, K. F. Environmental proteomics: Applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 75–87, 2009.

LALIOTI, V. et al. Molecular mechanisms of copper homeostasis. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 4878–903, jan. 2009.

- LEE, S. C.; HWANG, I. S.; HWANG, B. K. Overexpression of the pepper antimicrobial protein CaAMP1 gene regulates the oxidative stress- and disease-related proteome in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 234, n. 6, p. 1111–25, dez. 2011.
- LEJON, D. P. H. et al. Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, n. 3, p. 424–437, 2007.
- LEJON, D. P. H.; PASCAULT, N. N.; RANJARD, L. Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 2, p. 168–174, 2010.
- LEWINSON, O.; LEE, A. T.; REES, D. C. A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4677–82, 2009.
- LI, G. et al. Proteomic analysis of leaves and roots of common wheat (*Triticum aestivum* L.) under copper-stress conditions. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 4846–4861, 2013.
- LOK, C. N. et al. Proteomic identification of the *cus* system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 6, p. 2351–2356, 2008.
- LOPATINA, A. et al. Metagenomic analysis of bacterial communities of antarctic surface snow. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–13, 2016.
- LULI, G. W. et al. Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 846–854, 1983.
- MACOMBER, L.; IMLAY, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 20, p. 8344–9, 19 maio 2009.
- MARRERO, J. et al. Effect of high concentration of Co (II) on *Enterobacter liquefaciens* strain C-1: A bacterium highly resistant to heavy metals with an unknown genome. **Proteomics**, v. 4, n. 5, p. 1265–1279, 2004.
- MARTÍNEZ-BUSSENIUS, C. et al. Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. **Journal of Proteomics**, v. 145, p. 37–45, ago. 2016.
- MARTINEZ, P.; VERA, M.; BOBADILLA-FAZZINI, R. A. Omics on bioleaching: current and future impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 20, p.

8337–8350, 2015.

MELO, I. S. DE; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos e melhoramento - microrganismos. In: **Recursos genéticos e melhoramento - microrganismos**. [s.l: s.n.]. p. 743.

MERGEAY, M. et al. Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 385–410, jun. 2003.

MITCHELL, A. et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D213–221, 26 nov. 2014.

MONCHY, S. et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in Cupriavidus metallidurans strain CH34. **Microbiology**, v. 152, n. 6, p. 1765–1776, 2006.

MORAN, L. A. **Sandwalk: Heat Shock and Molecular Chaperones**, 2011. Disponível em: <http://sandwalk.blogspot.com.br/2007/02/heat-shock-and-molecular-chaperones.html>. Acesso em: 25 jul. 2017

MÜLLER, A. K. et al. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. **FEMS microbiology ecology**, v. 36, p. 11–19, 2001.

MUSSI, M. A. et al. CarO, an Acinetobacter baumannii outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. **FEBS letters**, v. 581, n. 29, p. 5573–8, 11 dez. 2007.

NAKAHARA, H. et al. Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 975–976, 1977.

NAKAYAMA, C. R. **Degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP), 2, 3, 4-triclorofenol (2,3 4-TCP) e 2, 6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente**. [s.l.] Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Ciências Biomédicas, 2005.

NANDAKUMAR, R. et al. Quantitative proteomic profiling of the Escherichia coli response to metallic copper surfaces. **BioMetals**, v. 24, n. 3, p. 429–444, 2011.

NG, I.-S. et al. Insights into copper effect on Proteus hauseri through proteomic and metabolic analyses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 178–185, fev. 2016.

NG, I. S. et al. Copper response of Proteus hauseri based on proteomic and genetic

- expression and cell morphology analyses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1057–1072, 2014.
- NOINAJ, N. et al. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 43–60, 2010.
- NWUGO, C. C. et al. Deciphering the iron response in *Acinetobacter baumannii*: A proteomics approach. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 1, p. 44–58, 2011.
- O'HALLORAN, T. V.; CULOTTA, V. C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25057–60, 18 ago. 2000.
- ODERMATT, A. et al. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12775–12779, 1993.
- ODERMATT, A.; SOLIOZ, M. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4349–54, 3 mar. 1995.
- OGURA, T.; WILKINSON, A. J. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 6, n. 7, p. 575–97, jul. 2001.
- ORELL, A. et al. Molecular Characterization of Copper and Cadmium Resistance Determinants in the Biomining Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus metallicus*. **Archaea**, v. 2013, p. 1–16, 2013.
- PAYNE, A. et al. Proteomic analysis of the response of *Listeria monocytogenes* to bile salts under anaerobic conditions. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 25–35, jan. 2013.
- PELLETT, S.; BIGLEY, D. V.; GRIMES, D. J. Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 328–332, 1983.
- PEPPER, I. L. et al. Bacterial populations within copper mine tailings: long-term effects of amendment with Class A biosolids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 569–577, set. 2012.
- PERPETUO, E. A.; BARBIERI, C.; OLLER NASCIMENTO, C. A. Engineering Bacteria for Bioremediation. In: ANGELO CARPI (Ed.). **Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology**

Applications. São Paulo: InTech, 2011. p. 605–632.

PIRES, C. **Bacteria in heavy metal contaminated soil: diversity, tolerance and use in remediation.** [s.l: s.n.].

PLESA, M. et al. The SlyB outer membrane lipoprotein of Burkholderia multivorans contributes to membrane integrity. **Research in microbiology**, v. 157, n. 6, p. 582–592, jan. 2006.

POIRIER, I. et al. Responses of the marine bacterium Pseudomonas fluorescens to an excess of heavy metals: Physiological and biochemical aspects. **Science of The Total Environment**, v. 6, n. 1–2, p. 76–87, nov. 2008.

POIRIER, I. et al. The effect of cold stress on the proteome of the marine bacterium Pseudomonas fluorescens BA3SM1 and its ability to cope with metal excess. **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 120–133, 2014.

PORTELLA, K. F. et al. Caracterização físico-química do lodo centrifugado da estação de tratamento de água Passaúna – Curitiba/PR. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2003.

RADEMACHER, C.; MASEPOHL, B. Copper-responsive gene regulation in bacteria. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, n. 10, p. 2451–2464, 2012.

RENSING, C.; GRASS, G. Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 197–213, 2003.

RODRIGUES, O. D. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Influência da comunidade microbiana do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de Atta sexdens rubropilosa Forel , 1908 (Hymenoptera : Formicidae) Ohana Daroszewski Rodri.** [s.l: s.n.].

ROESCH, L. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, n. 4, p. 283–290, 2007.

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

RUKHMAN, V. et al. The MntC crystal structure suggests that import of Mn²⁺ in cyanobacteria is redox controlled. **Journal of molecular biology**, v. 348, n. 4, p. 961–9, 13 maio 2005.

SABRY, S. A.; GHOZLAN, H. A.; ABOU-ZEID, D. M. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. **Journal of applied**

microbiology, v. 82, n. 2, p. 245–52, fev. 1997.

SAITOH, Y. et al. A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 284, n. 1, p. 33–43, jul. 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAMUELSON, P. et al. Staphylococcal surface display of metal-binding polyhistidyl peptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1243–1248, 2000.

SANTOS, K. et al. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*L.*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 85–91, jan. 2005.

SARDESAI, N.; BABU, C. R. Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism is affected by changes in respiratory enzymatic activities due to cold stress in two psychrotrophic strains of *Rhizobium*. **Current microbiology**, v. 42, n. 1, p. 53–8, jan. 2001.

SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; DASSA, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Journal of molecular evolution**, v. 48, n. 1, p. 22–41, jan. 1999.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Status of the Microbial Census. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 686–691, 1 dez. 2004.

SHARMA, S. et al. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 3, p. 374–382, 2006.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, jan. 1996.

SHOEB, E. et al. Horizontal gene transfer of stress resistance genes through plasmid transport. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1021–5, 2012.

SILVEIRA, G. L. L. **IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO INDUZIDA POR CHOQUE TÉRMICO EM *Herbaspirillum seropedicae***. [s.l: s.n.].

SILVER, S.; MISRA, T. K. Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. **Basic life sciences**, v. 28, p. 23–46, jan. 1984.

SOLIOZ, M.; STOYANOV, J. V. **Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*** **FEMS Microbiology Reviews**, 2003.

SOWELL, R. A. et al. Nanoflow LC/IMS-MS and LC/IMS-CID/MS of protein mixtures.

Journal of the American Society for Mass Spectrometry, v. 15, n. 9, p. 1341–1353, set. 2004.

SUCKAU, D. et al. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 376, n. 7, p. 952–65, ago. 2003.

SUN, X. et al. Putative copper- and zinc-binding motifs in *Streptococcus pneumoniae* identified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 11, n. 16, p. 3288–3298, 2011.

SYMANSKI, C. S. **Caracterização de bactérias mesófilas presentes em processo de compostagem**. [s.l: s.n.].

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 28 jan. 2015.

TETER, S. & HARTL, F. U. Horizon Symposium - Protein Folding and Disease : Protein folding. In: **Encyclopedia of Life Sciences (Nature Publishing Group, London, 2001) © Macmillan Magazines Ltd**. London: Nature Publishing Group, 2001.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204-212, 27 out. 2014.

TIEDJE, J.; ASUMING-BREMPPONG, S. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. October, p. 109–122, 1999.

TOM-PETERSEN, A. et al. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 46, n. 1, p. 53–62, 2003.

TOTTEY, S. et al. Cyanobacterial metallochaperone inhibits deleterious side reactions of copper. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 1, p. 95–100, 3 jan. 2012.

TREVORS, J. T. Copper resistance in bacteria. **Microbiological sciences**, v. 4, n. 1, p. 29–31, 1987.

TUNALI, S.; ÇABUK, A.; AKAR, T. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 115, n. 3, p. 203–211, 2006.

TURPEINEN, R.; KAIRESAALO, T.; HÄGGBLÖM, M. M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 1, p. 39–50, 2004.

TYLECOTE, R. F. **A history of metallurgy** / | National Library of Australia. [s.l: s.n.].

- VALENZUELA, L. et al. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2006.
- VALLS, M. et al. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 661–5, jun. 2000.
- VASCONCELOS, Y. **Bactérias mineradoras | Revista Pesquisa FAPESP**. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/10/11/bacterias-mineradoras/>>. Acesso em: 14 maio. 2015.
- WANG, J. et al. The proteomic alterations of *Thermoanaerobacter tengcongensis* cultured at different temperatures. **Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1409–19, maio 2007.
- WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 63–5, 3 maio 1990.
- WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. Analysis of the microbial proteome. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 3, p. 292–7, jun. 2000.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 9 jun. 1998.
- WILKINS, M. R. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 1997.
- WILLIAMS, J. W.; SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 12, p. 530–537, dez. 1984.
- WIRTH, R. et al. Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 59, 2015.
- WOLSCHEIDT, F. et al. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 4, p. 1621–6, 25 jan. 2011.
- XIE, Y. et al. Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. May, p. 755, 2016.
- ZHANG, C. et al. Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation. **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 138–43, jan. 2005.
- ZHANG, H.; GE, Y. Comprehensive Analysis of Protein Modifications by Top-Down Mass Spectrometry. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 4, n. 6, p. 711–711, 1 dez.

2011.

ZHENG, X. et al. Copper ion-stimulated McoA-laccase production and enzyme characterization in proteus hauseri ZMd44. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 4, p. 388–393, abr. 2013.

ZOU, H. X. et al. Excess copper induced proteomic changes in the marine brown algae Sargassum fusiforme. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 271–280, 2015.

ANEXO

Cullen College of Engineering
Department of Civil and Environmental Engineering

Debora F. Rodrigues, Ph.D.
Associate Professor

February 28, 2016

To Whom it May Concern:

RE: Visiting Graduate Student Louise Hase Gracioso

This letter confirms that Louise Hase Gracioso worked in my laboratory at the University of Houston from July 15, 2016 to January 15 2017 as a visiting PhD student from the University of Sao Paulo, where she is supervised by Dr. Elen Aquino Perpetuo.

During her 6 months in Houston, Louise learned new skills as part of her PhD on metal bioleaching by microorganisms. She worked closely with others PhD students here in Houston to learn fixed bed reactor techniques and copper biosynthesis nanoparticles. She also learned how to use our Confocal Microscopic, atomic absorption to measure metals and metal biosorption. She tested pure and mixed cultures with loofa for their ability to absorb copper, and found considerable absorption in some cases. Louise integrated very well within the lab, was helpful and attentive. She participated well in all laboratory duties and conducted her research systematically and with care. If you have any questions, please don't hesitate to contact me.

Yours sincerely,

A handwritten signature in blue ink that reads "Debora F. Rodrigues".

Debora F. Rodrigues, Ph.D.
Associate Professor

HOUSTON'S CARNEGIE-DESIGNATED TIER ONE PUBLIC RESEARCH UNIVERSITY

N107 Engineering Bldg 1 • Houston, TX 77204-4003
Office: 713.743.4250 • Fax: 713.743.4260 • www.uh.edu