



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Keicilane Aparecida Guedes

**“PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES
INDUSTRIAIS CONTENDO ARSÊNIO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título: “Mestre em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Cristina Teixeira.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvana de Queiroz Silva

Ouro Preto, MG
2011

G924p

Guedes, Keicilane Aparecida.

Prospecção de bactérias com potencial aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo arsênio [manuscrito] / Keicilane Aparecida Guedes. - 2011.

xxi, 179f. : il., color.; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Tratamento de efluentes - Teses. 2. Bioissorção - Teses.
3. *Escherichia coli* - Teses. 4. *Bacillus* (Bactéria) - Teses. 5. *Clostridium* - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



Prospecção de bactérias com potencial aplicação na bioremediação de efluentes industriais contendo arsênio

Autora: Keicilane Aparecida Guedes

Dissertação defendida e aprovada, em 03 de junho de 2011, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Professora Dr^a Mônica Cristina Teixeira - Orientadora
Universidade Federal de Ouro Preto

Professora Dr^a Silvana de Queiroz Silva
Universidade Federal de Ouro Preto

Professora Dr^a Vera Lúcia dos Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Dr. Lydston Rodrigues de Carvalho
Universidade Federal de Ouro Preto

*“Microbiology is a science, but a touch of art and craft is always desirable, even essential
for progres to be made”*

John Postgate

Dedico este trabalho ao João Paulo pelo apoio, incentivo e por acreditar em mim e aos meus gatos Tico, Teco e recentemente ao Babão por tornarem estes dias mais alegres...

À minha família, que mesmo distante, sempre foi motivo de inspiração e energia necessárias à conclusão de todas as etapas deste trabalho. Em especial aos meus avós Maria do Amparo Damasceno e Sebastião Lima Coelho (*in memoriam*), meus tios Marleine Lima Coelho Bravo, João Carlos S. R. Bravo e Valmir de Lourdes Coelho e ao meu primo Ícaro Sebasthian Lima Bravo.

AGRADECIMENTOS

Desde o meu primeiro contato com a Microbiologia Ambiental no sétimo período do curso de Ciências Biológicas com a professora Gabriela Frois Duarte, pude ter noção do que realmente me despertava interesse como estudante e pesquisadora. Fiquei encantada com a possibilidade de aplicar o conhecimento biológico prático na melhoria do Meio Ambiente. Embora sempre gostasse de todas as áreas das Ciências Biológicas, o mero descritivismo que impera em muitas de suas linhas me intrigava. A caminhada pela busca de conhecimento no mundo microbiano não foi fácil, cheio de tropeços, escolhas e mudanças...

E por isso, apenas com muita paixão foi possível superar todas as dificuldades encontradas. Agradeço a todos os desafios, muitas vezes materializados por pessoas, pois a superação dos mesmos certamente me tornou uma pesquisadora e, sobretudo uma pessoa melhor. Agradeço principalmente a todas as pessoas que me auxiliaram na confecção desta dissertação e na minha formação como mestre. É impossível mencionar todas as pessoas que participaram desse processo. Merecem serem citadas primeiramente minhas orientadoras Mônica e Silvana. Obrigada a vocês por me aceitar, por acreditarem no meu trabalho e pela confiança depositadas. Vocês são exemplos de mulher, profissional e mãe e me espelharei no exemplo de vocês sempre!

Aos professores da graduação UFOP em especial ao Rômulo Ribon e ao Francisco Candido Barreto.

Agradeço aos colegas de trabalho sem os quais tudo seria mais difícil:

Débora Silva pela amizade, disposição em ajudar, companheirismo e por sempre me escutar.

Heloísa Cavallieri pelo exemplo de dedicação e foco, convivência e amizade.

Cristiane Cerceau pela amizade e por compartilhar comigo os piores e melhores momentos!!!

À Letícia, por sempre estar disposta quando solicitei ajuda e também por me escutar sempre que precisei.

Ao Leonardo Paiva, Patrícia Freitas e Sueli Bertolino, pelo apoio, amizade e pelos divertidos momentos nos Congressos de Microbiologia, em especial ao realizado em Porto de Galinhas.

Aos meus amigos da época da graduação da turma de Ciências Biológicas da UFOP 2002-2006, em especial Ivan Cezarini, Liliane Carvalho, Ana Carolina, Alessandro Dornelas e Lorena Coelho.

Aos meus amigos do Alojamento Marcelo Muniz, Sueli Damasceno e Liliam Chaves, por compartilharem comigo muitas histórias de vida e do meio acadêmico...

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia: Luizinho, Regina, e em especial à Marli, pelo apoio, ajuda e disposição.

À professora coordenadora do Laboratório de Microbiologia Maria Célia Lanna, por me ceder gentilmente o espaço do laboratório para realização dos experimentos de Biologia Molecular e onde eu passei a maior parte do tempo.

Ao professor Geraldo Magela do Departamento de Química por realizar gentilmente as análises dos precipitados.

Aos professores de Microbiologia Lydston Carvalho e Patrícia Quaresma pela ajuda, apoio e discussões.

Ao professor Luiz Rosa, pelo apoio, ajuda e disposição que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Bio&Hidrometalurgia do Departamento de Metalurgia da UFOP por me acolher no início do mestrado e por ceder o espaço para realização dos experimentos de DGGE.

Ao Laboratório de Microbiologia da Escola de Farmácia em especial à Rejane, pelo auxílio em alguns ensaios bioquímicos.

A Capes pela concessão da Bolsa de mestrado.

À FAPEMIG e à PROGRAD-UFOP pelos auxílios financeiros fundamentais para a participação dos eventos de divulgação de parte desta pesquisa.

À Deus pela oportunidade de realizar todas essas experiências.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE NOTAÇÕES	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Ocorrência, Distribuição e Aplicação do Arsênio	4
2.2 Toxicidade e Exposição ao Arsênio	5
2.3 Arsênio em Ouro Preto - MG	7
2.4 Métodos de Tratamento de Efluentes contendo Arsênio.....	9
2.5 Biorremediação de Arsênio	15
2.6 Mecanismos microbianos de remoção de metais	16
2.7 REFERENCIAS.....	23
CAPÍTULO III- METODOLOGIA	32
3.1 Coleta, cultivo e Manutenção das Culturas bacterianas	32
3.2 Adaptação dos consórcios ao Arsênio	33
3.3 Extração de DNA e PCR	34
3.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).....	35
3.5 Caracterização dos isolados do consórcio I.....	36
3.5.1 Caracterização morfológica e produção de esporos	37
3.5.2 Caracterização bioquímica	37
3.5.3 Caracterização Molecular dos isolados	39
3.6 Experimentos de redução de Sulfato	40
3.7 Caracterização dos precipitados por Difração de raios-X (DRX)	42
3.8 REFERENCIAS	43
CAPÍTULO IV- RESULTADOS	44
4.1 INTRODUÇÃO.....	45
4.2 METODOLOGIA.....	48
4.2.1 Origem e Condições de cultivo dos Consórcios.....	48
4.2.2 Adaptação dos Consórcios ao cultivo em presença de Arsênio	49
4.2.3 Extração de DNA e amplificação por PCR	49
4.2.4 Análise por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	50
4.2.5 Obtenção dos Isolados	50
4.2.6 Caracterização morfológica dos isolados	51
4.2.7 Identificação Bioquímica.....	51
4.2.8 Identificação Molecular dos Isolados	52
4.2.9 Experimentos de redução de Sulfato	52
4.2.10 Caracterização dos precipitados por Difração de raios-X (DRX)	53
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

4.3.1 Enriquecimento e Adaptação dos Consórcios ao cultivo em presença de Arsênio	54
4.3.2 Perfil de DGGE	54
4.3.3 Consumo de Sulfato.....	56
4.3.4 Caracterização e identificação dos Isolados	57
4.3.5 Caracterização dos precipitados	65
4.4 REFERENCIAS	69
CAPÍTULO V- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
5.1 Conclusões.....	73
5.2 Sugestões de trabalhos futuros	74
CAPÍTULO VI- ANEXOS.....	76
ANEXO 1- Protocolos de Biologia Molecular.....	75
ANEXO 2- Meios utilizados na Identificação Bioquímica	80
ANEXO 3- Experimento para dosagem de redução de sulfato	82
ANEXO 4- Publicações.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Perfil geológico da cidade de Ouro Preto-MG modificado por (Gonçalves, Lena <i>et al.</i> , 2007).....	8
Figura 3.1: Cuba de eletroforese em gradiente desnaturante, seta indica o gel acondicionado no “sanduíche”.....	36
Figura 4.1: Imagem de Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) corado com Brometo de Etídeo contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificado com iniciadores universais para Bacteria. (Amostras A adaptadas a 8 mgAs.L^{-1} ; amostras B : ausência de As no meio).....	55
Figura 4.2: Curva de remoção de sulfato e variação de pH do consórcio I sob cultivo em presença de arsênio.	56
Figura 4.3. Árvore filogenética contendo sequências do gene DNAr 16S (~ 400 pb) construída pelo método Neighbor-Joining. Análise de Bootstrap com 1000 réplicas. Barra corresponde a 0,5%.....	63
Figura 4.4. Espectro de Difração de Raios X do precipitado gerado após cultivo do consórcio I sob cultivo em meio líquido contendo sulfato na concentração de 3 g.L^{-1} e arsênio na concentração de 16 mg.L^{-1}	67
Figura 4.5: Espectro de Difração de Raios X do precipitado gerado após cultivo do Consórcio I em meio líquido contendo sulfato na concentração de 3 g.L^{-1} e arsênio na concentração de 16 mg.L^{-1} utilizando-se células inativadas por autoclavação.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Caracterização morfológica dos isolados obtidos a partir do Consórcio I.....	58
Tabela 4.2: Caracterização Bioquímica dos isolados do Consórcio I.....	60
Tabela 4.3 Proximidade taxonômica entre os isolados seqüenciados e as bactérias catalogadas no <i>GenBank</i>	63

LISTA DE NOTAÇÕES

μL	Microlitro
As	Arsênio
APS	Persulfato de Amônio
ATP	Adenosina Trifosfato
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BSA	Soro Albumina Bovina
CO_2	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
DAM	Drenagem Ácida de minas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAr 16S	Ácido Desoxirribonucléico da porção 16S ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Etileno amino tetraacetato de sódio diidratado $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2.\text{COOH})\text{CH}_2.\text{COONa}]_2.2\text{H}_2\text{O}$
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
H_2S	Sulfeto de hidrogênio
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M.O	Microscópio óptico
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	National Center of Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> ou Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RPD	Ribossomal Database Project
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SO ₄ ²⁻	Sulfato
TAE	Solução Tampão com Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i> (Taq DNA polimerase)
TEMED	N, N, N, N – tetrametil etileno diamina
Tris	(hidroximetil)aminometano - C ₄ H ₁₁ NO ₃
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultra-Violeta

RESUMO

O Arsênio (As) está naturalmente presente no ambiente terrestre associado a minerais sulfetados em rochas e sedimentos. Devido a oxidações químicas e biológicas e principalmente a atividades ligadas à mineração e metalurgia, o As é mobilizado de depósitos naturais tornando-se um importante contaminante ambiental. Em baixíssimas concentrações, esse metalóide é tóxico para diversos seres vivos. Vários estudos têm sido realizados a fim de remediar tais impactos immobilizando este elemento. Dentre as metodologias propostas podemos citar com destaque a utilização de micro-organismos na remoção de metais de efluentes e corpos d'água contaminados. Bactérias podem remover metais de uma solução por diferentes mecanismos, tais como aqueles que envolvem a acumulação extracelular/precipitação, a adsorção iônica na superfície celular ou complexação, e a acumulação intracelular ou bioacumulação. A remoção de metais dos ambientes aquáticos também pode ocorrer pela ação de metabólitos produzidos pelas bactérias presentes como, por exemplo, pelo H₂S produzido pelo grupo das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS). Estes micro-organismos são peculiares por, através da redução química do sulfato, produzir sulfeto que, por sua vez, é capaz de precipitar metais, na forma de seus sulfetos insolúveis.

O presente trabalho teve como objetivo geral a prospecção e identificação de bactérias resistentes ao Arsênio presentes em corpos d'água, sedimentos e em reator de tratamento de esgoto, visando uma potencial aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo este elemento. Foram coletados sedimentos de córrego contaminado com esgoto doméstico em Ouro Preto, de lodo de reator UASB (Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente) da ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) Arrudas, em Belo Horizonte, ambas em MG; e do sedimento do Mangue de Carneiros, em Tamandaré, PE. Os diferentes consórcios microbianos obtidos foram caracterizados morfológica e metabolicamente inclusive na presença de compostos arsenicais a fim de identificar aqueles com maior potencial de aplicação biotecnológica. A análise do perfil eletroforético das bandas obtido por DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) mostrou uma maior diversidade de bactérias tolerantes ao As em dois consórcios provenientes de ambientes contaminados com esgoto. Houve, entretanto, uma diminuição da diversidade microbiana quando em presença do As. Os resultados mostram a adaptação dos micro-organismos às concentrações de As superiores ao exigido pelo padrão de limite máximo de lançamento

de efluentes permitido pelo CONAMA 357 (0,5 mg.L¹), indicando potencial de aplicação dos consórcios na remoção de As de efluentes e águas contaminadas. Análises de redução de sulfato pelo consórcio I indicam percentuais de remoção de sulfato da ordem de 93%, nas condições adotadas. A análise do precipitado formado pelo Consórcio I indica a presença do mineral whitloquita (Ca,Mg)₃(PO₄)₂ sugerindo à hipótese de formação bacteriana que pode estar relacionado a mecanismos de substituição do fósforo pelo arsênio na célula ou servir como armazenamento para a regulação de elementos essenciais pelas bactérias. A identificação morfológica, bioquímica e molecular dos s do Consórcio I indica como presentes *Escherichia coli*, *Clostridium* sp e *Bacillus* sp., espécies estas que são usualmente citadas na literatura como estando relacionadas a processos de biorremediação de metais.

Palavras-chave: biorremediação, bioissorção por bactérias, arsênio, tratamento de efluentes, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp, *Clostridium* sp..

ABSTRACT

Arsenic (As) is naturally present in the terrestrial environment associated with sulfide minerals in rocks and sediment. Because of chemical and biological oxidations and especially the activities related to mining and metallurgy, As is mobilized from natural deposits becoming an important environmental contaminant. This metalloid is toxic to many living things even if in very low concentrations. Several studies have been done trying to minimize such impacts by immobilizing this element. Among the methods proposed we would like to emphasize the use of microorganisms for metal removal from wastewater and contaminated waterbodies. Bacteria can remove metals from solution by different mechanisms such as those involving the extracellular accumulation/precipitation, adsorption or ion complexation on the cell surface and intracellular accumulation or bioaccumulation. The removal of metals from aquatic environments can also occur by the action of metabolites produced by bacteria, for example, H₂S produced by Sulfate Reducing Bacteria (SRB) group. These microorganisms are peculiar due to the fact that they are able to chemically reduce sulfate producing sulfide, which by its turn is able to precipitate metals like their insoluble sulfides. This study is aimed to the searching and identification of arsenic resistant bacteria naturally present in water bodies, sediments, and sewage treatment reactor with potential application for water and wastewater treatment, targeting on bioremediation of industrial arsenic containing effluents.

The different microbial consortiums were morphologically and metabolically characterized even in the presence of arsenic compounds in order to identify those with the greatest biotechnological application potential. The electrophoretic bands profile obtained after DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analysis showed a great diversity in arsenic tolerant bacteria for two studied consortia (both obtained from sewage contaminated environments). As expected, there was a decrease in microbial diversity in the presence of As. Nevertheless, results shown that some of those microorganisms were adapted to the cultivation in the presence of As concentrations above those established by the Brazilian National Council of Environment as the maximum arsenic content for effluent discharging (0.5 mg.L⁻¹), indicating potential application for As removal in effluent and contaminated water. Analysis of sulfate reduction by the consortium I indicate

sulfate removal rates of around 93% under the adopted conditions. The analysis of the precipitate formed after Consortium I cultivation by X-Ray diffraction indicates the presence of the mineral whitlockite $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$ suggesting the possibility of biomineralization that may be related to the mechanisms of phosphorus substitution by arsenic within the cell or, as a second hypothesis this mineral could be use by bacteria cells like a storage stock for metabolic regulation of those essential elements. The morphological, biochemical and molecular identification of some of the microorganisms presents in the Consortium I indicate *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. and *Bacillus* sp., as being the predominant species. These species are usually cited in literature as being related to metals bioremediation processes.

Keywords: bioremediation, biosorption by bacteria, arsenic, effluent treatment, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp, *Clostridium* sp..

CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO

Atualmente a contaminação dos solos e dos recursos hídricos com metais e metais pesados tem sido um dos maiores problemas ambientais. Uma das principais fontes deste tipo de contaminação é a emissão de efluentes industriais contendo elevada concentração destes elementos. Ao contrário dos poluentes orgânicos que geralmente são caracterizados por fácil biodegradabilidade, os metais são tóxicos e ao serem liberados no Meio Ambiente são recalcitrantes e podem ser acumulados pelos seres vivos, podendo causar distúrbios nas cadeias alimentares, e conseqüentemente afetar a saúde e qualidade de vida dos animais e do homem.

A busca por novas técnicas viáveis e de baixo custo na implantação e operação de tratamentos de resíduos líquidos e sólidos tem despertado o interesse de acadêmicos e empresários que têm conduzido pesquisas no desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a redução das emissões e, sobretudo a remediação das contaminações por metais pesados.

Atualmente o tratamento de águas residuárias consiste na aplicação de técnicas físico-químicas tradicionais que incluem precipitação e filtração, troca iônica, osmose reversa, oxidação e redução, separação eletroquímica, separação por membrana, bem como outras técnicas de remoção de metais pesados. Estas técnicas são pouco efetivas e geralmente caras devido à dificuldade de regeneração ou reutilização dos metais removidos que frequentemente é complicada ou economicamente inviável. O desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento de águas residuárias de baixo custo aliados a índices cada vez menores de liberação de metais no Meio Ambiente é de grande valia nos dias atuais.

A biossorção é uma alternativa biotecnológica promissora na substituição ou polimento das clássicas técnicas físico-químicas, pois os biossorbentes possuem baixos custos e ótima eficiência na remoção dos metais em soluções mesmo com baixas concentrações. Vários estudos têm sido realizados sobre o uso de materiais naturais como sorbentes para o arsênio. No entanto, a literatura carece de estudos mais aprofundados sobre os mecanismos envolvidos no processo de biossorção. O estudo aprofundado de

aspectos envolvendo os micro-organismos que são utilizados nesses processos pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de retenção de metais por bactérias. O presente trabalho contribui nesse sentido ao identificar e caracterizar um consórcio de bactérias que apresenta características essenciais de aplicação das mesmas em processos de retenção de arsênio bem como de outros metais.

Para melhor entendimento e organização desta dissertação, a estrutura de apresentação compreende 5 capítulos. Esta introdução correspondente ao Capítulo I. O Capítulo II abrange a revisão da literatura que abrange tópicos teóricos e resultados obtidos por outros autores com relação aos metais e sua biorremediação. A metodologia experimental está apresentada no Capítulo III, no qual são descritos a bioprospecção de consórcios bacterianos com potencial aplicação na remediação de efluentes industriais contendo Arsênio; caracterização destes consórcios por PCR/DGGE; identificação clássica e molecular das bactérias presentes no consórcio I (Amostra Funil), o qual apresentou maior potencial de aplicação; e experimentos de Redução de Sulfato, além de análise por difração de Raios X do precipitado formado pelo Consórcio I. Os resultados obtidos experimentalmente são apresentados e discutidos no Capítulo IV na forma de artigo a ser publicado em periódico científico. Os resultados serviram como base para as conclusões e sugestões para trabalhos futuros descritos no Capítulo V.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como principal objetivo a prospecção e identificação de bactérias resistentes ao Arsênio presentes em corpos d'água e sedimentos e em reator de tratamento de esgoto, visando uma potencial aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo este elemento.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o propósito de avaliar a resistência dos consórcios ao Arsênio (As III), o presente trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Obter consórcios bacterianos a partir de diferentes amostras ambientais.
- ✓ Determinar a dinâmica da comunidade bacteriana de todos os consórcios pela técnica PCR-DGGE e verificar as possíveis alterações populacionais durante os cultivos em meio contendo As.
- ✓ Isolar e identificar as bactérias presentes no consórcio com melhor adaptação em meio com As por meio de técnicas de microbiologia clássica;
- ✓ Identificar as bactérias presentes no consórcio por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S.
- ✓ Avaliar a taxa de remoção de sulfato pelo consórcio mais adaptado ao meio com As.

CAPÍTULO II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ocorrência, Distribuição e Aplicação do Arsênio

O Arsênio (As) está naturalmente presente no ambiente terrestre associado a minerais em rochas e sedimentos. Ocorre como maior constituinte em mais de 200 minerais incluindo As elementar, arsenetos, sulfetos, óxidos, arsenatos e arsenitos. Estes minerais são raros no Meio Ambiente e sua ocorrência está associada a áreas mineralizadas onde estão associados a metais de transição como cádmio (Cd), chumbo (Pb), prata (Ag), ouro (Au), antimônio (Sb), fósforo (P), tungstênio (W) e molibdênio (Mo). O mineral de As mais abundante é a arsenopirita (FeAsS) (Smedley e Kinniburgh, 2002).

O As é encontrado na atmosfera, solos, rochas, nas águas naturais e nos organismos como elemento traço. Devido a oxidações químicas e biológicas o As é mobilizado de depósitos naturais tornando-se um importante contaminante ambiental (Jong e Parry, 2003). A ocorrência de impactos ambientais se deve principalmente a atividades antrópicas, ligadas à mineração e metalurgia, queima de combustíveis fósseis, uso de pesticidas, herbicidas e preservativos de madeira contendo As em sua composição; e ainda ao uso de compostos contendo As empregados como aditivo alimentar na criação de gado e frango ou como antibióticos e tônicos para estimular o crescimento destes animais (Chatain, Bayard *et al.*, 2005; Sapkota, Lefferts *et al.*, 2007). Esta suplementação de ração de animais, destinados à alimentação com compostos de As (4-hydroxy-3-nitrobenzenearsenic-acid) causa impacto direto sobre a saúde humana (Smedley e Kinniburgh, 2002; Sapkota, Lefferts *et al.*, 2007).

Uma das principais formas de mobilização do arsênio ocorre durante a exploração de metais ligados a pirita. Este processo gera a drenagem ácida de mina (DAM) e as áreas afetadas contêm altas concentrações de sulfato, metais e metalóides como o As, além de ser um ambiente extremamente ácido, condições que afetam principalmente o solo e os recursos hídricos (Shokes e Möller, 1998; Shokes e Moller, 1999).

Embora a toxicidade do As seja bem conhecida, este elemento possui numerosas aplicações. Apenas pequenas quantidades de As são utilizadas nas indústrias químicas, na preparação de tintas, corantes, pesticidas e herbicidas, (Smedley e Kinniburgh, 2002;

Knobeloch, Zierold *et al.*, 2006; Sapkota, Lefferts *et al.*, 2007). Na indústria eletrônica é usado na construção de semicondutores, ligas não ferrosas, detectores de Raios X e pilhas solares (Ellis e Macdonald, 2004). Há mais de 2.400 anos, sais de As foram muito utilizados no tratamento de diversas doenças como no tratamento de sífilis e tripanossomíase. No século XIX, o As foi usado na terapia de vários tipos de cânceres (Antman, 2001) e recentemente tem se renovado o interesse do uso de trióxido de arsênio em pacientes com leucemia.

Embora a importância dos usos de pequenas quantidades de arsênio não deva ser desprezada, é importante ressaltar os efeitos da exposição a este elemento.

2.2 Toxicidade e Exposição ao Arsênio

O arsênio ocorre no Meio Ambiente nos estados de oxidação -3 , 0 , $+3$ e $+5$, sendo a forma trivalente a mais tóxica (Jong e Parry, 2003). Em baixíssimas concentrações, esse metalóide é altamente tóxico para diversos seres vivos. A intoxicação ocorre principalmente pela ingestão de águas contaminadas (Smedley e Kinniburgh, 2002). A dose de As letal para humanos é da ordem de $0,6\text{mg/kg}$ de massa corporal em caso de As inorgânico (Teixeira e Ciminelli, 2004). A exposição em curto prazo pode ocasionar problemas gastrointestinais, cardiovasculares e neurológicos (Agusa, Kunito *et al.*, 2010). A intoxicação aguda e crônica pode provocar diversas outras patologias: hiperpigmentação e hiperqueratose, problemas no sistema circulatório vascular, hematológicos (anemia), doenças pulmonares e respiratórias (Chattopadhyay, Mukherjee *et al.*, 2010; Kazi, Baig *et al.*, 2010); endocrinológicos (Yen, Tsai *et al.*, 2010); reprodutivos e de desenvolvimento (Chakraborty e De, 2009; Sohel, Vahter *et al.*, 2010). Já a exposição crônica está relacionada a diversos tipos de câncer (pele, pulmão, próstata, bexiga, rim e fígado (Chen, Chiou *et al.*, 2010; Roychowdhury, 2010).

Os piores casos de contaminação de água potável relatados ocorrem em Bangladesh e na Índia, países no qual cerca de 42 milhões de pessoas são afetadas. São descritos muitos casos correlacionando o efeito da exposição crônica da população ao As a diversas patologias (Smedley e Kinniburgh, 2002).

No Brasil são registrados casos de exposição humana ao arsênio em três regiões. No Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, onde uma grande quantidade de arsênio foi liberada para drenagens, solos e atmosfera como resultado da mineração de ouro; no Vale

do Ribeira, entre os estados do Paraná e São Paulo, onde a liberação de arsênio para o ambiente ocorreu devido à atividade de mineração e refino de metais, e também naturalmente, a partir do intemperismo de rochas e na Serra do Navio, Amapá, onde o arsênio esteve associado ao minério de manganês que foi lavrado nos últimos 50 anos (Figueiredo, Borba *et al.*, 2007).

Não há quadros graves de contaminação no Brasil como os descritos na literatura para outras regiões do mundo como Bangladesh e Índia. No entanto são necessários estudos complementares, pois foram realizadas apenas determinações de concentrações totais de As nos diferentes compartimentos geoquímicos. Nas três áreas foram realizados estudos de avaliação de exposição humana incluindo análises de concentrações de As em urina de crianças e adultos em cinco municípios do Vale do Ribeira e duas cidades no Quadrilátero Ferrífero, além de determinações de As em cabelo e sangue de residentes em Santana no Amapá (Figueiredo, Borba *et al.*, 2007).

A mobilização e disponibilização de Arsênio no Meio Ambiente afeta não só a saúde e qualidade de vida do Homem, como afeta todos os Seres Vivos através de uma série de impactos no Meio Ambiente. Devido à afinidade química entre este elemento e o grupo sulfidril de enzimas e proteínas, além de similaridade entre o elemento fósforo, o As bioacumula nos organismos vivos. Uma vez incorporado às plantas e microinvertebrados, o As é transferido ao longo das cadeias alimentares e através de uma sequência de etapas de bioacumulação, este elemento afeta todas as teias alimentares através do processo de biomagnificação (Teixeira e Ciminelli, 2005; Lou, Ye *et al.*, 2010; Ventura-Lima, Bogo *et al.*, 2010).

De todos os Seres Vivos afetados pela contaminação de metais e metais pesados no Meio Ambiente, os animais aquáticos são os que estão mais expostos, uma vez que podem incorporar esses compostos em seus organismos tanto pela ingestão de água contaminada como pela alimentação (Ventura-Lima, Bogo *et al.*, 2010). Os animais que apresentam maior sensibilidade aos efeitos tóxicos destes metais acabam apresentando doenças e morrem. Já aqueles que possuem certa tolerância à exposição ao metal podem acumulá-los em seus tecidos e órgãos. Através da alimentação desses organismos ao longo de uma cadeia trófica, o problema é potencializado, desencadeando problemas mais graves a organismos de topo de cadeia alimentar e obviamente ao homem (Liang, Liu *et al.*, 2010; Ventura-Lima, Bogo *et al.*, 2010).

Embora, a maior fonte de intoxicação humana por As seja pela água, a biocumulação de As pode afetar diretamente a saúde humana através da alimentação (Sapkota, Lefferts *et al.*, 2007; Liang, Liu *et al.*, 2010; Roychowdhury, 2010).

Diante dos riscos de toxicidade representados pelo Arsênio, a Organização Mundial de Saúde (WHO) determinou que as águas potáveis devessem ter no máximo 10 µg/L de As (Van Den Bergh, Du Laing *et al.*, 2010). No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente CONAMA através da RESOLUÇÃO 357 estabelece o limite máximo de As em águas de consumo humano de 10 µg/L. Esta resolução também regulamenta os padrões de lançamento de efluentes industriais em corpos d'água. Para o arsênio, o limite máximo permitido é de 0,5 mg /L (Conama, 2005).

Diante dos diversos impactos ao Meio Ambiente e conseqüentemente riscos à saúde humana que a utilização e exposição ao ambiente de metais como o arsênio devido ao uso de metodologias tradicionais de extração de metais, métodos alternativos de extração como a biolixiviação, substituição por tecnologias mais limpas baseadas em técnicas de biorremediação tornam se não só aconselháveis como necessárias.

2.3 Arsênio em Ouro Preto - MG

Ouro Preto faz parte do Quadrilátero Ferrífero, importante região do Brasil onde há grandes jazidas minerais. Em meados do século XVIII, a exploração aurífera contribuiu como principal atividade econômica do país. O minério de ouro contém arsênio em minerais como arsenopirita e a exploração desse importante minério libera muitos resíduos principalmente no ambiente próximo aos depósitos minerais (Matschullat, Perobelli Borba *et al.*, 2000; Figueiredo, Borba *et al.*, 2007; Gonçalves, Lena *et al.*, 2007), porém a contaminação também pode ocorrer em locais distantes por transporte de arsênio via aquática ou atmosférica. Há uma grande contribuição das atividades de mineração e metalurgia aos processos de liberação de As para o Meio Ambiente, no entanto muitas vezes a ocorrência deste fenômeno está ligada á própria natureza geológica e à mobilização e lixiviação do As dos depósitos minerais ocorre de forma natural (Dani, 2010a).

Como pode ser observado na figura 2.1, Ouro Preto apresenta um perfil geológico onde há muitas formações rochosas associadas ao arsênio e a junção desse perfil aos

sistemas aquíferos existentes leva á ocorrência da solubilização e liberação do As para o Meio Ambiente (Gonçalves, Lena *et al.*, 2007).

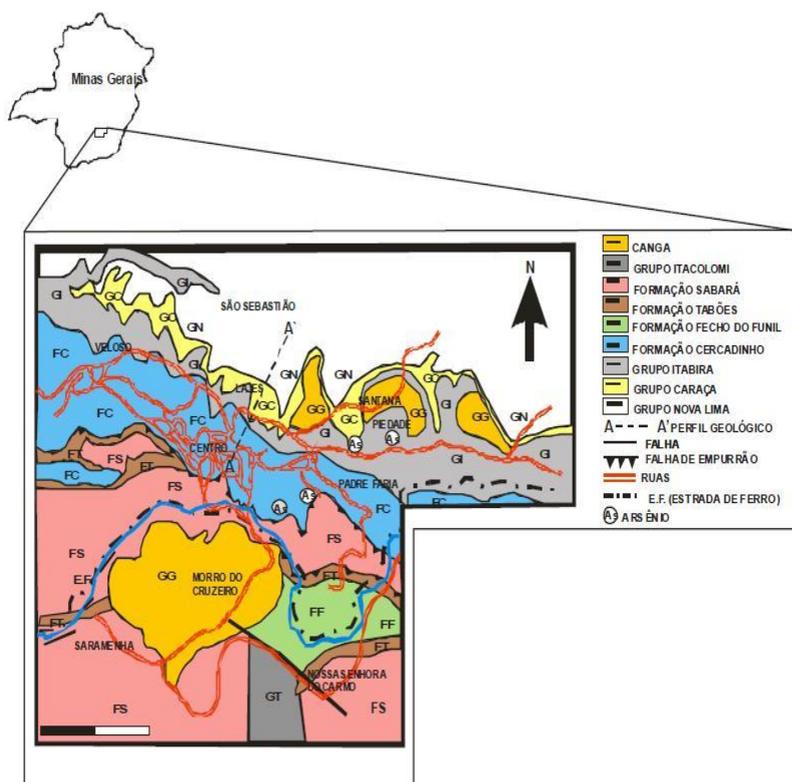


Fig. 2.1: Perfil geológico da cidade de Ouro Preto-MG modificado por (Gonçalves, Lena *et al.*, 2007).

Embora exista a ocorrência natural de contaminação por As aliado a um histórico de mineração, o que contribui até os dias atuais para a contaminação das águas por metais pesados, não há dados significativos de contaminação por As da população (Figueiredo, Borba *et al.*, 2007; Gonçalves, Lena *et al.*, 2007). No entanto, é necessário dar a devida importância a um monitoramento da qualidade da água pelos órgãos públicos municipais responsáveis pela distribuição de água.

Em Ouro Preto o sistema de abastecimento de água é realizado pelo SEMAE, Serviço Municipal de água e Esgoto do município e em alguns bairros a população utiliza de águas subterrâneas e de fontes próximas a minas abandonadas (Gonçalves, Lena *et al.*, 2007). Não há monitoramento de As nas águas de consumo da população pelo SEMAE e devido

à existência de As nas águas subterrâneas utilizadas, é necessário uma eficaz e eficiente identificação e caracterização das áreas contaminadas bem como controle de todas as captações de água, elaboração de um plano de uso e monitoramento constante uma vez que a presença e concentração de As nesses ambientes oscila bastante devido às características geológicas da região. Outro importante motivo para que o poder público tome as devidas providências é o fato de que as intoxicações que os metais pesados provocam desenvolvem-se lentamente, sendo muitas vezes identificadas apenas após longos períodos de tempo (Gonçalves, Lena *et al.*, 2007).

Outro fato que pode amplificar os problemas de disponibilização de As e contaminação ambiental é que a estação de tratamento de esgoto na cidade está em processo de implantação. O esgoto doméstico e industrial então vem sendo despejado diretamente em alguns córregos d água. Historicamente, em todos os anos de exploração de ouro na região, o As liberado foi disperso para outras localidades o que veio comprometendo vários ecossistemas aquáticos.

2.4 Métodos de Tratamento de Efluentes contendo Arsênio

Métodos físico-químicos

Várias alternativas vêm sendo aplicadas na remoção de arsênio, bem como de outros metais que estejam presentes em efluentes industriais de origem minero-metalúrgica. O presente trabalho irá abordar principalmente esse tipo de efluente devido ao fato de grande parte da contaminação de águas e solo por arsênio serem proveniente de águas residuárias destas indústrias.

As técnicas mais utilizadas na remoção de arsênio de efluentes tem sido o uso de precipitação química por sais de ferro ou alumínio; tratamento com cal para remoção de dureza em carbonatos; uso de alumina ativada e outros óxidos e hidróxidos; resinas de troca iônica, deposição eletrolítica e uso de tecnologias de membranas como osmose inversa (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002).

A utilização da precipitação química na remoção de metais pesados de águas residuárias tem sido um dos processos mais utilizados devido ao baixo custo além de ser uma técnica de fácil aplicação. É baseada na baixa solubilidade dos hidróxidos de metais pesados em solução aquosa. Os hidróxidos mais utilizados são o de sódio (NaOH) e o de cálcio (Ca(OH)₂). Após a adição de hidróxido ou cal (CaO), os metais são precipitados e o

lodo gerado pode ser legalmente descartado em aterros sanitários (Shokes e Möller, 1998). Este processo pode gerar muitos impactos, pois ocorre muita produção de lodo que nem sempre tem destinação adequada, além de freqüentemente os precipitados formados precisarem de tratamentos adicionais antes de serem descartados. Outro problema freqüente é a geração de resíduos perigosos solúveis em água (Jong e Parry, 2003; Cohen, 2006).

Outra técnica que pode ser utilizada é de adsorção que consiste na utilização de uma substância adsorvente na remoção de um contaminante. O processo se baseia na interação entre a superfície do adsorvente a um composto adsorvido devido a interações, que podem ser físicas ou químicas, entre as superfícies dos mesmos. No emprego de adsorventes para a remoção de íons arsenicais, os maiores sorventes de As são óxidos metálicos, principalmente os óxidos de Fe, Al e Mn por causa de sua alta reatividade e área superficial (Bhattacharya, Tandukar *et al.*, 2003; Jong e Parry, 2003). Este processo tem desvantagens similares ao uso da precipitação química (Cohen, 2006).

Embora, todos esses processos sejam viáveis na remoção de As, a maioria requer a completa oxidação de As (III) previamente à etapa de adsorção para que sejam atingidos os padrões de lançamento de efluentes recomendados pelos órgãos ambientais. A oxidação de As (III) por oxigênio dissolvido é baixa, para tanto são utilizados oxidantes efetivos como cloro livre, hipoclorito, ozônio, permanganato, peróxido de hidrogênio e óxidos de ferro (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002; Andrianisa, A. *et al.*, 2008). No entanto, o uso desses oxidantes pode gerar resíduos, subprodutos da oxidação e ainda gerar oxidações indesejáveis, o que muitas vezes inviabiliza o uso de tais processos (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002).

O uso de tecnologias de membranas como a osmose reversa e a deposição eletrolítica apresentam grande eficiência na remoção de metais presentes em baixa concentração em efluentes. De modo geral, essas tecnologias consistem na utilização de uma membrana semipermeável entre duas soluções com concentrações diferentes de metal. A aplicação de energia promove a passagem de metais do efluente para uma solução com maior concentração de metal. O tipo de energia aplicada irá diferenciar o tipo de processo de membrana envolvido. A aplicação de tais processos é limitada devido ao alto custo de investimento e manutenção.

Diante dos desafios que os processos tradicionais químicos, físicos e físico-químicos de remoção de contaminantes de efluentes industriais representam em relação a uma

remoção efetiva menos danosa ao Meio Ambiente, além dos elevados custos que os processos químicos e físico-químicos representam, a remoção biológica surge como alternativa viável e de baixo custo podendo ser utilizada como processo de polimento complementar aos métodos estabelecidos.

Métodos biológicos

Para que os processos biotecnológicos possam ser empregados no tratamento de efluentes contaminados por elementos tóxicos em geral e, em particular, pelo arsênio é necessário primeiramente, compreender as interações das diversas matérias orgânicas e dos micro-organismos com o arsênio.

Desta forma, objetivando a remediação de efluentes que contem As com a utilização de bactérias, vários ambientes podem ser explorados com a finalidade de prospecção desses micro-organismos. Em ambientes com atividade de mineração há uma grande probabilidade de encontrar tais organismos, uma vez que as pressões seletivas representados por condições de acidez e elevada concentração de metais desses ambientes, exercidas ao longo de vários anos, levaram a adaptações fisiológicas e mutações que permitam a sobrevivência desses micro-organismos nesses ambientes (Duquesne, Lieutaud *et al.*, 2008).

Estudos sobre a diversidade e filogenia dos micro-organismos envolvidos nesses processos são cada vez mais necessários. A correta identificação dos micro-organismos e o melhor entendimento do metabolismo e transformações que os mesmos mediam no ambiente são decisivos para a sua aplicação biotecnológica.

Desta maneira, as diversas transformações que os micro-organismos promovem nos processos naturais de autodepuração podem ser otimizados e utilizados no tratamento de efluentes industriais, prática bem consolidada no tratamento de esgotos sanitários. No entanto, a remoção de metais representa maior dificuldade de remediação em comparação à matéria orgânica facilmente degradável dos esgotos. Ao contrário dos compostos orgânicos, os metais são recalcitrantes e acumulam no ambiente. Os micro-organismos desempenham papel central nos processos de remediação, uma vez que possuem uma diversificada atividade metabólica. Esta atividade pode tornar os compostos menos tóxicos através da oxidação ou redução dos mesmos.

Embora a toxicidade do arsênio para plantas e animais seja bem reconhecida, as transformações geoquímicas e biológicas que alteram a sua biodisponibilidade no ambiente são multifacetadas e continuam a ser mal compreendidas. O ciclo biogeoquímico do As é mediado por reações químicas das quais os micro-organismos participam diretamente ou indiretamente (alterando os estados de oxidação ou complexando o elemento) (Bhattacharya, Tandukar *et al.*, 2003; Nicholas, Ramamoorthy *et al.*, 2003).

A participação dos s nos ciclos biogeoquímicos é bem conhecida micro-organismos participam na deposição e solubilização de metais pesados na crosta terrestre desde tempos geológicos antigos. A maior atividade microbiana consiste no ciclo do ferro e do enxofre, tais elementos estão presentes principalmente como pirita (FeS_2). Como a maior concentração de As ocorre em minerais sulfetados, a atuação microbiana nesses sedimentos promove a mobilização do As (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002; Muyzer e Stams, 2008).

Por outro lado, a ocorrência de participação direta na formação de minerais é um evento menos conhecido. No entanto, há muitas evidências do papel dos micro-organismos nos ciclos geoquímicos e na gênese de depósitos minerais. Recentemente, a formação de alguns minerais compostos de sulfetos de As, como por exemplo, o ouropigmento, tem sido relacionado à precipitação microbiana (Smedley e Kinniburgh, 2002). A origem biótica de minerais de sulfetos de As associados a depósitos de boratos foi sugerida a partir de análises sobre a composição de precipitado amarelo brilhante (As_2S_3) formado por uma cepa bacteriana com morfologia semelhante à *Desulfotomaculum*. A formação biótica deste precipitado evidencia a ocorrência de processo de biomineralização que envolve tanto a respiração de arsênio como de enxofre (Demergasso, Chong *et al.*, 2007).

A biorremediação bacteriana de ambientes contaminados com As pode ocorrer sob condições anaeróbias ou aeróbias. Nos processos de tratamentos tanto anaeróbios como aeróbios o papel dos micro-organismos depende da população bacteriana dominante. Em ambientes ácidos proveniente de atividades minero-metalúrgicas predominam: a) redução respiratória do arsenato, do Fe (III) e do manganês promovendo assim sua solubilização e mobilização; b) redução respiratória de sulfato, ocasionando a precipitação de uma variedade de metais e metalóides na forma de seus sulfetos metálicos (Chatain, Bayard *et al.*, 2005).

A diversidade microbiana em amostras de solo contaminado com arsênio proveniente de uma planta de fundição abandonada foi investigada por análise molecular do gene rDNA 16S e os principais grupos bacterianos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Caloramator*, *Clostridium* e *Bacillus*. A redução respiratória de arsenato a arsenito por estes micro-organismos promoveu a mobilização deste contaminante. A análise do precipitado amarelo, produzido pelos micro-organismos após três dias de incubação, por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS) e difração de raios X (XRD) revelou que o componente principal foi sulfeto de arsênio cristalino (AsS) (Zhang, Jia *et al.*, 2008).

A deposição de As (III) como sulfeto como consequência da produção de sulfeto de hidrogênio pelas Bactérias redutoras de sulfato é um processo conhecido. Além disso, existem estudos que indicam que após a redução microbiológica de sulfato pode haver redução nos teores de arsênio III devido a sua adsorção com óxidos de ferro em ambientes ricos em minerais ferro-sulfetados (Burnol e Charlet, 2010). Processo semelhante foi observado em cultivo de um consórcio microbiano com bactérias redutoras de sulfato do grupo *Deltaproteobacteria* e bactérias oxidantes do Fe (II) *Zetaproteobacterium ferroxydans*. Análises químicas do meio mostraram que a redução do ferro férrico foi amplamente acompanhada por redução de manganês e arsênio (V) com acúmulo de FeS (Handley, Boothman *et al.*, 2010).

A análise de uma comunidade microbiana de uma barragem de rejeitos ricos em pirita devido à drenagem ácida de mina e caracterizada por baixos valores de pH (aproximadamente 5,7) e elevadas concentrações de sulfato e metais como ferro e arsênio, revelou que o ambiente apresenta baixa diversidade de micro-organismos sendo dominado por apenas alguns tipos. Métodos moleculares de análise da diversidade genética indicaram que a maioria dos micro-organismos não são cultiváveis. As bactérias cultivadas encontradas nestes sistemas e identificadas pertencem aos gêneros *Thiomonas*, *Acidithiobacillus* e *Desulfosarcina*, sendo o último representante do grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS). A espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, comum nesses ambientes também, foi identificada (Bruneel, Duran *et al.*, 2005).

A remoção de As do Meio Ambiente em condições aeróbias pode ocorrer por meio da atividade de micro-organismos oxidantes de As. A oxidação de As (III) pode representar um mecanismo de detoxificação. No entanto, algumas bactérias, como por exemplo do gênero *Thiomonas* obtêm energia para seu crescimento através de reações metabólicas

envolvendo a oxidação deste elemento. Estas bactérias podem mobilizar tanto As (III) como o (V) por meio da dissolução de minerais sulfetados como a arsenopirita (FeAsS). Neste caso, através da oxidação de Fe (III), ocorre a ligação de As a óxidos de ferro (Bhattacharya, Tandukar *et al.*, 2003; Burton, Johnston *et al.*, 2010).

O gênero *Thiomonas* tem sido amplamente relacionado à oxidação de As (III) (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002; Casiot, Morin *et al.*, 2003; Battaglia-Brunet, 2004; Bruneel, Duran *et al.*, 2005; Battaglia-Brunet, Joulian *et al.*, 2006; Duquesne, Lieutaud *et al.*, 2008). Entretanto, o papel de diversas bactérias na oxidação de As precisa ser estudado. Muitas vezes certos micro-organismos apenas toleram grandes concentrações de um determinado metal e possuem um complexo enzimático para oxidarem, mas não necessariamente obterem energia a partir da oxidação do metal. A análise do meio de cultivo de um consórcio de micro-organismos obtido a partir de um ambiente de mineração revelou uma maior atividade de bactérias As (III) oxidantes a partir do fornecimento de nutrientes orgânicos em comparação ao meio de cultivo que não tinha substrato orgânico. Os principais micro-organismos presentes nesse consórcio foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Thiomonas*, *Pseudomonas*, *Matsuebacter*, *Leptothrix*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Neisseria*, *Xanthomonas*, *Acetobacter*, *Escherichia*, *Richettsia*, *Desulfovibrio* e *Arcobacter* (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002).

A oxidação biológica de As (III) merece maior destaque devido a maior toxicidade que esta espécie representa. É importante mencionar alguns processos de redução de As (V) a As (III): algumas bactérias da espécie *Sulfurospirillum arsenophilum* e do gênero *Geobacter*, na oxidação biológica da matéria orgânica, podem utilizar As (V) como acceptor final de elétrons (Heimann, Blodau *et al.*, 2007; Hery, Gault *et al.*, 2008).

Alkaliphilus oremlandii também é capaz de usar arsenato como acceptor final de elétrons a partir da utilização de acetato, piruvato, formiato, lactato, glicerol, ou frutose como doadores de elétrons. Além deste processo metabólico, esta bactéria é capaz de metabolizar um composto conhecido por roxarsone, composto organoarsenical (3-nitro-4-hidroxibenzenoarsonic). Experimentos de crescimento e análise genômica sugerem que a redução do grupo nitro do organoarsenical ocorre associada à oxidação de lactato ou frutose em uma forma dissimilatória, gerando ATP através de uma ATP sintase sódio dependentes. A importância desta transformação microbiana de arsênio refere-se ao fato desta substância, além de ter em sua composição o elemento As, possuir um anel aromático, o que torna este composto muito recalcitrante (Fisher, Dawson *et al.*, 2008).

2.5 Biorremediação de Arsênio

O aprimoramento de processos biotecnológicos no tratamento de efluentes industriais tem intensificado o interesse de empresários e pesquisadores relacionados com atividades de mineração e metalurgia em sua utilização. Os principais contaminantes encontrados nestes efluentes são metais e metais pesados, ânions como sulfato e cloreto e metalóides. Aliados aos métodos físico-químicos tradicionais, tratamentos alternativos são cada vez mais utilizados diminuindo custos e evitando problemas ambientais devido à quantidade excessiva de lodo produzida na maioria destes processos (Chatain, Bayard *et al.*, 2005; Cohen, 2006).

Existem vários tipos de tratamentos biológicos aplicados à remoção de metais de soluções aquosas. Na literatura podemos encontrar diversos estudos sobre remoção biológica de arsênio do ambiente e de efluentes. Há diversos trabalhos sobre o uso de algas e plantas na biossorção de As e metais. Na maioria dos casos, estes organismos imobilizam metais pesados através da incorporação destes aos seus tecidos (Tuzen, Sari *et al.*, 2009; Lou, Ye *et al.*, 2010).

Vários estudos têm sido realizados sobre o uso de materiais naturais como sorventes para arsênio. É relatado o uso de materiais como fibras vegetais (Reddy, Seshaiiah *et al.*, 2010), carcaças de crustáceos (Gupta, Chauhan *et al.*, 2009), penas de galinha (Teixeira e Ciminelli, 2005), esterco de ovinos (Wilopo, Sasaki *et al.*, 2008) e resíduos de indústria de fertilizantes (Ludwig, Smyth *et al.*, 2009). A natureza da interação entre esses materiais sorventes e o contaminante pode ser física ou química, podendo haver a ocorrência de ambas, e obviamente essa interação irá depender do tipo de material usado. A interação entre As (III) e material particulado proveniente de penas de galinha, por exemplo, ocorre devido a sua complexação com grupos SH (sulfidril) presentes nas penas. Desta forma, ocorre a imobilização e remoção deste metal de uma solução aquosa (Teixeira e Ciminelli, 2005).

Nos processos de remoção de metais, podem ser utilizados s como bactérias, leveduras e fungos que atuam imobilizando o metal. São diversos os mecanismos microbianos de remoção de arsênio, que podem ocorrer por adsorção, desmetilação, biometilação,

complexação, coprecipitação, e processos de oxidação-redução (Bijmans, Peeters *et al.*, 2008; Pal, Tewari *et al.*, 2009).

Os micro-organismos apresentam uma grande diversidade metabólica e particularmente as bactérias possuem uma gama de adaptações frente a mudanças nas condições ambientais, tais como temperatura, concentração de substrato e pH. Estes organismos podem ser encontrados em ambientes totalmente inóspitos (Bruneel, Duran *et al.*, 2005; Duquesne, Lieutaud *et al.*, 2008). Estas características propiciam a utilização de bactérias no tratamento de efluentes industriais.

2.6 Mecanismos microbianos de remoção de metais

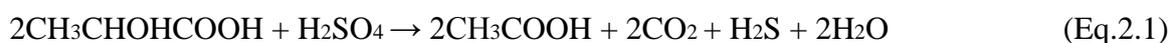
Os micro-organismos podem remover metais de uma solução por diferentes mecanismos. Tais como aqueles que envolvem a acumulação extracelular/precipitação, a adsorção iônica na superfície celular ou complexação, e a acumulação intracelular ou bioacumulação. O fenômeno que envolve a remoção de íons metálicos pela adsorção passiva por biomassa microbiana ou material derivado desta é chamado de biossorção (Volesky, 2007). Estas características, além de promoverem a remoção de metais podem propiciar a bioflotação e o beneficiamento de minerais. Um determinado organismo pode apresentar um único ou múltiplos mecanismos de remoção de metais de uma solução aquosa (Wang e Zhao, 2009).

O mecanismo que envolve a adsorção na superfície celular ou complexação de metais e conseqüente acumulação destes estão diretamente relacionados à produção de metabólitos pelos micro-organismos tais como H_2S ou H_2O_2 e produção celular de exopolímeros ácidos que podem se ligar e concentrar cátions metálicos. A produção desses metabólitos é consequência de um mecanismo de defesa da célula. Isso possibilita ao micro-organismo a permanência em ambientes nos quais a concentração de metais representa risco de toxicidade. Os produtos metabólicos precipitam os metais como sulfetos ou óxidos, gerando substâncias inofensivas (Asaulenko, Purishch *et al.*, 2004).

Tais características que esses micro-organismos apresentam tem sido uma alternativa amplamente estudada e aplicada como técnica de biorremediação de efluentes industriais ligadas ao ramo da mineração e metalurgia. Dentre os micro-organismos mais estudados

nestes processos destaca-se o grupo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Labrenz, Druschel *et al.*, 2000; Ramamoorthy, Piotrowski *et al.*, 2009; Poinapen e Ekama, 2010).

Estes micro-organismos se destacam como alternativa eficaz e economicamente viável de tratamento biológico de águas residuárias com grande teor de sulfato e metais pesados. A peculiaridade consiste no metabolismo das BRS, pois durante o processo respiratório, ocorre a oxidação de compostos orgânicos simples (CH₂O) resultando em sulfeto de hidrogênio e íons bicarbonato. A equação 1 exemplifica a oxidação de lactato como fonte de carbono. Tal processo confere a esse grupo de micro-organismos a capacidade de precipitar metais pesados devido à reação do H₂S com os íons metálicos formando sulfetos insolúveis (equação 2) (Nicholas, Ramamoorthy *et al.*, 2003; Tabak, Scharp *et al.*, 2003; Cohen, 2006; Huisman, Schouten *et al.*, 2006).



Desta forma, as BRS podem ser utilizadas na remediação de impactos produzidos em áreas de exploração mineral onde há produção de drenagem ácida de mina (DAM) e de efluentes produzidos por este tipo de indústria. Nestes casos, ocorre tanto a remediação de sulfato como de metais pesados, ambos poluentes representam um problema recorrente em adequar efluentes visando seu lançamento em corpos receptores.

Para que um processo de tratamento biológico de efluentes ricos em sulfato e metais seja eficiente, a fonte de carbono empregada como doadora de elétrons deve propiciar, simultaneamente, boas taxas de crescimento bacteriano e altas taxas de redução de sulfato. Historicamente, o lactato tem sido a fonte de carbono mais amplamente usada e estudada dentre o metabolismo deste grupo de micro-organismos (Postgate, 1963; Cypionka, Widdel *et al.*, 1985; Jong e Parry, 2003). No entanto, diversas outras fontes de carbono vêm sendo estudadas e a aplicação de resíduos de indústrias, dentre os quais compostos químicos aromáticos com cadeias benzênicas e fenólicas merece grande atenção. Estes compostos são altamente recalcitrantes e a sua remoção do ambiente é desejável (Kleikemper, Pelz *et al.*, 2002; Kleikemper, Schroth *et al.*, 2002; Cortinas, Field *et al.*, 2006).

As BRS apresentam características peculiares que possibilitam o seu uso no tratamento de efluentes: crescem em uma ampla faixa de pH, entre 5,0 e 9,0; são predominantemente mesófilas, ou seja, sua temperatura ideal de crescimento encontra-se na faixa de 20°C a 40°C; são capazes de utilizar substratos orgânicos simples como fontes de carbono; e apresentam certa tolerância ao oxigênio, apesar de serem anaeróbias (Cypionka, Widdel *et al.*, 1985; Muyzer e Stams, 2008).

A versatilidade destes micro-organismos no tratamento de águas residuárias os torna aplicáveis em vários processos, pois aliado à remoção de sulfato as BRS podem ser empregadas no tratamento de efluentes também contaminados com metais pesados, como o arsênio uma vez que o metabolismo final destes micro-organismos leva a produção de H₂S que por sua vez pode precipitar como sulfetos de As. Tal abordagem já vem sendo estudada na precipitação de As(V) em reatores de coluna (Battaglia-Brunet, Dictor *et al.*, 2002; Jong e Parry, 2003) e em bioreatores de fluxo contínuo (Cohen, 2006). Complexos de arsênio com óxidos de ferro podem ser removidos de soluções por coprecipitação com sulfetos, óxido de ferro e oxihidróxidos de ferro. O hidrogênio pode também reagir com arsenato para produzir água e arsênio elementar (Shokes e Moller, 1999).

A aplicação de micro-organismos na biossorção de arsênio tem sido estudada e seu uso representa um potencial a ser explorado na remediação de efluentes industriais e de ambientes onde a água e o solo estão contaminados.

De modo geral, a remoção de metais dissolvidos pode ocorrer por mecanismos de adsorção na superfície microbiana. Esta adsorção resulta da interação entre forças atrativas que podem ser físicas ou químicas. A interação física envolve forças de van der Waals, e a adsorção química ocorre através de ligações covalentes entre constituintes funcionais presentes na parede celular bacteriana e o metal dissolvido a partir da superfície do mineral (Farahat, Hirajima *et al.*, 2010).

A parede celular microbiana é constituída de uma rede de polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos orgânicos que possuem vários grupos funcionais, dentre os quais podem ser citados o carboxila (COOH), o hidroxila (OH), o amina (NH₂), que podem apresentar diferentes cargas superficiais em função de variações de pH. Os polímeros microbianos são constituídos principalmente de polissacarídeos neutros, mas compostos como ácido urônico, hexoaminas e fosfatos podem complexar íons metálicos. Os principais polímeros

da parede celular bacteriana envolvidos em processos de adesão a minerais são peptídeoglicanos, fosfoglicerídeos, fosfolipídeos e substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A adesão microbiana é mediada por várias propriedades como carga superficial, energia livre e a presença e configuração de polímeros da superfície (Gao, Zhang *et al.*, 2011).

Estudos sobre a propriedade adsorptiva das substâncias poliméricas extracelulares têm merecido grande interesse nos últimos anos não somente do meio acadêmico como do meio industrial que visam à aplicação destas propriedades dos micro-organismos em processos biotecnológicos. A composição da parede celular determina a capacidade das bactérias de se aderirem aos diferentes tipos de superfícies devido ao aprisionamento físico de metais precipitados na matriz polimérica e a complexação de espécies solúveis por constituintes carregados dos polímeros (Kim, Lee *et al.*, 2010; Liu, Dong *et al.*, 2010; Ren, Li *et al.*, 2010).

A carga superficial microbiana pode ser estabelecida a partir da medida do seu potencial zeta. Esse potencial determina o caráter da superfície de acordo com diferentes valores de pH. O valor de pH no qual as cargas são nulas e reversíveis (potencial zeta nulo) é chamado de ponto isoelétrico (PIE) e indica as características catiônicas ou aniônicas da superfície do micro-organismo, que tendem a ser negativas devido a presença de grupos fosfatos (Mesquita, Lins *et al.*, 2003; Sari e Tuzen, 2009; Kumar e Gaur, 2011).

As condições de cultivo e crescimento microbiano também influenciam significativamente na composição dos polissacarídeos, o que diretamente afeta a remoção de metais. Existem evidências de que a síntese destes polímeros é induzida pela presença dos metais tóxicos no meio de cultivo (Jing, Liu *et al.*, 2008; Liu, Dong *et al.*, 2010; Park, Won *et al.*, 2010).

Existem outras aplicações industriais do uso de micro-organismos devido a suas propriedades adsorptivas como em processos de beneficiamento e tratamentos de minerais. Os grupos funcionais presentes nas paredes celulares bacterianas possibilitam modificação da superfície mineral que leva a mudanças nas cargas iônicas do mineral. Essas mudanças são devido à maior afinidade do mineral pelos grupos da parede celular bacteriana. A ligação do micro-organismo ao mineral pode mudar as suas características químicas. As células microbianas apresentam características anfipáticas determinadas pela proporção de

ácidos graxos de sua parede. Quanto maior a proporção de ácidos graxos, maior o caráter hidrofóbico das células microbianas. O micro-organismo que apresenta caráter hidrofóbico, ao se ligar à superfície do mineral pode torná-la hidrofóbica, o que permitem o uso de micro-organismos como reagentes de flotação (Mesquita, Lins *et al.*, 2003; Farahat, Hirajima *et al.*, 2009; Chojnacka, 2010; Farahat, Hirajima *et al.*, 2010). No processo de bio sorção de metais pesados podem ser aplicados tanto biomassa viva como morta, pois a adesão microbiana se deve a grupos funcionais presentes na parede celular. Em estudo sobre a tolerância e bioremoção de As por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, análises químicas indicaram a presença de grupos hidroxila, amina e fosfato presentes nos processos de bio sorção (Yan, Yin *et al.*, 2010). Entretanto, há relatos que indicam uma diminuição no processo de bio sorção na utilização de biomassa morta de *Bacillus sphaericus* (Velásquez e Dussan, 2009). Em estudos sobre a resistência ao As (III) e estudos de processos de bio sorção combinado com caolim por *Halobacillus sp*, foi verificado a diminuição do metabolismo bacteriano o que indica um meio de defesa desse micro-organismo sobre a toxicidade do metal (Zhou, Yao *et al.*, 2010).

Em baixíssimas concentrações, metais pesados como cobre, zinco, manganês, são essenciais para o crescimento e metabolismo celular atuando, por exemplo, como fator de regulação enzimática. Por outro lado, metais como ouro, prata, arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio e alumínio ainda não possuem função biológica essencial conhecida. Tanto elementos essenciais como os não-essenciais podem ser transportados para o citoplasma da célula, até mesmo por suas similaridades químicas, embora os sistemas de transporte encontrados nos micro-organismos variem em especificidade. De qualquer maneira, uma vez que estes metais sejam altamente tóxicos para células vivas, as mesmas apresentam diversos mecanismos de defesa celular. Este fato representa um problema para a remoção de metais por biomassa viva (Andersson, Glasmästar *et al.*, 2003; Banci, Bertini *et al.*, 2010; Chan, Doukov *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a atividade de algumas enzimas tais como superóxido dismutase, catalase, glutatona redutase e ascorbato peroxidase está relacionada à um maior índice de tolerância aos metais, além de exercer um importante papel de proteção por meio de ações antioxidantes que evitam danos oxidativos celulares que podem ocasionar até a morte celular (Azcón, Perálvarez *et al.*, 2010; Martins, Faleiro *et al.*, 2010). No entanto, há estudos que sugerem que, sob condições de estresse celular devido a altas concentrações de metais tóxicos no meio, complexos enzimáticos presentes no periplasma celular sofrem

modificação estrutural gênica tornando possível o transporte de maiores concentrações de metal para o espaço intracelular (Osman, Waldron *et al.*, 2010).

O processo de bioacumulação ou acumulação intracelular de metais ocorre por via metabólica e é dependente de consumo energético. Nos micro-organismos, o sistema de transportes de íons metálicos opera através de gradiente eletroquímico de prótons na membrana da célula. O transporte de metais ionizados também pode ocorrer por difusão devido a mudanças na permeabilidade da membrana provocada por efeitos tóxicos aos metais (Reith, Lengke *et al.*, 2007). Dentro das células, os metais sofrem transformações como biometilação, desmetilação, complexação, coprecipitação e processos de oxidação-redução, sendo então convertidos em formas menos tóxicas (Nicholas, Ramamoorthy *et al.*, 2003; Wang e Zhao, 2009).

O processo de biocumulação é mais lento do que a biossorção superficial, visto que requer a atividade direta do metabolismo microbiano na acumulação de metais. A exposição à toxicidade causa inibição no crescimento microbiano (Dani, 2010b). No entanto, esse processo tem se mostrado muito eficiente e a utilização combinada destes dois processos permite aumentar o percentual de remoção bacteriana de metal quando aliado ao processo de biossorção isolado (Velásquez e Dussan, 2009).

O uso do processo de bioacumulação tem sido amplamente estudado com a finalidade de remediar ambientes contaminados por arsênio. Desde recursos aquíferos, solos expostos devido á atividade de mineração, lavras de mina de ouro abandonadas, e efluentes provenientes de indústrias que utilizam As ou tem esse contaminante como rejeito (Battaglia-Brunet, Joulain *et al.*, 2006; Azcón, Perálvarez *et al.*, 2010; Palma, Alvarenga *et al.*, 2010). Algas e plantas é o tipo de biomassa mais utilizada. O uso desses organismos tem sido questionado, pois a capacidade de bioacumulação de metais é saturada após curto período de tempo e após a morte dos mesmos um descarte apropriado deve ser realizado para não disponibilizar novamente o As no ambiente (Ahmann, Krumholz *et al.*, 1997; Wang e Zhao, 2009; Palma, Alvarenga *et al.*, 2010).

O uso de micro-organismos então aparece como alternativa promissora, pois a biomassa microbiana apresenta maior facilidade de tratamento e descarte em comparação com a biomassa vegetal, além de poderem ser utilizados em processos de obtenção do metal para aplicações industriais (Huisman, Schouten *et al.*, 2006; Morin, Pinches *et al.*, 2008).

A biomassa bacteriana tem sido cada vez mais utilizada nesses processos e desperta o interesse não apenas acadêmico, mas de empresários ligados ao ramo da mineração e metalurgia, pois as bactérias apresentam uma diversificação metabólica enorme que merece maior exploração e estudo aprofundado dos mecanismos envolvidos.

2.7 REFERENCIAS

AGUSA, T. et al. Exposure, metabolism, and health effects of arsenic in residents from arsenic-contaminated groundwater areas of Vietnam and Cambodia: a review. *Rev Environ Health*, v. 25, n. 3, p. 193-220, Jul-Sep 2010. ISSN 0048-7554. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21038756>.

AHMANN, D. et al. Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona Watershed. *Environmental Science & Technology*, p. 2923-2930, OCT 1997. ISSN 0013-936X.

ANDERSSON, A. S. et al. Cell adhesion on supported lipid bilayers. *J Biomed Mater Res A*, v. 64, n. 4, p. 622-9, Mar 2003. ISSN 1549-3296. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601773>.

ANDRIANISA, H. A. et al. Biotransformation of arsenic species by activated sludge and removal of bio-oxidised arsenate from wastewater by coagulation with ferric chloride. *Water Research*. 42: 4809-4817 p. 2008.

ANTMAN, K. H. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist*, v. 6 Suppl 2, p. 1-2, 2001. ISSN 1083-7159. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331433>.

ASAULENKO, L.; PURISHCH, L.; KOZLOVA, I. Stages of biofilm formation by sulfate-reducing bacteria. *Mikrobiol Z*, v. 66, n. 3, p. 72-9, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1028-0987. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15456221.

AZCÓN, R. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. *Microb Ecol*, v. 59, n. 4, p. 668-77, May 2010. ISSN 1432-184X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013261>.

BANCI, L. et al. Molecular recognition in copper trafficking. *Nat Prod Rep*, v. 27, n. 5, p. 695-710, May 2010. ISSN 1460-4752. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442960>.

BATTAGLIA-BRUNET, F. Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoules, France). *J Appl Microbiol*, v. 96, n. 5, p. 1202-3; author reply 1203-4, 2004. ISSN 1364-5072. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078539>.

BATTAGLIA-BRUNET, F. et al. An arsenic (III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 4, p. 656-667, 2002. ISSN 1365-2672. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01726.x>.

_____. Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 89, n. 1, p. 99-108, Jan 2006. ISSN 0003-6072. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341463>.

BHATTACHARYA, P. et al. Geogenic arsenic in groundwaters from Terai Alluvial Plain of Nepal. *Journal De Physique Iv*, p. 173-176, MAY 2003. ISSN 1155-4339.

BIJMANS, M. F. M. et al. High rate sulfate reduction at pH 6 in a pH-auxostat submerged membrane bioreactor fed with formate. *Water Research*, v. 42, n. 10-11, p. 2439-2448, May 2008. ISSN 0043-1354. Disponível em: Go to ISI>://000256335400011.

BRUNEEL, O. et al. Microbial diversity in a pyrite-rich tailings impoundment (Carnoules, France). *Geomicrobiology Journal*, p. 249-257, JUL-AUG 2005. ISSN 0149-0451.

BURNOL, A.; CHARLET, L. Fe (II)-Fe (III)-Bearing Phases As a Mineralogical Control on the Heterogeneity of Arsenic in Southeast Asian Groundwater. *Environmental Science & Technology*, p. 7541-7547, OCT 1 2010. ISSN 0013-936X.

BURTON, E. et al. Arsenic Effects and Behavior in Association with the Fe (II)-Catalyzed Transformation of Schwertmannite. *Environmental Science & Technology*, p. 2016-2021, MAR 15 2010. ISSN 0013-936X.

CASIOT, C. et al. Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Res*, v. 37, n. 12, p. 2929-36, Jul 2003. ISSN 0043-1354. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767295>.

CHAKRABORTY, T.; DE, M. Clastogenic effects of inorganic arsenic salts on human chromosomes in vitro. *Drug Chem Toxicol*, v. 32, n. 2, p. 169-73, 2009. ISSN 1525-6014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514953>.

CHAN, A. C. et al. Structure and function of P19, a high-affinity iron transporter of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Mol Biol*, v. 401, n. 4, p. 590-604, Aug 2010. ISSN 1089-8638. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600116>.

CHATAIN, V. et al. Effect of indigenous bacterial activity on arsenic mobilization under anaerobic conditions. *Environment International*, v. 31, n. 2, p. 221-226, 2005. ISSN 0160-4120. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V7X-4DPYH6G-2/2/2ff7322dc5ff2eadcbdadaf3389cccb9>.

CHATTOPADHYAY, B. P. et al. Respiratory effect related to exposure of different concentrations of arsenic in drinking water in West Bengal, India. *J Environ Sci Eng*, v. 52, n. 2, p. 147-54, Apr 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114123>.

CHEN, C. L. et al. Arsenic in drinking water and risk of urinary tract cancer: a follow-up study from northeastern Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 19, n. 1, p. 101-10, Jan 2010. ISSN 1538-7755. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056628>.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation--the prospects for practical applications. *Environ Int*, v. 36, n. 3, p. 299-307, Apr 2010. ISSN 1873-6750. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051290>.

COHEN, R. R. H. Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. *Journal of Cleaner Production*, v. 14, n. 12-13, p. 1146-1157, 2006. ISSN 0959-6526. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VFX-4GV8T38-1/2/7791d079a72fca68342c5d95cf7b508f>.

CONAMA. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.: DOU Diário Oficial da União 2005.

CORTINAS, I. et al. Anaerobic biotransformation of roxarsone and related N-substituted phenylarsonic acids. *Environmental Science & Technology*, p. 2951-2957, MAY 1 2006. ISSN 0013-936X.

CYPIONKA, H.; WIDDEL, F.; PFENNIG, N. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Letters*, v. 31, n. 1, p. 39-45, 1985. ISSN 0378-1097. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T2W-476YGYV-2X/2/9c58bf8e0feda3678d9ad1303e3bbaaf>.

DANI, S. U. Arsenic for the fool: an exponential connection. *Sci Total Environ*, v. 408, n. 8, p. 1842-6, Mar 2010a. ISSN 1879-1026. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123147>.

_____. Gold, coal and oil. *Med Hypotheses*, v. 74, n. 3, p. 534-41, Mar 2010b. ISSN 1532-2777. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846256>.

DEMERGASSO, C. et al. Microbial precipitation of arsenic sulfides in Andean salt flats. *Geomicrobiology Journal*, p. 111-123, 2007. ISSN 0149-0451.

DUQUESNE, K. et al. Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ Microbiol*, v. 10, n. 1, p. 228-37, Jan 2008. ISSN 1462-2920. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17894815>.

ELLIS, B. D.; MACDONALD, C. L. B. Stabilized Arsenic(I) Iodide: A Ready Source of Arsenic Iodide Fragments and a Useful Reagent for the Generation of Clusters. *Inorganic Chemistry*, v. 43, n. 19, p. 5981-5986, 2004. ISSN 0020-1669. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ic049281s>.

FARAHAT, M.; HIRAJIMA, T.; SASAKI, K. Adhesion of *Ferroplasma acidiphilum* onto pyrite calculated from the extended DLVO theory using the van Oss-Good-Chaudhury approach. *J Colloid Interface Sci*, v. 349, n. 2, p. 594-601, Sep 2010. ISSN 1095-7103. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20579659>.

FARAHAT, M. et al. Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: extended DLVO theory and flotation behavior. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 74, n. 1, p. 140-9, Nov 2009. ISSN 1873-4367. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665879>.

FIGUEIREDO, B. R.; BORBA, R. P.; ANGÉLICA, R. S. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ Geochem Health*, v. 29, n. 2, p. 109-18, Apr 2007. ISSN 0269-4042. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17351814>.

FISHER, E. et al. Transformation of inorganic and organic arsenic by *Alkaliphilus oremlandii* sp nov strain OhILAs. *Incredible Anaerobes: From Physiology To Genomics To Fuels*, p. 230-241, 2008. ISSN 0077-8923.

GAO, J. F. et al. Contributions of functional groups and extracellular polymeric substances on the biosorption of dyes by aerobic granules. *Bioresour Technol*, v. 102, n. 2, p. 805-13, Jan 2011. ISSN 1873-2976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869236>.

GONÇALVES, J. et al. Arsenic in the groundwater of Ouro Preto (Brazil): its temporal behavior as influenced by the hydric regime and hydrogeology. *Environmental Geology*, v. 53, n. 4, p. 785-793, 2007. ISSN 0943-0105. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00254-007-0691-0>.

GUPTA, A.; CHAUHAN, V.; SANKARARAMAKRISHNAN, N. Preparation and evaluation of iron-chitosan composites for removal of As (III) and As (V) from arsenic contaminated real life groundwater. *Water Research*, p. 3862-3870, AUG 2009. ISSN 0043-1354.

HANDLEY, K. et al. Functional diversity of bacteria in a ferruginous hydrothermal sediment. *Isme Journal*, p. 1193-1205, SEP 2010. ISSN 1751-7362.

HEIMANN, A. et al. Hydrogen thresholds and steady-state concentrations associated with microbial arsenate respiration. *Environmental Science & Technology*, p. 2311-2317, APR 1 2007. ISSN 0013-936X.

HERY, M. et al. Molecular and cultivation-dependent analysis of metal-reducing bacteria implicated in arsenic mobilisation in south-east asian aquifers. *Applied Geochemistry*, p. 3215-3223, NOV 2008. ISSN 0883-2927.

HUISMAN, J. L.; SCHOUTEN, G.; SCHULTZ, C. Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. *Hydrometallurgy*, v. 83, n. 1-4, p. 106-113, 2006. ISSN 0304-386X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VBT-4JYKMTM-1/2/7ce0ab0214bbcc43aa26dc93f3949170>.

JING, C.; LIU, S.; MENG, X. Arsenic remobilization in water treatment adsorbents under reducing conditions: Part I. Incubation study. *Science of the Total Environment*, p. 188-194, JAN 15 2008. ISSN 0048-9697.

JONG, T.; PARRY, D. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, p. 3379-3389, AUG 2003. ISSN 0043-1354.

KAZI, T. G. et al. Determination of Arsenic in Scalp Hair of Children and its Correlation with Drinking Water in Exposed Areas of Sindh Pakistan. *Biol Trace Elem Res*, Oct 2010. ISSN 1559-0720. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20963640>.

KIM, H. C. et al. Arsenic removal from water using iron-impregnated granular activated carbon in the presence of bacteria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, v. 45, n. 2, p. 177-82, 2010. ISSN 1532-4117. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390857>.

KLEIKEMPER, J. et al. Sulfate-reducing bacterial community response to carbon source amendments in contaminated aquifer microcosms. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 42, n. 1, p. 109-18, Oct 2002. ISSN 1574-6941. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709270>.

_____. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*, v. 68, n. 4, p. 1516-23, Apr 2002. ISSN 0099-2240. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916663>.

KNOBELOCH, L. M.; ZIEROLD, K. M.; ANDERSON, H. A. Association of arsenic-contaminated drinking-water with prevalence of skin cancer in Wisconsin's Fox River Valley. *J Health Popul Nutr*, v. 24, n. 2, p. 206-13, Jun 2006. ISSN 1606-0997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195561>.

KUMAR, D.; GAUR, J. P. Chemical reaction- and particle diffusion-based kinetic modeling of metal biosorption by a *Phormidium* sp.-dominated cyanobacterial mat. *Bioresour Technol*, v. 102, n. 2, p. 633-40, Jan 2011. ISSN 1873-2976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800477>.

LABRENZ, M. et al. Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Science*, p. 1744-1747, DEC 1 2000. ISSN 0036-8075.

LIANG, C. P. et al. Assessing and managing the health risk due to ingestion of inorganic arsenic from fish and shellfish farmed in blackfoot disease areas for general Taiwanese. *J Hazard Mater*, Nov 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134715>.

LIU, M. et al. Biosorption of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and surface interactions under culture conditions. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 22, p. 8573-80, Nov 2010. ISSN 1873-2976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599379>.

LOU, L. Q. et al. Interaction of arsenic and phosphate on their uptake and accumulation in Chinese brake fern. *Int J Phytoremediation*, v. 12, n. 5, p. 487-502, Jul 2010. ISSN 1522-6514. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166290>.

LUDWIG, R. et al. Treatment of Arsenic, Heavy Metals, and Acidity Using a Mixed ZVI-Compost PRB. *Environmental Science & Technology*, p. 1970-1976, MAR 15 2009. ISSN 0013-936X.

MARTINS, M. et al. Mechanism of uranium (VI) removal by two anaerobic bacterial communities. *J Hazard Mater*, v. 184, n. 1-3, p. 89-96, Dec 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832165>.

MATSCHULLAT, J. et al. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Applied Geochemistry*, v. 15, n. 2, p. 181-190, 2000. ISSN 0883-2927. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VDG-3XP7FX7-5/2/bd2c9a2c708789863690491862bc333a>.

MESQUITA, L. M. S.; LINS, F. F.; TOREM, M. L. Interaction of a hydrophobic bacterium strain in a hematite-quartz flotation system. *International Journal of Mineral Processing*, v. 71, n. 1-4, p. 31-44, 2003. ISSN 0301-7516. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VBN-48GP6GD-1/2/ad7f12e6dbc9de05f9eda0500035c3a4>.

MORIN, D. et al. Progress after three years of BioMinE-Research and Technological Development project for a global assessment of biohydrometallurgical processes applied to European non-ferrous metal resources. *Hydrometallurgy*, p. 58-68, NOV 2008. ISSN 0304-386X.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 6, p. 441-54, Jun 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461075>.

NICHOLAS, D. et al. Biogeochemical transformations of arsenic in circumneutral freshwater sediments. *Biodegradation*, p. 123-137, APR 2003. ISSN 0923-9820.

OSMAN, D. et al. Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *J Biol Chem*, v. 285, n. 33, p. 25259-68, Aug 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534583>.

PAL, R.; TEWARI, S.; RAI, J. P. Metals sorption from aqueous solutions by *Kluyveromyces marxianus*: process optimization, equilibrium modeling and chemical characterization. *Biotechnol J*, v. 4, n. 10, p. 1471-8, Oct 2009. ISSN 1860-7314. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557798>.

PALMA, P. et al. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research*, p. 703-716, MAR 2010. ISSN 0944-1344.

PARK, J. et al. Recovery of Pd(II) from hydrochloric solution using polyallylamine hydrochloride-modified *Escherichia coli* biomass. *J Hazard Mater*, v. 181, n. 1-3, p. 794-800, Sep 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554390>.

POINAPEN, J.; EKAMA, G. Biological sulphate reduction with primary sewage sludge in an upflow anaerobic sludge bed reactor - Part 6: Development of a kinetic model for BSR. *Water Sa*, p. 203-213, APR 2010. ISSN 0378-4738.

POSTGATE, J. R. Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Appl Microbiol*, v. 11, p. 265-7, May 1963. ISSN 0003-6919. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13985693>.

RAMAMOORTHY, S. et al. Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria in an Iron-Dominated, Mining-Impacted Freshwater Sediment. *Journal of Environmental Quality*, p. 675-684, MAR-APR 2009. ISSN 0047-2425.

REDDY, D. H. et al. Biosorption of Pb²⁺ from aqueous solutions by *Moringa oleifera* bark: equilibrium and kinetic studies. *J Hazard Mater*, v. 174, n. 1-3, p. 831-8, Feb 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853374>.

REITH, F. et al. The geomicrobiology of gold. *ISME J*, v. 1, n. 7, p. 567-84, Nov 2007. ISSN 1751-7362. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043665>.

REN, R. et al. Biosorption of tetradecyl benzyl dimethyl ammonium chloride on activated sludge: Kinetic, thermodynamic and reaction mechanisms. *Bioresour Technol*, Dec 2010. ISSN 1873-2976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195609>.

ROYCHOWDHURY, T. Groundwater arsenic contamination in one of the 107 arsenic-affected blocks in West Bengal, India: Status, distribution, health effects and factors responsible for arsenic poisoning. *Int J Hyg Environ Health*, v. 213, n. 6, p. 414-27, Nov 2010. ISSN 1618-131X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956086>.

SAPKOTA, A. R. et al. What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environ Health Perspect*, v. 115, n. 5, p. 663-70, May 2007. ISSN 0091-6765. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17520050>.

SARI, A.; TUZEN, M. Biosorption of As (III) and As (V) from aqueous solution by macrofungus (*Inonotus hispidus*) biomass: equilibrium and kinetic studies. *J Hazard Mater*, v. 164, n. 2-3, p. 1372-8, May 2009. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022572>.

SHOKES, T.; MOLLER, G. Removal of dissolved heavy metals from acid rock drainage using iron metal. *Environmental Science & Technology*, p. 282-287, JAN 15 1999 1999. ISSN 0013-936X.

SHOKES, T. E.; MÖLLER, G. Removal of Dissolved Heavy Metals from Acid Rock Drainage Using Iron Metal. *Environmental Science & Technology*, v. 33, n. 2, p. 282-287, 1998. ISSN 0013-936X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/es980543x>.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, v. 17, n. 5, p. 517-568, 2002. ISSN 0883-2927. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VDG-451NHVT1/2/6d9041b1155f159d082715c84b79a57f>.

SOHEL, N. et al. Spatial patterns of fetal loss and infant death in an arsenic-affected area in Bangladesh. *Int J Health Geogr*, v. 9, p. 53, 2010. ISSN 1476-072X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20977746>.

TABAK, H. et al. Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation*, p. 423-436, DEC 2003. ISSN 0923-9820.

TEIXEIRA, M. C.; CIMINELLI, V. S. Development of a biosorbent for arsenite: structural modeling based on X-ray spectroscopy. *Environ Sci Technol*, v. 39, n. 3, p. 895-900, Feb 2005. ISSN 0013-936X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757356>.

TEIXEIRA, M. C.; CIMINELLI, V. S. T. Mecanismo de Biossorção Seletiva de Arsênio (III) em Rejeitos Ricos em Proteínas Fibrosas. 2004. 133 Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TUZEN, M. et al. Characterization of biosorption process of As (III) on green algae *Ulothrix cylindricum*. *J Hazard Mater*, v. 165, n. 1-3, p. 566-72, Jun 2009. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010595>.

VAN DEN BERGH, K. et al. Arsenic in drinking water wells on the Bolivian high plain: Field monitoring and effect of salinity on removal efficiency of iron-oxides-containing filters. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, v. 45, n. 13, p. 1741-9, Nov 2010. ISSN 1532-4117. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924919>.

VELÁSQUEZ, L.; DUSSAN, J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J Hazard Mater*, v. 167, n. 1-3, p. 713-6, Aug 2009. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201532>.

VENTURA-LIMA, J.; BOGO, M. R.; MONSERRAT, J. M. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicol Environ Saf*, Nov 2010. ISSN 1090-2414. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21112631>.

VOLESKY, B. Biosorption and me. *Water Res*, v. 41, n. 18, p. 4017-29, Oct 2007. ISSN 0043-1354. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632204>.

WANG, S.; ZHAO, X. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. *J Environ Manage*, v. 90, n. 8, p. 2367-76, Jun 2009. ISSN 1095-8630. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269736>.

WILOPO, W. et al. Immobilization of Arsenic and Manganese in Contaminated Groundwater by Permeable Reactive Barriers Using Zero Valent Iron and Sheep Manure. *Materials Transactions*, p. 2265-2274, OCT 2008. ISSN 1345-9678.

YAN, L. et al. Organoarsenic resistance and bioremoval of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 16, p. 6572-5, Aug 2010. ISSN 1873-2976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362439>.

YEN, Y. P. et al. Arsenic inhibits myogenic differentiation and muscle regeneration. *Environ Health Perspect*, v. 118, n. 7, p. 949-56, Jul 2010. ISSN 1552-9924. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20299303>.

ZHANG, X. et al. Phylogenetic analysis and arsenate reduction effect of the arsenic-reducing bacteria enriched from contaminated soils at an abandoned smelter site. *Journal of Environmental Sciences-China*, p. 1501-1507, 2008. ISSN 1001-0742.

ZHOU, Y. et al. Reduction in toxicity of arsenic (III) to *Halobacillus sp.* Y35 by kaolin and their related adsorption studies. *J Hazard Mater*, v. 176, n. 1-3, p. 487-94, Apr 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004516>.

CAPÍTULO III- METODOLOGIA

3.1 Coleta, cultivo e Manutenção das Culturas bacterianas

A metodologia aplicada no presente estudo envolve inicialmente uma etapa de coleta e enriquecimento de amostras provenientes de ambientes distintos onde foi realizada uma investigação preliminar dos consórcios bacterianos com a finalidade de verificar o melhor consórcio para aplicação biotecnológica na remediação de efluentes industriais contendo Arsênio. As amostras foram coletadas dos seguintes ambientes:

1. Amostra de água e sedimento do córrego do Funil que capta esgoto doméstico da cidade de Ouro Preto, MG 20° 23'25.73"S/43° 30'4.60"O.
2. Amostra de lodo de reator UASB da Estação de Tratamento de Esgoto doméstico (ETE Arrudas) da cidade de Belo Horizonte, MG;
3. Amostra de sedimentos proveniente do mangue de Carneiros no litoral de Pernambuco.

Foram coletadas amostras de água e sedimentos de ambientes diversos, que apresentam condições de degradação ambiental como no caso das amostras do córrego do funil e da ETE Arrudas e de ambientes aparentemente preservados, como no caso das amostras de mangue. As amostras foram coletadas em frascos de 100 mL previamente esterilizados e em seguida identificados como I Funil, III UASB, VII Carneiros.

As amostras foram enriquecidas em meio de cultura líquido Postgate B com a seguinte composição por litro de água destilada: 0,5g KH_2PO_4 , 1,0g NH_4Cl , 0,06 g CaCl_2 , 2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g extrato de levedura, 0,1 g tioglicolato, 0,1 g ácido ascórbico, 0,5g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g lactato de sódio. Os cultivos foram realizados na proporção de 1:25 (amostra: meio). Após um primeiro enriquecimento das amostras, foi realizado um segundo repique para enriquecimento e manutenção dos cultivos e realização dos experimentos subseqüentes. Para as amostras provenientes de ambiente de mangue, foram acrescentados 2,5% de Nacl ao meio de cultivo (Postgate, 1969).

As soluções de meio de cultura tiveram o seu pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$ com adição das soluções de HCl ou NaOH na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. O pH dos meios de cultivo foram medidos com o auxílio de um medidor digital de pH/milivolt DIGIMED, modelo DM-20 com eletrodo combinado de platina modelo DMR-CP1. Em seguida foram esterilizadas por calor úmido em autoclave a 120°C à 1 atm durante 20 minutos, sendo que a solução de sulfato ferroso foi esterilizada separadamente, para evitar a precipitação do ferro, e depois adicionada à solução de sais.

Para adição de As ao meio foi empregada uma solução estoque preparada com o sal arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck) na concentração de 1 gAs.L^{-1} . Esta solução era acrescentada ao meio de cultura líquido em diferentes proporções a fim de se obter as concentrações desejadas.

Antes da inoculação e com o objetivo de criar um ambiente de microaerofilia, excesso de gás nitrogênio foi borbulhado nos frascos de cultivo por 7 minutos e estes foram vedados para realização dos experimentos. Após esse procedimento os frascos foram incubados em estufa a 35°C até a detecção do crescimento da biomassa, evidenciado pelo escurecimento do meio devido à formação de sulfetos de ferro com coloração preta característica, além da turbidez do meio. Esses sulfetos de ferro são formados devido ao metabolismo redutor de sulfato das bactérias presentes no consórcio.

Devido ao grande número de amostras obtidas e objetivando direcionar e aprofundar o estudo de um consórcio que apresentasse um maior potencial na descontaminação de efluentes contendo arsênio, foi feita uma seleção do consórcio que apresentou crescimento e adaptação a maiores concentrações de arsênio, maior taxa de crescimento e maior diversidade genética, analisada por perfil de DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante). Todos os consórcios e os isolados obtidos do Consórcio I foram preservados em meio Postgate B acrescido de 10 mL de uma solução de glicerol a 80% e mantidos a -20°C .

3.2 Adaptação dos consórcios ao Arsênio

Com a finalidade de selecionar a população bacteriana com tolerância ao As, os consórcios foram cultivados em meio Postgate B contendo arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck). Optou-se por utilizar primeiramente o sal de As V, tendo em vista o possível estresse metabólico causado aos s por compostos tóxicos de As. No

entanto, nas condições em que as amostras foram cultivadas, pH neutro e ambiente redutor, grande parte das espécies do elemento arsênio se encontra na forma III (reduzida). Com esse objetivo foi utilizado o meio de cultura líquido Postgate B com concentração inicial de As de 1 mgAs.L⁻¹. A adaptação dos consórcios ao As foi realizada adicionando doses crescentes dos seus sais. A cada repique a concentração foi o dobro em relação ao repique anterior, até que o crescimento microbiano não fosse mais observado. As concentrações de As foram determinadas a partir do padrão de limite Máximo de lançamento de efluentes permitido pelo CONAMA (0,5 mgAs.L⁻¹).

3.3 Extração de DNA e PCR

A análise da população dos 3 consórcios microbianos presentes nas amostras foi realizada utilizando-se as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Primeiramente foi feita a preservação da biomassa presente nos consórcios com tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) conforme protocolo descrito no Anexo 1.1. Após ressuspensão das células em Tampão PBS (Anexo 1.5.1), as amostras foram preservadas por congelamento a -20°C e então foi feita a extração do DNA genômico bacteriano das mesmas.

A fim de determinar o melhor método de extração de DNA para os consórcios estudados, foi utilizado primeiramente o protocolo de extração fenol-clorofórmio (Griffiths, Whiteley *et al.*, 2000), descrito no Anexo 1.2. Posteriormente foi testado o protocolo utilizando o kit Power Soil (MoBio), descrito no Anexo 1.3.

Utilizou-se a estratégia de semi nested-PCR para realização das amplificações, que consiste na amplificação separada dos fragmentos utilizando dois pares de iniciadores diferentes sendo o segundo par flanqueando uma região interna ao amplificado pelo primeiro par. O DNA foi inicialmente amplificado através da PCR utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYACTTGTTACGACTT-3'), específicos para a amplificação do gene DNAr 16S de micro-organismos do domínio *Bacteria*. As condições de amplificação por reação foram: Tampão de reação (1x), MgCl₂ (2,0mM), dNTP (0,8mM), iniciadores (500nM cada), BSA (0,2 mg.L⁻¹), *Taq* polimerase (1,5u.µL⁻¹). As reações foram incubadas em um termociclador Biocycler e o programa de amplificação consistiu nas seguintes etapas: 3 minutos a 94°C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 1minuto a 94°C (desnaturação), 1

minuto a 55°C (anelamento dos iniciadores) e 1 minuto a 72°C (extensão); 7 minutos a 72°C (extensão final). O resultado das amplificações foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X (Tris, Ácido acético glacial, EDTA). O gel foi submetido à corrida eletroforética em cuba de eletroforese imerso em tampão TAE 0,5X durante 40 minutos a 100 V. Após este procedimento, o gel foi corado com corante *SybrSafe* DNA gel *stain* (Invitrogen) e visualizados em um transluminador de luz Ultra Violeta (UV).

O DNAr foi reamplificado por PCR utilizando o segundo par de iniciadores, GC357F e 907R, específicos para a amplificação do gene RNAr 16S do domínio Bactéria e análise em DGGE (Muyzer, De Waal *et al.*, 1993). O programa de amplificação consistiu das seguintes etapas: 3 minutos a 94°C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação); 2 minutos a 50°C (anelamento dos iniciadores); 2 minutos a 72°C (extensão) e 20 minutos a 72°C (extensão final). Confirmada a presença dos produtos de PCR pela eletroforese em gel de agarose, o material foi analisado por meio da DGGE.

3.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os produtos do PCR obtidos a partir dos consórcios foram submetidos à técnica do DGGE para a separação dos fragmentos de DNA visando o sequenciamento e identificação das bactérias presentes nas amostras.

Para tanto, preparou-se o gel de acrilamida – bisacrilamida 6% com o gradiente desnaturante de uréia-formamida compreendido sempre entre 30 a 70% preparados a partir da solução de 30% de acrilamida-bisacrilamida (Anexo 1.5.3). Deixou-se o gel polimerizar por uma hora no suporte denominado “sanduíche”, como pode ser visualizado na foto da cuba de DGGE Modelo 2401 Marca C.B.S. Scientific Company, INC. (figura 3.1). O volume total do gel era de 12 mL, com 80 µL de APS e 5 µL de TEMED, polimerizantes. Colocou-se o Stacking Gel (Anexo 1.5.3) e deixou polimerizar por mais uma hora. O “sanduíche” era acondicionado na cuba imersa em tampão de corrida TAE 0,5 X.

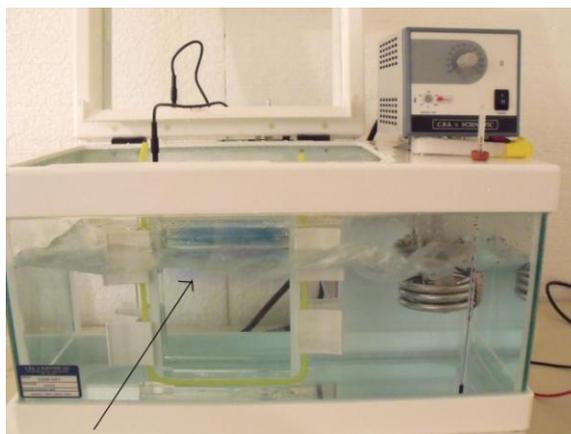


Fig. 3.1: Cuba de eletroforese em gradiente desnaturante, seta indica o gel acondicionado no “sanduíche”.

Em cada canaleta do gel, colocou-se 20 μL de cada uma das amostras dos consórcios estudados. O gel foi submetido a 100 V por 16 horas (960 minutos) a 60 °C e após a corrida eletrofóretica, foi corado com brometo de etídeo por 1h, visualizado sob luz UV em transluminador e fotografadas em câmera acoplada ao transluminador.

As bandas visualizadas nessa etapa foram recortadas do gel de poliacrilamida e imersas em 200 μL de solução tampão Tris (10 mM) ou em 200 μL de água destilada em microtubos. Foi adicionado perólas de vidro e agitou-se em vórtex por cerca de 30 segundos. Os microtubos foram deixados na geladeira por um período mínimo de 72h para eluição do DNA. Após esse período, centrifugou-se o microtubo a 13.000 rpm por 1 minuto e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Essas soluções com o DNA eluído foram utilizadas para uma re-amplificação com os mesmos iniciadores de DGGE para a realização de um novo experimento de DGGE. Após a mesma seqüência de procedimentos, objetivou-se a obtenção de fragmentos puros de uma única espécie com a finalidade de seqüenciar essas bandas e construção da árvore filogenética.

3.5 Caracterização dos isolados do consórcio I

Mesmo com o advento da biologia molecular, a microbiologia tradicional em muitos casos ainda se faz necessária. Observações microscópicas e testes metabólicos auxiliam e completam as análises de identificação dos micro-organismos.

Para tanto, foi realizado o isolamento das colônias de bactérias pelo método de espalhamento em placa, que consiste na diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) do material enriquecido das amostras de água e sedimento. De cada diluição foram colhidos 0,1mL e

aplicados sobre a placa de Petri contendo o meio de cultura Postgate B solidificado. As placas foram incubadas em uma cuba adaptada sob condições de microaerofilia em estufa bacteriológica a 35°C. Após o crescimento das colônias, as mesmas foram transferidas para frascos de 50 mL com meio de cultivo líquido Postgate B com o auxílio de alça de platina. As 13 culturas puras obtidas foram então caracterizadas por observação direta das características morfológicas das colônias bem como características da parede celular das células por meio da coloração diferencial de Gram. Realizou-se também uma avaliação da capacidade de formação de esporos bem como uma caracterização bioquímica por meio de cultivos em substratos definidos.

3.5.1 Caracterização morfológica e produção de esporos

A fim de detectar a capacidade de formação de esporos, alíquotas de 1,0 mL de meio de cultura foram diluídas em solução salina estéril (NaCl a 0, 85 %) na proporção de 1:10 (amostra: salina). As amostras foram submetidas a um choque térmico que consistiu no aquecimento gradual em banho-maria de 40 a 100 °C, permanecendo nesta temperatura por cerca de 10 minutos seguido de um resfriamento em banho com gelo por 5 minutos. Após esse procedimento, uma alíquota de 1 mL de cada isolado foi inoculado em placa com meio sólido Postgate B e incubada por 24 a 48 horas. Após esse período, foi observado o crescimento de colônias, caso o isolado em análise possuísse capacidade de esporulação.

Uma alíquota das amostras submetidas a choque térmico foi retirada para visualização das células e dos esporos em microscópio de luz comum. Para visualização dos esporos, foi utilizada a coloração verde de Malaquita. Esta coloração tingem os esporos de verde e as células são coradas de cor rósea – avermelhada pelo corante safranina, o que permite a distinção dos mesmos (Bartholomew e Mittwer, 1950).

Para caracterizar os isolados quanto ao processo respiratório, os mesmos foram incubados em meio de cultura sólido Postgate B por 24 a 48 horas em anaerobiose (atmosfera de N₂), com atmosfera de CO₂ (5-10% CO₂ v/v) e aerobiose.

3.5.2 Caracterização bioquímica

As provas bioquímicas são amplamente utilizadas para diferenciar e identificar bactérias por meio de suas atividades enzimáticas. Algumas das principais provas bioquímicas utilizadas para identificação de bactérias de interesse ambiental são: glicose,

lactose, indol, degradação da uréia, motilidade, sulfeto de hidrogênio, catalase, citrato de simmons (Bale e Matsen, 1981). A descrição da preparação desses meios e embasamento teórico está inserida no Anexo 2.

Além dessas provas bioquímicas foi utilizado o kit IAL (Meio Instituto Adolfo Lutz), conhecido comercialmente como meio de Rugai Modificado (Pessoa e Silva, 1972). Em apenas um tubo é possível verificar a produção de Indol, desaminação do L-Triptofano, fermentação ou não de glicose e sacarose, produção de gás, produção de H₂S, degradação da uréia, descarboxilação de L-Lisina e motilidade.

A semeadura no meio de Rugai Modificado foi realizada de acordo com a técnica de picada na base do meio e estrias no ápice. Os tubos unoculados foram incubados a 35 °C por 24 horas. Após esse período, foram feitas as leituras e interpretação dos resultados, de acordo com a tabela de perfil bioquímico de enterobactérias, de forma que:

- A fermentação da glicose foi observada entre a base da inclinação até a fase intermediária de cada tubo. O aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento indica a reação negativa.
- A fermentação da sacarose foi observada entre o pico da inclinação até a base da mesma. O aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento indica a reação negativa.
- A produção de gás foi observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento de bolhas indica que a reação foi positiva e o não aparecimento indica reação negativa.
- A produção de H₂S foi observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor preta indica reação positiva e o não aparecimento indica a reação negativa.
- Uréia: Observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor azul escuro a preto indica reação positiva e o meio inalterado indica a reação negativa.

- Lisina: Observada na fase inferior. O aparecimento da cor púrpura indica que a reação foi positiva e o aparecimento da cor amarela indica que a reação foi negativa.

- Indol: observada na base da tampa de algodão. O aparecimento da cor vermelha indica reação positiva e o não aparecimento indica reação negativa.

- Motilidade: Observada na fase inferior. Na reação positiva o meio apresenta turbidez e na reação negativa o meio fica inalterado.

Foi realizada também a prova de Catalase com cada um dos isolados obtidos. O material coletado com o auxílio de alça de platina no centro de cada colônia pura obtida após 24h de incubação foi colocada sobre uma lâmina de vidro limpa. Gotejou-se sobre a colônia uma solução de 30% de H₂O₂. Foi observado o imediato borbulhamento (liberação de gás) caso o resultado fosse positivo. O borbulhamento observado é devido á formação de O₂. Essa reação ocorre quando há presença da enzima catalase que desdobra H₂O₂ em H₂O e O₂.

Utilização de Fontes de Carbono diversas

Foram realizados testes bioquímicos relacionadas com a capacidade das bactérias em utilizarem diferentes substratos. Ao meio Postgate B foi adicionado apenas uma fonte de carbono por vez. As fontes de carbono testadas, nas respectivas concentrações por litro de meio, foram: 5,12 g.L⁻¹ de Etanol, 3,5 g.L⁻¹ de Lactato, 3,96 g.L⁻¹ de Acetato e 3,0 g.L⁻¹ de Citrato. Os testes foram realizados com os 13 isolados nas mesmas condições de cultivo já descritas. O resultado considerado como positivo foi baseado na observação da turvação e coloração preta do meio evidenciando a formação de sulfetos de ferro.

Teste de sensibilidade ao Arsênio pelos isolados do Consórcio I

Os 13 isolados obtidos antes da adaptação do consórcio I ao As foram testados quanto à sua capacidade em crescer em meio contendo 32 mgAs.L⁻¹. Para isso, os isolados foram incubados em meio Postgate B solidificado com ágar bacteriológico.

3.5.3 Caracterização Molecular dos isolados

Para a extração de DNA das culturas puras, foi realizado o protocolo de Lise Térmica segundo (Moore, Arnscheidt *et al.*, 2004), descrito no anexo 1.4. Após a obtenção de DNA

genômico, foi realizado a amplificação deste por PCR. Para as reações de amplificação por PCR visando o sequenciamento do DNAr 16S dos isolados, foram utilizados os iniciadores 1 e 2 respectivamente 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTA CTTGTTACGACTT-3'), específicos para a amplificação do gene DNAr 16S de s do domínio *Bacteria*. As condições de amplificação já foram descritas.

Os amplicons (produtos da PCR) obtidos a partir do DNA de culturas puras foram encaminhados para seqüenciamento dos fragmentos do DNAr 16S usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) pela empresa Genomic Engenharia Molecular (São Paulo). Os resultados dos fragmentos de bases obtidos foram comparados aos previamente depositados no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo possível a determinação do nível de similaridade com vários isolados bacterianos descritos na literatura. A partir da análise desses resultados foi construída uma árvore filogenética com o auxílio das ferramentas disponíveis no RDP X (Ribossomal Database Project Release 10 – (Cole, Wang *et al.*, 2009) para o alinhamento das mesmas com seqüências depositadas no seu banco de dados utilizando o modelo de Jukes-Cantor. A árvore filogenética contendo seqüências do gene DNAr 16S alinhados foi construída pelo método Neighbor Joining modificado disponível no RDP (Bruno, Succi *et al.*, 2000).

3.6 Experimentos de redução de Sulfato

Foram realizados experimentos em frascos de cultivo com volume de 500 mL, a fim de determinar a influência da taxa de precipitação de As no percentual de remoção de sulfato. Os experimentos de cultivo e redução de sulfato foram realizados em duplicata.

A quantificação do sulfato consumido pelo consórcios I (amostra do córrego do Funil) foi realizada segundo metodologia padrão (Kolmert, Wikström *et al.*, 2000). Segundo o método citado, a concentração de sulfato no meio foi determinada por meio do método turbidimétrico que consiste na leitura das amostras previamente preparadas com a adição de cloreto de bário. A formação de cristais insolúveis de sulfato de bário pôde então ser medida por um espectrofotômetro da marca *DEL LAB* (Modelo DLM-2000B) e posteriormente quantificados. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 420nm.

Inicialmente foi construída uma curva padrão a partir da leitura no espectrofotômetro de concentrações conhecidas de solução de sulfato de sódio. Essas concentrações foram obtidas a partir de diluições de uma solução estoque de sulfato de sódio a 600mg.L^{-1} . A curva padrão encontra-se inserida no Anexo 3.1.

O experimento foi realizado com meio Postgate B com concentração de sulfato reduzida para 3g/L e supressão de sulfato ferroso do meio a fim de evitar a formação de sulfeto de ferro precipitado, o que poderia dar um resultado falso positivo à análise. Com o objetivo de padronizar o inóculo usado nesse experimento, as amostras foram previamente incubadas por 4 dias e após esse procedimento foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. A biomassa de células resultantes foi ressuspensa com salina estéril (NaCl 0,85%) e 5% do volume total foram então inoculadas nos frascos testes.

Para a realização do experimento, alíquotas diárias de 1 mL foram retiradas para análise, totalizando 10 dias. Primeiramente foram realizadas as medidas de pH em um medidor digital de pH/milivolt DIGIMED, modelo DM-20 com eletrodo combinado de platina modelo DMR-CP1. Para os ajustes do pH inicial dos meios de cultivo foram utilizados soluções de HCl 1 e NaOH na concentração de $0,1\text{ mol.L}^{-1}$.

A alíquota foi diluída 10 X com água destilada e então centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm. Retirou-se 1 mL de sobrenadante e transferiu para um tubo graduado ao qual foi adicionado 1 mL de solução condicionante (detalhes da preparação da solução encontra-se inserida no Anexo 3.2). Após esse procedimento adicionou-se aproximadamente 60 mg de cloreto de bário e após homogeneizar a amostra em vórtex, a mesma foi colocada na cubeta e realizou-se a leitura da absorbância a 420 nm. Desta forma foi determinada uma curva de consumo de sulfato.

3.7 Caracterização dos precipitados por Difração de raios-X (DRX)

Com a finalidade de analisar os espectros dos precipitados formados, as amostras sólidas provenientes dos experimentos de cultivo em presença de sulfato e arsênio foram analisadas. Para tanto, a análise tanto do meio de cultivo na ausência como na presença de ferro foram analisadas. Foi verificada também a análise do precipitado formado do cultivo realizado com inóculo autoclavado. Para isso, as amostras de cultivo foram centrifugadas e o líquido descartado. O material sólido foi deixado para completa secagem em estufa a 50° C por cerca de 20 horas e então foi enviado para análise. Para a caracterização dos possíveis sulfetos formados, as amostras foram gentilmente analisadas pelo professor Geraldo Magela do Departamento de Química da UFOP. As amostras foram analisadas no difratômetro (Shimadzu - XRD 6000), acoplado com tubo de ferro e monocromador de grafite.

3.8 REFERENCIAS

BALE, M. J.; MATSEN, J. M. Time-motion and cost comparison study of micro-ID, API 20E, and conventional biochemical testing in identification of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, v. 14, n. 6, p. 665-70, Dec 1981. ISSN 0095-1137. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801085>.

BARTHOLOMEW, J. W.; MITTWER, T. A simplified bacterial spore stain. *Stain Technol*, v. 25, n. 3, p. 153-6, Jul 1950. ISSN 0038-9153. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15431137>.

BRUNO, W. J.; SOCCI, N. D.; HALPERN, A. L. Weighted neighbor joining: a likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction. *Mol Biol Evol*, v. 17, n. 1, p. 189-97, Jan 2000. ISSN 0737-4038. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666718>.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, v. 37, n. Database issue, p. D141-5, Jan 2009. ISSN 1362-4962. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004872>.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, n. 12, p. 5488-91, Dec 2000. ISSN 0099-2240. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11097934>.

KOLMERT, A.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K. B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J Microbiol Methods*, v. 41, n. 3, p. 179-84, Aug 2000. ISSN 0167-7012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958962>.

MOORE, E. et al. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In: (Ed.). *Molecular Microbial Ecology Manual*. 2^a. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar 1993. ISSN 0099-2240. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683183>.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 32, p. 97-100, 1972.

POSTGATE, J. R. Media for sulphur bacteria: some amendments. *Lab Pract*, v. 18, n. 3, p. 286, Mar 1969. ISSN 0023-6853. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5793197>.

CAPÍTULO IV- RESULTADOS

Artigo científico contendo os principais resultados obtidos a ser submetido a periódico científico internacional.

Seleção e caracterização de consórcio de bactérias arsenotolerantes com potencial para biorremediação

O Arsênio (As) está naturalmente presente no ambiente terrestre associado a minerais sulfetados em rochas e sedimentos. Devido a oxidações químicas e biológicas e principalmente a atividades ligadas à mineração e metalurgia, o As é mobilizado de depósitos naturais tornando-se um importante contaminante ambiental. Em baixíssimas concentrações, esse metalóide é tóxico para diversos seres vivos. Vários estudos têm sido realizados a fim de remediar tais impactos immobilizando este elemento. Dentre as metodologias propostas podemos optar por uma abordagem mais inovadora na qual é proposta a utilização de bactérias na remoção de metais de efluentes. O presente trabalho teve como objetivo geral a prospecção e identificação de bactérias resistentes ao Arsênio presentes em corpos d'água e sedimentos e em reator de tratamento de esgoto, visando uma potencial aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo este elemento. Para isso foram obtidos consórcios de diferentes amostras ambientais a fim de identificar aquelas com maior potencial de aplicação biotecnológica. Foram coletados sedimentos de córrego contaminado com esgoto doméstico em Ouro Preto, de lodo de reator UASB da ETE Arrudas, em Belo Horizonte, ambas em MG; e do sedimento do Mangue de Carneiros, em Tamandaré, PE. O perfil eletroforético das bandas obtido por DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) mostrou uma maior diversidade de bactérias tolerantes ao As nos dois consórcios provenientes de ambientes contaminados com esgoto. No entanto, houve uma diminuição da diversidade microbiana após cultivo em meio contendo As. Os resultados mostram a adaptação dos micro-organismos à concentração de As superiores ao exigido pelo padrão de limite máximo de lançamento de efluentes permitido pelo CONAMA 357 ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), o que indica um grande potencial de aplicação dos consórcios na remoção de As de efluentes industriais. Análises de redução de sulfato pelo consórcio I (Amostra Funil) apresenta alto percentual de remoção de sulfato, sendo capaz de remover cerca de 93% do sulfato contido no meio. A análise do precipitado

formado pelo Consórcio I indica a presença do mineral whitloquita $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$ sugerindo à hipótese de formação bacteriana que pode estar relacionado a mecanismos de substituição do fósforo pelo arsênio na célula ou servir como armazenamento para a regulação de elementos essenciais pelas bactérias. A identificação morfológica, bioquímica e molecular das bactérias isoladas do Consórcio I indica como presentes *Escherichia coli*, *Clostridium sp* e *Bacillus sp.*. Estas bactérias estão relacionadas a processos de biorremediação de metais.

4.1 INTRODUÇÃO

O arsênio ocorre no Meio Ambiente nos estados de oxidação -3, 0,+3 e +5, sendo a forma trivalente a mais tóxica (Jong e Parry, 2003). Em baixíssimas concentrações, esse metalóide é altamente tóxico para diversos seres vivos (Smedley e Kinniburgh, 2002). A intoxicação ocorre principalmente pela ingestão de águas contaminadas (Paoloni, Sequeira *et al.*, 2009). O As é encontrado na atmosfera, solos, rochas, nas águas naturais e nos organismos como elemento traço. Devido a oxidações químicas e biológicas o elemento é mobilizado de depósitos naturais tornando-se um importante contaminante ambiental (Jong e Parry, 2003). A ocorrência de impactos ao Meio Ambiente e conseqüentemente à saúde humana se deve principalmente às atividades antrópicas, ligadas à mineração e metalurgia, queima de combustíveis fósseis, uso de pesticidas e herbicidas e preservativos de madeira contendo As, na criação de gado e frango como aditivo alimentar para estimular o crescimento e como antibiótico (Chatain, Bayard *et al.*, 2005; Sapkota, Lefferts *et al.*, 2007). Uma das principais formas de mobilização do arsênio ocorre durante a exploração de metais ligados a pirita, como o caso do ouro. Este processo gera a drenagem ácida de mina e lixiviação de metais como o As, afetando principalmente o solo e os recursos hídricos (Shokes e Möller, 1998; Carbonell-Barrachina, Rocamora *et al.*, 2003; 2004; Jong e Parry, 2005; Duquesne, Lieutaud *et al.*, 2008; Fisher, Dawson *et al.*, 2008). A mobilização e disponibilização de Arsênio no Meio Ambiente afeta não só a saúde e qualidade de vida do Homem, como afeta todos os seres vivos através de uma série de impactos no Meio Ambiente. Devido à afinidade química entre este elemento e o grupo sulfidril de enzimas e proteínas, além de similaridade entre o elemento fósforo, o As bioacumula nos organismos vivos (Teixeira e Ciminelli, 2005; Lou, Ye *et al.*, 2010; Ventura-Lima, Bogo *et al.*, 2010). Devido à conscientização dos efeitos nocivos

provocados pela liberação de metais tóxicos no Meio Ambiente aliado à implantação de leis ambientais mais severas, surge a necessidade de pesquisas envolvendo tecnologias que reduzam os níveis de metais dos efluentes gerados pelas indústrias, a fim de atender os padrões de lançamento exigidos pela legislação vigente além de, é obvio, preservar o Meio Ambiente. Dentre as diversas alternativas possíveis de remoção de metais de efluentes líquidos, destaca-se a aplicação de processos biológicos no tratamento de efluentes contendo metais.

Os micro-organismos podem remover metais de uma solução por diferentes mecanismos. Tais como aqueles que envolvem a acumulação extracelular/precipitação, a adsorção iônica na superfície celular ou complexação, e a acumulação intracelular ou bioacumulação. O fenômeno que envolve a remoção de íons metálicos pela adsorção passiva por biomassa microbiana ou material derivado desta é chamado de biossorção (Volesky, 2007). O mecanismo que envolve a adsorção na superfície celular ou complexação de metais e conseqüente acumulação destes estão diretamente relacionados à produção de metabólitos pelos micro-organismos tais como H_2S ou H_2O_2 e produção celular de exopolímeros ácidos que podem se ligar e concentrar cátions metálicos. A produção desses metabólitos é conseqüência de um mecanismo de defesa da célula. Isso possibilita ao micro-organismo a permanência em ambientes nos quais a concentração de metais representa risco de toxicidade. Os produtos metabólicos precipitam os metais como sulfetos ou óxidos, gerando substâncias inofensivas (Asaulenko, Purishch *et al.*, 2004). Tais características que esses micro-organismos apresentam tem sido uma alternativa amplamente estudada e aplicada como técnica de biorremediação de efluentes industriais ligadas ao ramo da mineração e metalurgia. Dentre os micro-organismos mais estudados nestes processos destacam-se as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) (Labrenz, Druschel *et al.*, 2000; Ramamoorthy, Piotrowski *et al.*, 2009; Nevatalo, Bijmans *et al.*, 2010; Poinapen e Ekama, 2010).

A biomassa bacteriana tem sido cada vez mais utilizada nos processos de tratamentos de efluentes industriais, pois apresenta uma diversificação metabólica enorme com grande potencial de aplicação. A utilização e o aprimoramento de processos biotecnológicos no tratamento de efluentes industriais têm intensificado o interesse de empresários e pesquisadores relacionados com atividades de mineração e metalurgia. Os principais contaminantes encontrados nestes efluentes são metais e metais pesados, ânions como sulfato e cloreto e metalóides. Aliado aos métodos físico-químicos tradicionais,

tratamentos alternativos são cada vez mais utilizados diminuindo custos e evitando problemas ambientais devido à quantidade excessiva de lodo produzida na maioria destes processos (Chatain, Bayard *et al.*, 2005; Cohen, 2006).

Estudos sobre a diversidade e filogenia dos micro-organismos envolvidos nesses processos são cada vez mais necessários. A correta identificação dos micro-organismos e o melhor entendimento do metabolismo e transformações que esses micro-organismos mediam no ambiente são decisivos para a aplicação biotecnológica dos mesmos. Para tanto, o presente trabalho utilizou técnicas de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)/DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) para analisar a dinâmica populacional de 3 consórcios de bactérias obtidas de ambientes diversos e submetidas a diferentes concentrações de arsênio. A técnica de DGGE é amplamente utilizada no monitoramento de populações microbianas após perturbações ambientais devido à contaminação ambiental (Ciric, Griffiths *et al.*, 2010), contribuindo assim para o melhor entendimento da estrutura da comunidade em um determinado ambiente.

Através das técnicas moleculares de PCR e, subseqüentemente, o seqüenciamento do DNA foi possível a identificação dos isolados bacterianos presentes no consórcio I (Amostra Funil). No entanto para o estudo mais aprofundado das relações filogenéticas dessas bactérias foram realizados estudos clássicos de microbiologia. A identificação completa dos micro-organismos por meio da caracterização morfológica e bioquímica é importante passo para a compreensão da influência desses micro-organismos no Meio Ambiente e um fator fundamental no sucesso da aplicação dos mesmos em processos de biorremediação.

O presente trabalho teve como principal objetivo a prospecção e identificação de bactérias resistentes ao Arsênio, visando uma potencial aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo este elemento e sulfato e objetivando promover, principalmente, a bioprecipitação do arsênio na forma de seus respectivos sulfetos insolúveis.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Origem e Condições de cultivo dos Consórcios

Os consórcios foram obtidos de diferentes amostras ambientais a fim de investigar a melhor amostra com potencial aplicação biotecnológica na remoção de metais pesados, em especial o arsênio de efluentes industriais. Para tanto foram coletados sedimentos do córrego do Funil que capta esgoto doméstico da cidade de Ouro Preto, MG (Amostra I); lodo anaeróbico do reator UASB do Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento CePTS – UFMG/COPASA, localizado na planta de tratamento de esgoto do Arrudas em Belo Horizonte, MG. (Amostra III); e do Mangue de Carneiros localizado em Tamandaré, PE. (Amostra VII). O enriquecimento e manutenção dos consórcios foi feito em frascos de cultivo e incubados a 35°C em jarra de anaerobiose adaptada sob condições de atmosfera microaerófila. O meio de cultura utilizado foi o Postgate B obtido a partir do preparo de 2 soluções: Solução A - 0,5 gKH₂PO₄.L⁻¹, 1,0 gNH₄Cl.L⁻¹, 0,06 gCaCl₂.L⁻¹, 2 gMgSO₄.7H₂O.L⁻¹, 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,1 g.L⁻¹ de tioglicolato, 0,1 g.L⁻¹ de ácido ascórbico, 3,5 g.L⁻¹ de lactato de sódio; Solução B - 0,5 gFeSO₄.7H₂O.L⁻¹. As soluções A e B tiveram o pH ajustado para 7,0 ± 0,2 com solução de NaOH ou HCl na concentração de 0,1 mol.L⁻¹ e foram misturadas após esterilização na proporção 7:3. A Solução de Arsênio na concentração de 1 g.L⁻¹ foi preparada com 4,17 g de sal arsenato de sódio (Na₂HAsO₄.7H₂O, Merck) para 1L de água destilada. Todas as soluções foram esterilizadas por calor úmido em autoclave a 120°C à 1 atm durante 20 minutos. Para o enriquecimento das amostras uma alíquota de 10g de cada sedimento coletado foi transferida para um erlenmeyer contendo meio de cultura em uma proporção de 1:25 (amostra: meio). Os frascos foram incubados a 35°C por cerca de uma semana. Após este período, foi feita a observação da formação de um precipitado negro característico, indicativo da formação de sulfeto de ferro (FeS) proveniente da redução do sulfato. Uma alíquota de 10 mL do enriquecimento na proporção de 1:25 (amostra: meio) foi utilizada para a realização de um segundo enriquecimento. Após 3 enriquecimentos, os consórcios foram adaptados ao As em doses crescentes através da adição ao meio de cultura da solução de arsenato de sódio com concentração inicial de As de 1 mgAs.L⁻¹. O pH final de todos os cultivos em meio de cultura com As foi determinado. O crescimento do inóculo foi acompanhado visualmente pela alteração de cor do meio em função da

formação de FeS. Alíquotas das amostras foram preservadas em solução de glicerina a 80% visando os experimentos posteriores.

4.2.2 Adaptação dos Consórcios ao cultivo em presença de Arsênio

Com a finalidade de selecionar a população bacteriana com tolerância ao As, os consórcios foram cultivados em meio Postgate B contendo arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck). Optou-se por utilizar primeiramente o sal de As V, tendo em vista o possível estresse metabólico causado aos micro-organismos por compostos de As III, notadamente mais tóxicos. No entanto, nas condições em que as amostras foram cultivadas, pH moderadamente ácido a neutro e ambiente redutor, grande parte do arsênio se encontra na forma III (reduzida). Foi utilizado o meio de cultura líquido Postgate B com concentração inicial de As de 1 mgAs.L^{-1} . A adaptação dos consórcios ao metal foi realizada adicionando doses crescentes de As ao meio. A cada repique a concentração do elemento era duplicada em relação ao repique anterior, até se atingir a concentração máxima tolerada, ou seja, àquela a partir da qual não se observam sinais de crescimento microbiano. As concentrações de As no meio foram definidas a partir do padrão de limite máximo de lançamento de efluentes permitido pela legislação brasileira do Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA, ou seja, $0,5 \text{ mgAs.L}^{-1}$ (Conama, 2005).

4.2.3 Extração de DNA e amplificação por PCR

O DNA dos 3 consórcios adaptados às condições experimentais (0 e 8 mgAs.L^{-1}) foi extraído com o Kit PowerSoil (MoBio). Utilizou-se a estratégia de semi nested-PCR para realização das amplificações, que consiste na amplificação separada dos fragmentos utilizando dois pares de iniciadores diferentes sendo o segundo par flanqueando uma região interna ao amplificado pelo primeiro par. O DNA foi inicialmente amplificado através da PCR utilizando os iniciadores 27F ($5'$ -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- $3'$) e 1492R ($5'$ -TACGGYACTTGTTACGACTT- $3'$) (Lane, 1991), específicos para a amplificação do gene DNAr 16S de micro-organismos do domínio *Bacteria*. As condições de amplificação por reação foram: Tampão de reação (1x), MgCl_2 (2,0mM), dNTP (0,8mM), iniciadores 1 (500nM cada), BSA ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$), *Taq* polimerase ($1,5 \text{ u.}\mu\text{L}^{-1}$). As misturas foram incubadas em um termociclador Biocycler com a seguinte programação de amplificação: 3 minutos a 94°C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (anelamento dos iniciadores) e 1 minuto a 72°C (extensão); 7 minutos a 72°C (extensão final). O resultado das amplificações foi analisado em gel de agarose 1% em

solução tampão TAE 0,5X (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA). O gel foi submetido à corrida eletroforética em cuba de eletroforese imerso em tampão TAE 0,5X durante 40 minutos a 100 V. Após este procedimento, o gel foi corado com corante *SybrSafe* DNA gel *stain* (Invitrogen) e visualizados em um transluminador de luz Ultra Violeta (UV).

4.2.4 Análise por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O DNAr foi reamplificado por PCR utilizando o segundo par de iniciadores, GC357F e 907R, específicos para a amplificação do gene RNAr 16S do domínio Bactéria e análise em DGGE (Muyzer, De Waal *et al.*, 1993). O programa de amplificação consistiu das seguintes etapas: 3 minutos a 94°C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação); 2 minutos a 50°C (anelamento dos iniciadores); 2 minutos a 72°C (extensão) e 20 minutos a 72°C (extensão final). Confirmada a presença dos produtos de PCR pela eletroforese em gel de agarose, o material foi analisado por meio da DGGE.

Os produtos foram separados por DGGE em gel com gradiente desnaturante (30% a 70%) de uréia e formamida preparados a partir da solução de 30% de acrilamida-bisacrilamida com 80µL de APS e 5µL de TEMED. A corrida eletroforética se deu a 100 V durante 16 horas a 60°C em cuba de DGGE Modelo 2401 Marca C.B.S. Scientific Company, INC. Após este tempo, o gel foi corado com brometo de etídeo por 1h e visualizado sob luz UV.

4.2.5 Obtenção dos Isolados

O isolamento das colônias de bactérias do Consórcio I em meio sólido foi obtido a partir das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) do material enriquecido a partir das amostras de água e sedimento. De cada diluição foram colhidos 0,1mL que foram inoculados por espalhamento nas placas de Petri contendo o meio Postgate B solidificado com ágar a 2%. As placas foram incubadas em uma cuba anaeróbica em condição de microaerofilia em estufa bacteriológica a 35°C. Após o crescimento das colônias, as mesmas foram transferidas para frascos com meio de cultivo líquido Postgate B.

4.2.6 Caracterização morfológica dos isolados

Após serem submetidas à coloração diferencial pelo método de Gram, as culturas puras obtidas foram caracterizadas por observação direta das características morfológicas das colônias e das células em Microscópio óptico Olympus Modelo BX41 com aumento de 100X.

4.2.7 Identificação Bioquímica

Os 13 isolados foram identificados pelas principais provas bioquímicas utilizadas para identificação de micro-organismos: glicose, lactose, indol, degradação da uréia, motilidade, sulfeto de hidrogênio, catalase, citrato de simmons (Bale e Matsen, 1981). Além destas provas bioquímicas foi utilizado o kit IAL (meio Instituto Adolfo Lutz), conhecido comercialmente como meio de Rugai Modificado (Pessoa e Silva, 1972). Este kit facilita a identificação dos isolados, pois em apenas um tubo é possível verificar os resultados da produção de Indol, desaminação do L-Triptofano, fermentação ou não de glicose e sacarose, produção de gás, produção de H₂S, degradação da uréia, descarboxilação de L-Lisina e motilidade. Foram realizados testes bioquímicos relacionados com a capacidade dos isolados em utilizarem diferentes substratos orgânicos. As concentrações das fontes de carbono utilizadas foram: 5,12 g.L⁻¹ de Etanol, 3,5 g.L⁻¹ de Lactato, 3,96 g.L⁻¹ de Acetato e 3,0 g.L⁻¹ de Citrato. Para a realização de teste de sensibilidade ao O₂ e identificação do processo respiratório de cada um dos isolados, os mesmos foram incubados em placas de petri contendo meio de cultura solidificado com ágar sob duas diferentes condições: anaerobiose (a partir do uso jarra de anaerobiose com atmosfera de CO₂) e aerobiose (presença de O₂ atmosférico).

A capacidade de formação de esporos pelos isolados foi testada através do choque térmico das amostras de 40 a 100 °C, permanecendo nesta temperatura por cerca de 10 minutos seguido de um resfriamento em banho com gelo por 5 minutos. Após esse procedimento, uma alíquota de 1 mL de cada isolado foi inoculado em placa com meio sólido Postgate B e incubada por 24 a 48 horas. Após esse período, foi observado o crescimento de colônias, caso o isolado em análise possuísse capacidade de esporulação.

Uma alíquota das amostras submetidas a choque térmico foi retirada para visualização das células e dos esporos em microscópio de contraste de fase. Para visualização dos esporos, foi utilizada a coloração verde de Malaquita. Esta coloração tingem os esporos de

verde e as células são coradas de cor rósea – avermelhada pelo corante safranina, o que permite a distinção dos mesmos (Bartholomew e Mittwer, 1950).

Como os isolados (proveniente do consórcio I) foram obtidos antes da adaptação ao As, estes foram testados quanto à sua capacidade em crescer em meio contendo 32 mgAs.L⁻¹. Para isso, os isolados foram incubados em meio Postgate B solidificado com ágar nutriente a 2% contendo solução de arsenato de sódio.

4.2.8 Identificação Molecular dos Isolados

Para a extração de DNA das culturas puras do Consórcio I (Amostra Funil), foi realizado o protocolo de Lise Térmica (Moore, Arnscheidt *et al.*, 2004). Para as reações de amplificação por PCR visando o sequenciamento do DNAr 16S dos isolados, foram utilizados os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYACTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991), específicos para a amplificação do gene DNAr 16S de s do domínio *Bactéria*, segundo condições de amplificação descritas previamente.

O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando BigDye® Terminator v3.1 Ciclo de Sequenciamento (*Applied Biosystems*) pela empresa Genomic Engenharia Molecular (São Paulo, Brasil). As sequências obtidas foram alinhadas com o uso do modelo de Jukes-Cantor com as várias seqüências 16S rRNA depositadas no banco de dados do NCBI e avaliadas no RDP- 10 (Ribossomal Database Project Release 10 – (Cole, Wang *et al.*, 2009). A árvore filogenética contendo as sequências isoladas assim como as seqüências mais próximas depositadas no banco de dados foi construída pelo método Neighbor Joining modificado com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, ambos disponíveis no RDP (Bruno, Socci *et al.*, 2000).

4.2.9 Experimentos de redução de Sulfato

A fim de determinar a capacidade do consórcio I (Amostra Funil) em precipitar As e a influência do percentual de redução de sulfato na taxa de remoção de As, foram realizadas curvas de crescimento e consumo de sulfato em frascos de cultivo com volume de 500 mL com meio Postgate B. Para a realização deste experimento, o meio teve a concentração de sulfato reduzida para 3 g.L⁻¹ e supressão de sulfato ferroso do meio com a finalidade de

evitar a formação de sulfeto de ferro precipitado, o que poderia dar um resultado falso positivo à análise. Com o objetivo de padronizar o inóculo usado nesse experimento, as amostras foram previamente incubadas por 4 dias e após esse procedimento foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. A biomassa de células resultante foi ressuspensa em salina estéril e 5% do volume total foram então inoculadas nos frascos testes.

Para a realização do experimento, o pH inicial dos meios de cultivo foi medido com um medidor digital de pH/milivolt DIGIMED, modelo DM-20 com eletrodo combinado de platina modelo DMR-CP1. Alíquotas de 1 mL foram retiradas diariamente dos frascos testes para análise de pH e sulfato. A determinação de sulfato nas amostras foi realizada por técnicas espectrofotométricas, segundo metodologia estabelecida por (Kolmert, Wikström *et al.*, 2000), na qual a concentração de sulfato no meio é determinada por método turbidimétrico que consiste na leitura da absorbância das amostras a 420 nm após adição de cloreto de bário que ocasiona a formação de cristais insolúveis de sulfato de bário. A absorbância da amostra medida em espectrofotômetro *DEL LAB* Modelo DLM-2000B é proporcional ao teor de sulfato presente na amostra. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.2.10 Caracterização dos precipitados por Difração de raios-X (DRX)

Com a finalidade de analisar os precipitados formados, as amostras sólidas provenientes dos experimentos de cultivo do Consórcio I (Amostra Funil) em presença de sulfato e arsênio foram analisadas. Para tanto procedeu-se à análise dos produtos do crescimento microbiano em cultivos acrescidos ou não de ferro. Foi também analisado o precipitado formado durante experimentos com inóculo morto por autoclavagem. Os precipitados obtidos foram centrifugados e o líquido descartado. O material sólido foi deixado para completa secagem em estufa a 50°C por cerca de 20 horas e então enviado para análise e caracterização dos possíveis sulfetos formados em difratômetro de Raios-X (Shimadzu - XRD 6000), acoplado com tubo de ferro e monocromador de grafite.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Enriquecimento e Adaptação dos Consórcios ao cultivo em presença de Arsênio

Os três consórcios microbianos investigados apresentaram crescimento, evidenciado pela visualização de um precipitado negro sugestivo da redução de sulfato e formação de FeS pelos micro-organismos presentes no consórcio. Após três enriquecimentos os consórcios foram adaptados ao As. A cada repique, os consórcios foram submetidos ao contato com doses crescentes de arsenato de sódio (1 a 32mgAs.L⁻¹). Todas as amostras cresceram até a concentração de 8 mgAs.L⁻¹. O consórcio I apresentou maior adaptação a concentração de As no meio em relação aos outros consórcios, apresentando crescimento na maior concentração testada (32 mgAs.L⁻¹).

4.3.2 Perfil de DGGE

O DNA dos consórcios amplificado por PCR foi submetido à análise por DGGE com gradientes desnaturantes de uréia-formamida de 30-70%. Foram analisados os fragmentos do DNA ribossomal 16S amplificados por PCR com pares iniciadores para o domínio *Bacteria*. Por meio do perfil de bandas visualizado no gel após a corrida eletroforética (figura 4.1) é possível fazer uma análise do comportamento adaptativo das comunidades bacterianas presentes nas amostras antes e após a adaptação ao As. Considerando o perfil de bandas obtidos nos consórcios antes da adição de As, pode-se observar que estes eram constituídos por poucos grupos bacterianos, representados por 5-6 bandas de DNA (amostras IA e IIIA). A análise do perfil eletroforético do DGGE permite a visualização da dinâmica da população microbiana dos consórcios de acordo com adição de As. Estes consórcios alteraram significativamente sua composição bacteriana após 15 dias de exposição a 8 mgAs.L⁻¹, tanto na posição quanto no número de bandas. O consórcio I manteve o mesmo número de bandas, porém em posições diferentes à observada na condição sem arsênio, assim, indicando que houve uma alteração significativa na comunidade bacteriana predominante. Nos demais consórcios a mudança observada no perfil de bandas se refere à diminuição de bandas (consórcio IIIB) e a manutenção da única banda nas duas condições pelo consórcio VII. Os resultados revelam uma maior diversidade de bactérias tolerantes ao As nos dois consórcios provenientes de ambientes contaminados com esgoto (amostras I e III). A amostra I apresenta a maior diversidade

dentre as amostras estudadas e também apresenta amostra com maior quantidade de bandas após à adaptação ao As.

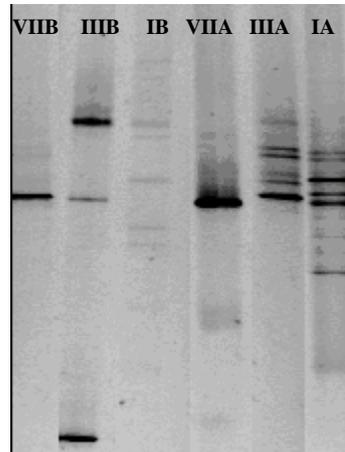


Figura 4.1: Imagem de Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) corado com Brometo de Etídeo contendo fragmentos de DNA ribossomal 16S amplificado com iniciadores universais para Bacteria. (Amostras A adaptadas a 8 mgAs.L^{-1} ; amostras B : ausência de As no meio).

A análise desses dados indica um grande potencial de aplicação do consórcio I na remoção de As de efluentes industriais visto que apresenta maior número provável de espécies bacterianas resistentes ao As. Considerando os resultados sob concentrações mais elevadas de arsênio, esse consórcio apresentou crescimento em meio de cultivo com arsênio na concentração de até 32 mgAs.L^{-1} , cerca de 64 vezes o valor máximo permitido em efluentes industriais pela legislação brasileira CONAMA ($0,5 \text{ mgAs.L}^{-1}$).

4.3.3 Consumo de Sulfato

Na figura 4.2 encontra-se os resultados referentes ao consumo de sulfato pelo consórcio I na presença de arsênio. A análise de consumo de sulfato indicou a capacidade do consórcio I em reduzir sulfato em condições de acidez (pH em torno de 5,5). O consórcio I apresenta altas percentuais de remoção de sulfato, sendo capaz de remover cerca de 93% do sulfato contido no meio. Soma-se a isso o fato de que o consórcio foi ainda capaz de elevar o pH do meio de 5,4 à neutralidade. A alcalinização do meio é provavelmente mediada por íons bicarbonatos proveniente da degradação do lactato pelos micro-organismos redutores de sulfato (Liamleam e Annachhatre, 2007).

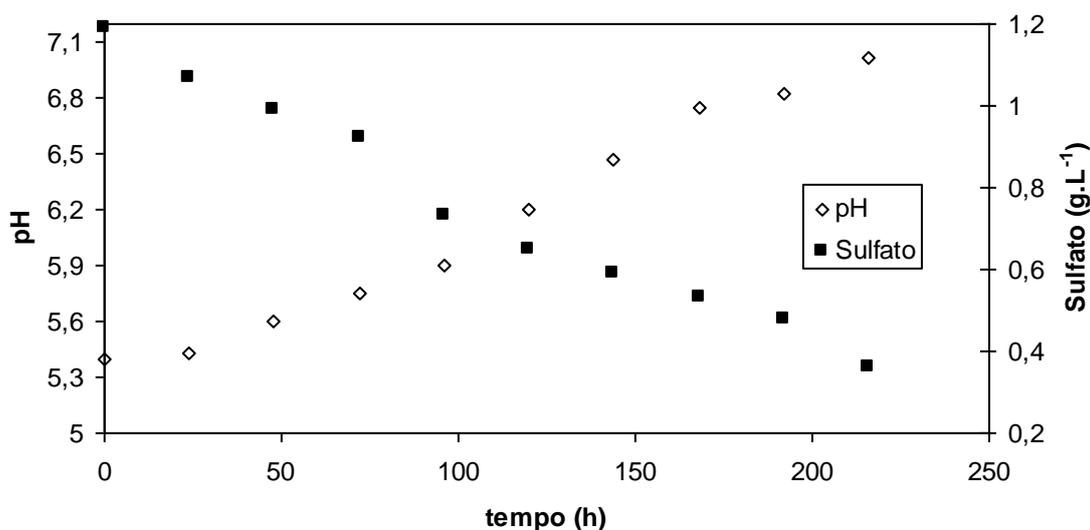


Figura 4.2: Curva de remoção de sulfato e variação de pH do consórcio I sob cultivo em presença de arsênio.

A acidez de efluentes industriais representa um parâmetro crítico no tratamento biológico dos mesmos, pois para a maioria dos micro-organismos o potencial hidrogeniônico afeta o metabolismo microbiano e conseqüentemente a remoção de metais. A capacidade dos micro-organismos presentes no consórcio I em tolerar condições moderadas de acidez e, além disso, modificar essa condição através do metabolismo reforça a possibilidade de aplicação biotecnológica desse consórcio.

Os resultados encontrados corroboram com os descritos na literatura. O tratamento de efluentes ácidos com sulfato e metais através da utilização de consórcios de BRS apresenta

resultados satisfatórios. Em estudos sobre a remoção de sulfato e metais em reator anaeróbio foi observado a geração de alcalinidade no tratamento de efluente com o aumento do pH de 4 para 7 e percentuais de remoção de sulfato e arsênio em torno de 80% (Jong e Parry, 2003).

4.3.4 Caracterização e identificação dos Isolados

O consórcio I, por apresentar, dentre os consórcios estudados, maior potencial de uso na biorremediação de efluentes contaminados com arsênio, foi caracterizado quanto aos aspectos morfológicos e bioquímicos com a finalidade de identificação do gênero e/ou espécies. A identificação foi realizada observando-se as características morfológicas tanto das células (forma, arranjo, entre outras) quanto das colônias (tamanho, cor, entre outras). Além disso, provas bioquímicas relacionadas com a capacidade das bactérias em sintetizar enzimas e assimilarem diferentes substratos e gerar produtos metabólicos específicos foram investigadas.

Foram selecionadas 25 colônias que apresentaram diversidade morfológica. Destas apenas 13 apresentaram resultado positivo para redução de sulfato, quando reinoculadas em meio de cultura líquido. Estes 13 isolados foram caracterizados microscopicamente (tabela 4.1). As colônias apresentaram-se predominantemente circulares, com coloração esbranquiçada e com aspecto cremoso ou opaco e borda ondulada ou lisa. Os grupos morfológicos foram caracterizados como Gram - os isolados: I1A, I1, I2, I4, I5, I6, I7, I8, I10 e I11 e como Gram + os isolados: I3, I3A e I9. Quanto à forma, as células apresentam-se predominantemente na forma de bastonetes sem arranjo. Foram encontrados em menor proporção formas bacilares, vibriões e de cocos. Quanto à capacidade de formar esporos, apenas os isolados I3, I3A e I9 apresentam tal característica. Esses isolados cresceram em meio de cultivo após choque térmico. Essa característica foi confirmada pela visualização das estruturas em microscópio óptico após coloração dos esporos com corante verde de malaquita.

Tabela 4.1: Caracterização morfológica dos isolados obtidos a partir do Consórcio I.

Isolado	Característica das Colônias	Gram	Morfologia ao M.O	Esporos
I1A	Esbranquiçada com brilho cremoso central	-	Bastonetes limão	-
I1	Pequenas e esbranquiçadas	-	Bastonete sem arranjo	-
I2	Pequenas e esbranquiçadas	-	Bastonetes sem arranjo	-
I3A	Pequenas, opacas e esbranquiçadas	+	Bastonetes sem arranjo	+
I3	Pequenas, cremosas e esbranquiçadas	+	Cocos sem arranjo	+
I4	Pequenas e esbranquiçadas	-	Bastonetes sem arranjo	-
I5	Pequenas, cremosas e esbranquiçadas	-	Bastonetes afinados	-
I6	Redonda e esbranquiçadas ao centro	-	Vibriões	-
I7	Forma tipo estrela esbranquiçada	-	Estreptobacilos capsulados	-
I8	Pequenas e com borda irregular	-	Bastonetes afinados	-
I9	Espalhada, precipitado negro	+	Cocos sem arranjo	+
I10	Espalhada e esbranquiçada	-	Bastonetes capsulados	-
I11	Espalhada, precipitado negro	-	bastonetes	-

A partir da identificação morfológica básica, as bactérias foram caracterizadas quanto à sua atividade metabólica por meio de uma série de testes bioquímicos. A caracterização metabólica dos isolados fornece informações importantes, além de possibilitar a identificação justificando a aplicação industrial destes. Assim, investigando quais carboidratos os micro-organismos podem degradar pode-se inferir se um determinado isolado pode ser utilizado no tratamento de um efluente de uma determinada indústria. Esta abordagem diminui custos com meios de manutenção de crescimento microbiano, sendo amplamente utilizada no tratamento de efluentes de indústrias alimentícias e bebidas no qual um subproduto dessas indústrias pode ser substrato do isolado.

No que se refere à indústria minero-metalúrgica, tais aspectos são poucos explorados e estudos de caracterização de micro-organismos de ambientes ácidos ainda são insuficientes e insatisfatórios. Isso se deve, muitas vezes, à dificuldade em cultivar tais micro-organismos, pois frequentemente as condições de crescimento dos mesmos são desconhecidas.

Os resultados dos testes metabólicos dos isolados estão apresentados na tabela 4.2. A maioria dos isolados são caracterizados por fermentar a glicose e sacarose sem produção de gás e degradar a lactose. Os isolados I4 e I9 são capazes de usar citrato como única fonte de carbono, o que evidencia a presença da enzima citrato permease nos mesmos. Apenas o isolado I11 é capaz de utilizar uréia como única fonte de nitrogênio. Quanto à utilização do aminoácido triptofano visualizado a partir da produção de indol, todos os isolados possuem tal característica. Por outro lado, o uso de aminoácidos sulfurados, visualizado a partir da produção de H₂S só pode ser realizada pelos isolados I6 e I11. A descarboxilação de L-Lisina é realizada pelos isolados I3, I4, I9 e I10. Todos os isolados são móveis e são incapazes de realizar a desaminação do L-Triptofano.

Os testes metabólicos referentes à utilização de diferentes fontes de carbono em meio de cultivo Postgate B, apresentam variações entre os isolados dependendo da fonte de carbono, com exceção de citrato. Neste caso, todos isolados apresentam crescimento. A maioria dos isolados utiliza etanol como fonte de carbono, com exceção dos isolados I4, I5, I6 e I7. Por outro lado, apenas os isolados I1A, I1, I8 e I9 utilizam acetato como única fonte de carbono. Parte dos isolados não utiliza lactato como única fonte de carbono no meio de cultivo (I2, I4, I5, I6, I7 e I8), sendo interessante ressaltar que, o crescimento dos consórcios bem como o isolamento do consórcio I foi realizado com meio de cultivo com lactato como única fonte de carbono. Esses resultados sugerem a possibilidade de relações sintróficas entre os micro-organismos do consórcio I, ou seja, o produto metabólico de um isolado serviria como nutriente de outro isolado. Essas relações representam um papel relevante na biorremediação de efluentes ácidos e com metais (Icgen e Harrison, 2006).

Tabela 4.2: Caracterização Bioquímica dos isolados do Consórcio I.

Isolado	LTD	Lis.	Glicose		Sac.	Fontes de Carbono em meio Postgate B				Catalase	Micro-aerofilia	Aerofilia	Lact.	Cit.	Ur.	SIM		
			Ác.	Gás		Acetato	Lactato	Etanol	Citrato							Indol	H ₂ S	Motil.
I1A	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
I1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
I2	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
I3A	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
I3	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
I4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
I5	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+/-	+	-	-	+	-	+
I6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	-	-	-	+	+
I7	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+/-	+	-	-	+	-	+
I8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+	-	+
I9	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
I10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
I11	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Legenda: LTD: desaminação do L-Triptofano. Lis. Descarboxilação de L-Lisina. Ác.: formação de ácido. Sac.: fermentação de sacarose. Lact.: Utilização de lactose como fonte de carbono. Cit.: Utilização de Citrato como fonte de carbono. Ur. Hidrólise da uréia. Motil: Motilidade.

Todos os 13 isolados obtidos apresentaram crescimento positivo ao serem testados quanto à sua capacidade em crescer em meio contendo 32 mgAs.L^{-1} . As colônias apresentaram modificação morfológica estrutural quando comparadas às mesmas colônias crescidas em meio sem arsênio. Os isolados apresentaram crescimento difuso e espalhado na placa com meio contendo arsênio. É importante ressaltar que todos os cultivos, tanto na presença como ausência de As foram realizados nas mesmas condições.

Estes resultados indicam a possibilidade tanto da aplicação de culturas puras como do consórcio em processos de tratamento de efluentes industriais contendo As. No entanto, para isso mais estudos se fazem necessários com os isolados objetivando a aplicação dos mesmos nesses processos.

Como pode ser observado na tabela 4.2, os isolados apresentam crescimento tanto em condições de microaerofilia como em aerofilia. Apenas os isolados I5, I6, I7 e I8, apresentaram inibição no seu crescimento em condições de aerofilia, quando comparado com o crescimento em ambiente microaerófilo. Esses resultados indicam uma boa tolerância ao O_2 pelos isolados estudados e sugerem que a caracterização dos mesmos como anaeróbio facultativo. O teste da atividade de catalase revelou que os isolados são positivos, indicando assim um possível metabolismo oxidativo. A catalase protege a célula contra os danos recorrentes do metabolismo de redução de oxigênio. Há relatos na literatura da presença de catalase em micro-organismos anaeróbios como as Bactérias Redutoras de Sulfato, evidenciando a capacidade desses micro-organismos em sobreviver em ambientes oxigenados (Wieringa, Overmann *et al.*, 2000).

Tal característica é muito importante na aplicação de micro-organismos em escala industrial. Geralmente, os efluentes têm características bem variadas, dependendo das mudanças sazonais que ocorrem nos processos produtivos. Por exemplo, em uma indústria petroquímica, a cada etapa do processo produtivo, o efluente lançado apresentará características bem diversas umas das outras. Neste caso, o efluente pode apresentar produtos químicos utilizados nos processos de refinamento ou beneficiamento e também pode apresentar resíduos originados do próprio petróleo, como fenóis, hidrocarbonetos e metais pesados. Desta forma, os micro-organismos não são afetados por tais mudanças,

pois nos processos em que os ambientes possuem certo nível de oxigênio ou ausência deste elemento, a sua restrição não será limitante para o crescimento e degradação dos resíduos pelos micro-organismos. Já nos casos em que há grande concentração de oxigênio, não haverá inibição da atividade microbiana devido à capacidade de adaptação a mudanças ambientais pelos isolados.

A identificação dos micro-organismos foi executada de acordo com a metodologia descrita. A partir da caracterização morfológica e dos resultados obtidos das análises bioquímicas e com o auxílio do Manual de identificação de bactérias Bergey (Holt, 1994) procedeu-se a provável identificação das mesmas. Todos os isolados foram submetidos à identificação molecular pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA e análise da seqüência no RDP-10 que resultou em altos níveis de similaridade com espécies bacterianas conhecidas. Como pode ser observado na tabela 4.3, o seqüenciamento revelou a identificação dos isolados com a espécie *Escherichia coli* (isolados I1A, I1, I2, I4, I5, I7, I8, I10 e I11) e com o gênero *Escherichia sp.* (isolado I6). A Figura 4.3 apresenta a árvore filogenética contendo os isolados I3 e I9, onde pode ser observada a alta similaridade destes isolados com seqüências dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

Representantes desses 3 grupos filogenéticos são freqüentemente relacionados à área da saúde sendo agentes patogênicos. No entanto, os mesmos já foram relacionados à contaminação ambiental e resistência a metais e o isolamento de representantes desses grupos de ambientes naturais com o propósito de aplicações em processos de biorremediação está bem estabelecido.

Tabela 4.3 Proximidade taxonômica entre os isolados seqüenciados e as bactérias catalogadas no *GenBank*.

Isolado	Filiação (Gen Bank)	Similaridade Máxima	Ambiente	Referência
I1 e I1A	<i>Escherichia coli</i> C2; AF511430	100%	Sedimento de caverna	Ovesen J., <i>et al.</i> (Unpublished)
I2, I4, I5, I7 e I8	<i>Escherichia coli</i> C2; AF403733	100%	Lodo anaeróbio	(Chamkha, Record <i>et al.</i> , 2002)
I3	<i>Bacillus</i> sp.; EU417655	100%	Aterro sanitário	Krishnamurthi S., <i>et al.</i> (Unpublished)
I6	<i>Escherichia</i> sp. 253b; AY082448	100%	Drenagem ácida de mina	Labrenz M., <i>et al.</i> (Unpublished)
I9	<i>Clostridium</i> sp. enrichment culture clone tpsrb004; tp_16695_004.; GQ503832	100%	Fonte termal	Raychaudhuri., <i>et al.</i> (Unpublished)
I10 e I11	<i>Escherichia coli</i> ; AF233451	100%	Ovos contaminados	Wang R.-F., <i>et al.</i> (Unpublished)

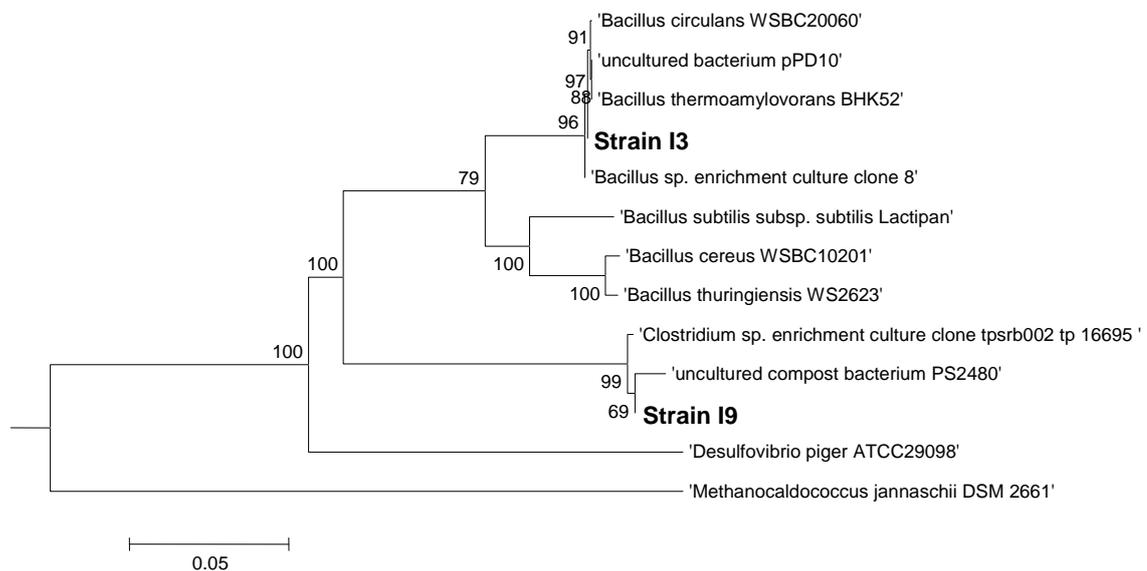


Figura 4.3. Árvore filogenética contendo sequências do gene DNAr 16S (~ 400 pb) construída pelo método Neighbor-Joining. Análise de Bootstrap com 1000 réplicas. Barra corresponde a 0,5%.

Embora os micro-organismos identificados não sejam tradicionalmente pertencentes ao

grupo das Bactérias Redutoras de Sulfato, a capacidade de redução de sulfato foi realizada pelos micro-organismos do consórcio I. Embora não haja estudos sobre o metabolismo redutor de sulfato em *E. coli*, esta característica já foi relatada em representantes da família *Enterobacteriaceae* (Qiu, Zhao *et al.*, 2009; Patrício, Silva *et al.*, 2011). Há citações na literatura como possuidores do metabolismo de redução de sulfato tanto o gênero *Clostridium* (Martins, Faleiro *et al.*, 2010) como *Bacillus* (Asaulenko, Abdulina *et al.*, 2010). É importante ressaltar que os isolados foram identificados com pertencentes a três grupos taxonômicos distintos e o consórcio I do qual esses isolados foram obtidos apresentaram 6 bandas nos experimentos de DGGE, o que indica a possibilidade da existência de Bactérias Redutoras de Sulfato no consórcio, não sendo possível a identificação das mesmas. A baixa diversidade obtida com isolamento em relação à diversidade visualizada no gel pode estar relacionada à problemas inerentes ao cultivo.

O gênero *Bacillus* tem sido amplamente relacionado a processos de biorremediação. Recentemente, a aplicação de vários tipos de micro-organismos, dentre eles a espécie *Bacillus cereus* foi estudada com a finalidade de remediar solo contaminado com vários tipos de metais pesados (Azcón, Perálvarez *et al.*, 2010). Neste estudo, foi revelada a bioremoção de metais no solo após a remediação do solo com os micro-organismos. Foi realizado o cultivo de plantas antes e após a biorremediação. A análise da biomassa das plantas revelou a diminuição de metais após a remediação do solo com micro-organismos.

Bactérias do gênero *Bacillus* tem sido relacionada também a processos de biossorção e biomineralização podendo a espécie *Bacillus cereus* ser utilizada na biossorção de níquel (Abdel-Monem, Al-Zubeiry *et al.*, 2010) e a espécie *Bacillus sphaericus* na biossorção e bioacumulação de arsênio, mercúrio, cobre, ferro e cromo (Velásquez e Dussan, 2009). *Bacillus sp* tem sido aplicada também na redução arsenato. Esta espécie apresenta a enzima arsenato redutase quando cultivada em presença de As, o que potencializa a aplicação da espécie na bioremoção de As (Yamamura, Ike *et al.*, 2003).

A bioremoção de As tem sido estudada através da redução respiratória de arsenato (As (V)) a arsenito (As (III)) por consórcio no qual os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* estão presentes (Zhang, Jia *et al.*, 2008). Outros estudos têm relacionado o gênero *Clostridium* à remediação de As, atuando na redução de arsenato (Wilopo, Sasaki *et al.*, 2008) e na biotransformação do composto orgânico roxarsone (Stolz, Perera *et al.*, 2007).

Kim, Lee *et al.* (2010) utilizaram carvão ativado contendo *Bacillus sp.* e *Escherichia coli* “*in situ*” com o objetivo de adsorverem arsenato e arsenito. Outros estudos têm sido realizados com a aplicação de *E. coli* no tratamento de águas residuárias contendo metais e metalóides como o arsênio. A eficácia de um filtro de bioareia alterado com adição de *E. coli* e pregos de ferro foi testada na remoção de arsênio de águas subterrâneas, por exemplo (Chiew, Sampson *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dos estudos envolvendo *E. coli*, estão relacionados ao uso de recombinantes dessa espécie. Park, Won *et al.* (2010), estudaram a aplicação de biomassa de *E. coli* modificada com resíduos de cloridrato polyallylamine (HAP), um polímero quelante, na remoção e recuperação de Pd (II) de solução aquosa. Saffar, Yakhchali *et al.* (2007) avaliaram com sucesso, o uso de recombinantes *E. coli* com *pilli* modificado para adsorção e recuperação de cádmio e níquel de águas residuárias. Estes estudos são relevantes na aplicação de micro-organismos na área biotecnológica, entretanto a utilização de *E. coli* indígena merece maior atenção. Há relatos na literatura que apontam o potencial de comunidades microbianas indígenas em processos de biorremediação (Yu, Ke *et al.*, 2005). O potencial de aplicação de *E. coli* em aplicações industriais como em processos de beneficiamento e tratamentos de minerais devido a propriedades absorptivas de constituintes da parede celular tem sido avaliado.

Diante das possibilidades de aplicação de micro-organismos indígenas nos diversos processos biotecnológicos, os ambientes naturais oferecem um amplo recurso. Estas tecnologias vêm ganhando destaque, pois são mais simples, apresentam maior eficiência e menor custo e a correta identificação e caracterização dos micro-organismos envolvidos é um passo importante neste processo.

4.3.5 Caracterização dos precipitados

A Caracterização dos precipitados gerados durante o cultivo do consórcio I em presença de sulfato e arsênio foi realizado por técnica de Difração de Raios X. Os espectros dos precipitados formados em presença de As na concentração de 16 mg.L⁻¹ podem ser observados nas figuras 4.4 e 4.5. Os precipitados analisados diferem quanto à utilização do inóculo que no caso da figura 6, o precipitado é gerado após cultivo utilizando-se células inativadas por autoclavagem.

A análise da intensidade dos picos do espectro do precipitado formado pelo consórcio I

indica a presença do mineral whitloquita $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$ representado por W na figura 4.4, um fosfato encontrado em sistemas biológicos e que tem sido relacionado a patologias odontológicas humanas, como cáries dentárias. Sua ocorrência em sistemas biológicos é geralmente devido a elevadas concentrações de proteolipídeos e cátions divalentes (Lagier e Baud, 2003). A análise tanto do meio de cultivo na ausência como na presença de ferro indicaram a formação desse mesmo composto. Por outro lado, a análise do precipitado do consórcio com inóculo autoclavado indicou a formação de hematita, Fe_2O_3 (representado por H na figura 4.5). Esses compostos poderiam ser originados do meio de cultivo por precipitação química, no entanto o cultivo das amostras foi realizado nas mesmas condições e a ausência de grupos fosfatos no meio em que o inóculo foi autoclavado indica que a formação de fosfato pode ter origem bacteriana.

O arsenato é semelhante ao fosfato (PO_4^{3-}) quanto à sua estrutura química. Por isso, é possível a entrada de arsênio no citoplasma celular através do sistema de transporte de fosfato na membrana plasmática. Segundo estudos sobre o protozoário *Euglena gracilis* presente em drenagens ácidas de minas com arsênio, a absorção de As (V) do meio ocorreria por competição com o fosfato e então haveria a redução intracelular de As (V) para As (III), e posterior complexação por ligantes tíois proteicos de baixo peso molecular no citoplasma (Miot, Morin *et al.*, 2009).

Algumas bactérias possuem o mecanismo de substituição do fósforo presente no DNA e proteínas da célula por As. A literatura recentemente tem relatado casos de micro-organismos que crescem na ausência de fósforo e presença de arsenato (Tawfik e Viola, 2011) e a formação de análogos dos polinucleotídeos ADP e ATP arsenilados tem sido propostos (Németi, Regonesi *et al.*, 2010).

Nos sistemas biológicos, organismos diversos, que vão desde as bactérias e células isoladas de invertebrados e vertebrados, sintetizam ortofosfatos de cálcio. Acredita-se que a formação de ortofosfatos de cálcio em organismos primitivos permitem o armazenamento e a regulação de elementos essenciais como cálcio, fósforo e, possivelmente, de magnésio. A morfologia dos precipitados nestes organismos (pequenos nódulos de cálcio intracelular de fosfatos amorfo, geralmente localizados na mitocôndria) supririam as necessidades de rápida mobilização e controle intracelular da concentração destes elementos (Dorozhkin e Epple, 2002; Dorozhkin, 2010). Assim, a absorção intracelular de As ocorreria por troca

pele elemento fósforo que seria transportado para o meio extracelular (Wolfe-Simon, Blum *et al.*, 2010).

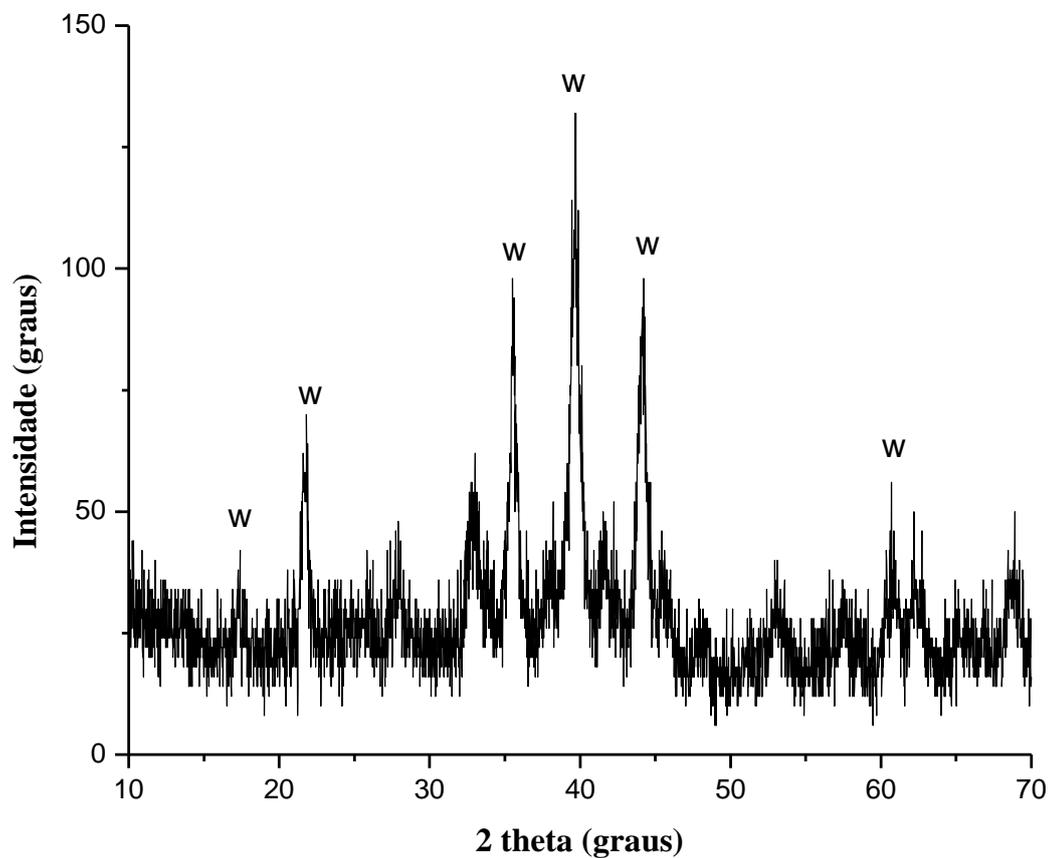


Figura 4.4: Espectro de Difração de Raios X do precipitado gerado após cultivo do Consórcio I sob cultivo em meio líquido contendo sulfato na concentração de 3 g.L^{-1} e arsênio na concentração de 16 mg.L^{-1} .

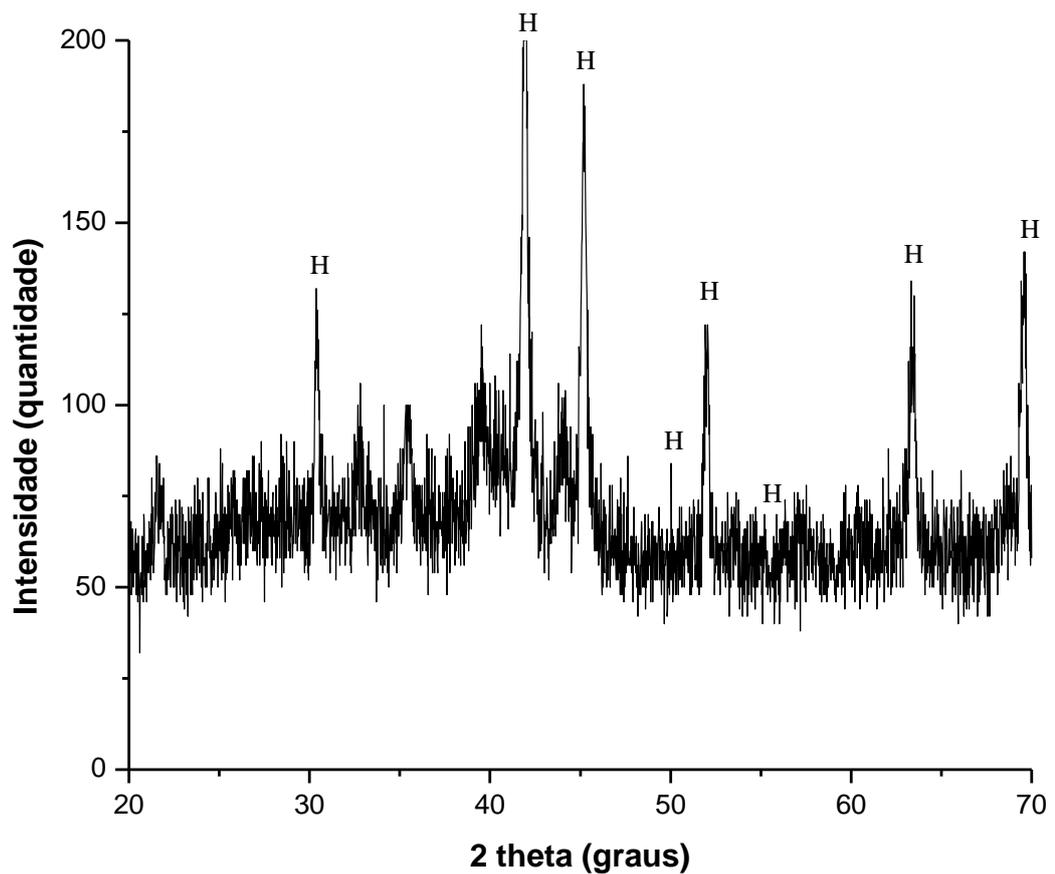


Figura 4.5: Espectro de Difração de Raios X do precipitado gerado após cultivo do Consórcio I em meio líquido contendo sulfato na concentração de 3 g.L^{-1} e arsênio na concentração de 16 mg.L^{-1} utilizando-se células inativadas por autoclavação.

Os resultados revelam, como esperado, maior diversidade de bactérias tolerantes ao arsênio nas amostras provenientes de contaminações ambientais por esse metal devido à provável adaptação histórica desses micro-organismos ao contaminante. Os precipitados formados sugerem o envolvimento de processos microbianos, mas esses processos não podem ser comprovados pelas análises realizadas. Foi verificada também a redução de sulfato por consórcio dos identificados, sendo este um importante processo na precipitação e remediação de áreas contaminadas com arsênio.

4.4 REFERENCIAS

ABDEL-MONEM, M. O.; AL-ZUBEIRY, A. H.; AL-GHEETHI, A. A. Biosorption of nickel by *Pseudomonas cepacia* 120S and *Bacillus subtilis* 117S. *Water Sci Technol*, v. 61, n. 12, p. 2994-3007, 2010. ISSN 0273-1223. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555195>.

ASAULENKO, L.; PURISHCH, L.; KOZLOVA, I. Stages of biofilm formation by sulfate-reducing bacteria. *Mikrobiol Z*, v. 66, n. 3, p. 72-9, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1028-0987. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15456221.

ASAULENKO, L. H.; ABDULINA, D. R.; PURISH, L. M. Taxonomic position of certain representatives of sulphate-reducing corrosive microbial community. *Mikrobiol Z*, v. 72, n. 4, p. 3-10, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1028-0987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20812503>.

AZCÓN, R. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. *Microb Ecol*, v. 59, n. 4, p. 668-77, May 2010. ISSN 1432-184X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013261>.

BALE, M. J.; MATSEN, J. M. Time-motion and cost comparison study of micro-ID, API 20E, and conventional biochemical testing in identification of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, v. 14, n. 6, p. 665-70, Dec 1981. ISSN 0095-1137. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801085>.

BARTHOLOMEW, J. W.; MITTWER, T. A simplified bacterial spore stain. *Stain Technol*, v. 25, n. 3, p. 153-6, Jul 1950. ISSN 0038-9153. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15431137>.

BRUNO, W. J.; SOCCI, N. D.; HALPERN, A. L. Weighted neighbor joining: a likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction. *Mol Biol Evol*, v. 17, n. 1, p. 189-97, Jan 2000. ISSN 0737-4038. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666718>.

CHAMKHA, M. et al. Isolation from a shea cake digester of a tannin-tolerant *Escherichia coli* strain decarboxylating p-hydroxybenzoic and vanillic acids. *Curr Microbiol*, v. 44, n. 5, p. 341-9, May 2002. ISSN 0343-8651. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927985>.

CHIEW, H. et al. Effect of groundwater iron and phosphate on the efficacy of arsenic removal by iron-amended BioSand filters. *Environ Sci Technol*, v. 43, n. 16, p. 6295-300, Aug 2009. ISSN 0013-936X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19746728>.

CIRIC, L. et al. Field scale molecular analysis for the monitoring of bacterial community

structures during on-site diesel bioremediation. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 14, p. 5235-41, Jul 2010. ISSN 1873-2976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303748>.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, v. 37, n. Database issue, p. D141-5, Jan 2009. ISSN 1362-4962. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004872>.

CONAMA. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.: DOU Diario Oficial da União 2005.

HOLT, J. G. *Bergey's of Manual Determinative Bacteriology*. 9a. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1994.

ICGEN, B.; HARRISON, S. Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate. *Res Microbiol*, v. 157, n. 10, p. 922-7, Dec 2006. ISSN 0923-2508. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008063>.

JONG, T.; PARRY, D. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, p. 3379-3389, AUG 2003. ISSN 0043-1354.

KIM, H. C. et al. Arsenic removal from water using iron-impregnated granular activated carbon in the presence of bacteria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, v. 45, n. 2, p. 177-82, 2010. ISSN 1532-4117. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390857>.

KOLMERT, A.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K. B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J Microbiol Methods*, v. 41, n. 3, p. 179-84, Aug 2000. ISSN 0167-7012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958962>.

LAGIER, R.; BAUD, C. A. Magnesium whitlockite, a calcium phosphate crystal of special interest in pathology. *Pathol Res Pract*, v. 199, n. 5, p. 329-35, 2003. ISSN 0344-0338. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908523>.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: (Ed.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.). New York: Wiley, John and Sons Chichester, 1991. p.115-175.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol Adv*, v. 25, n. 5, p. 452-63, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 0734-9750. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572039>.

MARTINS, M. et al. Mechanism of uranium (VI) removal by two anaerobic bacterial communities. *J Hazard Mater*, v. 184, n. 1-3, p. 89-96, Dec 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832165>.

MIOT, J. et al. Speciation of arsenic in *Euglena gracilis* cells exposed to As (V). Environ Sci Technol, v. 43, n. 9, p. 3315-21, May 2009. ISSN 0013-936X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534152>.

MOORE, E. et al. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In: (Ed.). Molecular Microbial Ecology Manual. 2^a. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar 1993. ISSN 0099-2240. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683183>.

NÉMETI, B. et al. Polynucleotide phosphorylase and mitochondrial ATP synthase mediate reduction of arsenate to the more toxic arsenite by forming arsenylated analogues of ADP and ATP. Toxicol Sci, v. 117, n. 2, p. 270-81, Oct 2010. ISSN 1096-0929. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457661>.

PAOLONI, J. D. et al. Arsenic in water resources of the southern pampa plains, Argentina. J Environ Public Health, v. 2009, p. 216470, 2009. ISSN 1687-9813. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19936127>.

PARK, J. et al. Recovery of Pd(II) from hydrochloric solution using polyallylamine hydrochloride-modified *Escherichia coli* biomass. J Hazard Mater, v. 181, n. 1-3, p. 794-800, Sep 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554390>.

PATRÍCIO, I. C. et al. Biochemical and molecular characterization of sulfate reducing enterobacteraceae strains isolated from the Conceição River, Caraça Valley, in Minas Gerais, Brazil. Journal of Basic Microbiology, 2011.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 32, p. 97-100, 1972.

QIU, R. et al. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. J Hazard Mater, v. 164, n. 2-3, p. 1310-5, May 2009. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977087>.

SAFFAR, B.; YAKHCHALI, B.; ARBABI, M. Development of a bacterial surface display of hexahistidine peptide using CS3 pili for bioaccumulation of heavy metals. Curr Microbiol, v. 55, n. 4, p. 273-7, Oct 2007. ISSN 0343-8651.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry, v. 17, n. 5, p. 517-568, 2002. ISSN 0883-2927. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VDG-451NHVT->

[1/2/6d9041b1155f159d082715c84b79a57f](http://dx.doi.org/10.1021/es061802i).

STOLZ, J. F. et al. Biotransformation of 3-Nitro-4-hydroxybenzene Arsonic Acid (Roxarsone) and Release of Inorganic Arsenic by *Clostridium* Species. Environmental Science & Technology, v. 41, n. 3, p. 818-823, 2007. ISSN 0013-936X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/es061802i>.

TAWFIK, D. S.; VIOLA, R. E. Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity. Biochemistry, v. 50, n. 7, p. 1128-34, Feb 2011. ISSN 1520-4995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214261>.

VELÁSQUEZ, L.; DUSSAN, J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. J Hazard Mater, v. 167, n. 1-3, p. 713-6, Aug 2009. ISSN 1873-3336. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201532>.

VOLESKY, B. Biosorption and me. Water Res, v. 41, n. 18, p. 4017-29, Oct 2007. ISSN 0043-1354. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632204>.

WIERINGA, E. B.; OVERMANN, J.; CYPIONKA, H. Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. Environ Microbiol, v. 2, n. 4, p. 417-27, Aug 2000. ISSN 1462-2912. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234930>.

WILOPO, W.; SASAKI, K.; HIRAJIMA, T. Identification of Sulfate- and Arsenate-Reducing Bacteria in Sheep Manure as Permeable Reactive Materials after Arsenic Immobilization in Groundwater. Materials Transactions, p. 2275-2282, OCT 2008. ISSN 1345-9678.

WOLFE-SIMON, F. et al. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. Science, Dec 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127214>.

YAMAMURA, S.; IKE, M.; FUJITA, M. Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp strain SF-1. Journal of Bioscience and Bioengineering, p. 454-460, NOV 2003. ISSN 1389-1723.

YU, S. H. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Environ Int, v. 31, n. 2, p. 149-54, Feb 2005. ISSN 0160-4120. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661275>

ZHANG, X. et al. Phylogenetic analysis and arsenate reduction effect of the arsenic-reducing bacteria enriched from contaminated soils at an abandoned smelter site. Journal of Environmental Sciences-China, p. 1501-1507, 2008. ISSN 1001-0742.

CAPÍTULO V- CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusões

Neste trabalho foi investigada a hipótese de aplicação biotecnológica de consórcios bacterianos na remoção de metais, com foco no arsênio, de efluentes. O meio Postgate B, utilizado para o enriquecimento e manutenção dos cultivos, foi eficiente ao selecionar bactérias com ótima tolerância ao arsênio, sendo que o consórcio I apresentou nível de tolerância cerca de 64 vezes maior que o valor limite máximo permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA ($0,5 \text{ mgAs.L}^{-1}$).

Não foi possível a identificação das bactérias presentes nos consórcios através do sequenciamento a partir do DNA presente nas bandas obtidas pelos experimentos de PCR/DGGE. Foram realizados vários experimentos e após reamplificar o DNA presente nas bandas e aplicá-las em um novo experimento de DGGE, as mesmas eram perdidas. Este problema indica a necessidade de padronização da técnica de análise de DGGE para o tipo de amostra estudada. Não foi possível identificar com precisão o motivo levou à inibição da amplificação das bandas, mas foi possível observar, em todos os géis estudados, que nas amostras contendo As, as bandas eram mais evidentes. Apesar dos problemas, esta técnica é muito útil na área de ecologia microbiana molecular e mostrou-se muito eficiente para o estudo da dinâmica e estrutura das populações dos consórcios estudados.

A caracterização morfológica e bioquímica dos isolados obtidos a partir do Consórcio I evidenciou a diversificação dos mesmos e indicou sua capacidade de adaptação às condições adversas do cultivo. Tais micro-organismos foram capazes de utilizar vários compostos orgânicos como substratos e apresentaram resistência variável à oxigenação do meio, características que podem ser úteis em processos de biorremediação. Além disso, a partir da caracterização morfológica e metabólica foi possível a identificação dos mesmos. Aliado a isso, as análises de biologia molecular confirmaram a identificação por métodos de microbiologia clássica, sendo uma metodologia mais segura. Foram identificados os seguintes organismos: *Escherichia coli*, *Clostridium* sp e *Bacillus* sp..

O consórcio I apresentou altas percentuais de remoção de sulfato, sendo capaz de remover cerca de 93% do sulfato contido no meio e foi ainda capaz de elevar o pH do meio de 5,4 à neutralidade. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura e apontam para a utilização deste consórcio no tratamento de efluentes ácidos contendo sulfato e metais, visto que o As e outros elementos podem ser imobilizados no ambiente e em processos de tratamento na forma de seus respectivos sulfetos gerados em consequência da reação com o H₂S produzido após redução do sulfato.

A análise do precipitado formado pelo Consórcio I indica a presença do mineral whitlockita (*Whitlockite*) (Ca,Mg)₃(PO₄)₂ sugerindo à hipótese de formação bacteriana deste composto (biomineralização) que pode estar relacionada a mecanismos de substituição do fósforo pelo arsênio na célula ou como forma de armazenamento para a regulação de elementos essenciais pelas bactérias. São necessários, no entanto, mais estudos de caracterização química dos precipitados formados para que seja confirmada esta hipótese.

5.2 Sugestões de trabalhos futuros

- Realizar análises químicas dos precipitados formados pelas bactérias cultivadas em presença de arsênio;
- Determinar e avaliar as cinéticas de bioissorção para os consórcios estudados;
- Estudar a acumulação de arsênio na biomassa bacteriana do consórcio I, bem como sua recuperação e seu fator de concentração em solução dessorvente;
- Avaliar o comportamento da biomassa bacteriana do consórcio I e os mecanismos de interação metal-biomassa: identificação, por diversas técnicas, principalmente, espectroscópicas e microscópicas. Identificar sítios ligantes da biomassa que estão envolvidos na bioissorção de arsênio e as formas pelas quais a realizam.
- Estudar o papel de grupos fosfatos na retenção de metais.

CAPÍTULO VI- ANEXOS

ANEXO 1- Protocolos de Biologia Molecular

Tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampão Fosfato Salino

- 1- Centrifugar a amostra em tubos falcon de 15 ml por 15 min a 15000 rpm;
- 2- Descartar o líquido resultante da centrifugação;
- 3- Adicionar aproximadamente 14 ml de Tampão PBS 1X em cada tubo, completando o volume do mesmo;
- 4- Homogeneizar as amostras em vortex;
- 5- Centrifugar por 15 min a 15000 rpm;
- 6- Descartar o líquido resultante;
- 7- Coletar a amostra e preservar a seco em papel alumínio a -20 °C;

Protocolo de Extração de DNA Fenol/Clorofórmio/Beads

Esse protocolo é baseado em metodologia segundo Griffiths, et al. 2000.

São necessários:

0,5 g de amostra;

0,5g de pérolas de vidro;

10µl de solução de SDS (dodecilsulfato de sódio);

0,3 ml de solução de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico na respectiva proporção (24:24:1);

0,3 ml de solução Tampão PBS 1X + PVPP.

O procedimento de extração consiste nas seguintes etapas:

- 1- Promover 2 agitações de 30 segundos no vórtex, com amostras imersas no gelo no intervalo entre agitações.

- 2- Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a 15 °C .
- 3- Transferir sobrenadante para novo tubo; armazenar.
- 4- Adicionar igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturar bem (agitar manualmente).
- 5- Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a 15 °C .
- 6- Transferir sobrenadante para novo tubo.
- 7- Precipitar o sobrenadante nas seguintes soluções com proporção de acordo com o volume do sobrenadante: 0,1V de Acetato de sódio e 2V de etanol 100%.
- 8- Incubar as amostras por 1 hora no congelador.
- 9- Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm a 15 °C .
- 10- Descartar sobrenadante e lavar em 200µl etanol 70%.
- 11- Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm a 15 °C .
- 12- Descartar sobrenadante e secar o pellet.
- 13- Ressuspender em 50µl de Tampão Tris 10mM.

Protocolo de Extração de DNA do KIT Power Soil (MoBio)

- 1- Adicionar 0,5 g de amostra no tubo contendo Beads (Bead Solution).
- 2- Agitar no vórtex (“gentilmente”).
- 3- Adicionar 60µl da solução 1 (S1) e agitar no vórtex gentilmente.
- 4- Adicionar 200µl de solução IRS.
- 5- Colocar o tubo horizontalmente no vórtex preso com fita adesiva e agitar no máximo por 10 minutos.
- 6- Centrifugar a 10000g por 30 segundos.
- 7- Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
- 8- Adicionar 500µl de solução 2 (S2) e agitar por 5 minutos no vórtex.
- 9- Incubar em geladeira a 4 graus por 5 minutos.
- 10- Centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
- 11- Transferir sobrenadante para novo tubo.
- 12- Adicionar 1,3ml da solução 3 (S3) e agitar no vórtex por 5 segundos.
- 13- Adicionar 700µl no spin filter e centrifugar a 10000g por 1 minuto.
- 14- Descartar o filtrado e adicionar o restante. Repetir este passo 3 vezes.
- 15- Adicionar 300µl da solução 4 (S4) e centrifugar a 10000g por 30 segundos.

- 16- Descartar o filtrado e centrifugar novamente a 10000g por 1 minuto.
- 17- Transferir a coluna para novo tubo.
- 18- Adicionar 50µl da solução 5 (S5) no filtro e centrifugar por 30 segundos.
- 19- Descartar o filtro.

Extração de DNA de culturas puras por Lise Térmica

Esse protocolo foi utilizado para obtenção do DNA genômico a partir de colônias isoladas e consiste basicamente em promover a transferência de quatro a cinco colônias para microtubos de 2mL contendo 100µL de água ultra pura. Agitar o tubo em agitador para ressuspender as células e então manter a suspensão de colônias em banho-maria a 97°C, por dez minutos. Em seguida, centrifugar por 10 minutos, a 15.000g (12000 rpm). Transferir o sobrenadante com DNA genômico para um novo microtubo.

Preparo das Soluções

1.5.1 Tampão PBS 1X

130 mM NaCl (7,6 g.L⁻¹);

10 mM Na₂HPO₄.12H₂O (3,58 g.L⁻¹);

3 mM NaH₂PO₄.H₂O (0,46 g.L⁻¹);

Dissolver os reagentes em água milli Q. Após ajustar o pH para 7,2 com NaOH ou HCl, esterilizar em autoclave a 120°C por 20 minutos. Estocar em geladeira a 4 °C.

1.5.2 TAE 50X– Tampão de corrida eletroforética

Adicionar 121 g de Tris Base; 28,55 mL de Ácido Acético Glacial; 50 mL de EDTA 0,5 M e completar o volume para 500 mL com água milli Q. Acertar o pH para 7,5. Para o preparo do TAE 0,5X, basta diluir o TAE 50X em água milli Q.

1.5.3 Soluções para o DGGE

Solução de Acrilamida-Bisacrilamida 30%

Pesar 58 g de acrilamida e 2 g de bisacrilamida e transferir a um béquer. Adicionar água milli Q sob agitação a 37°C até a completa dissolução dos reagentes. Acertar o volume para 200 mL com água milli Q.

Solução 0% Desnaturante

Em um béquer, colocar 1 mL de TAE 50X, pH 7,4 e 40 mL de solução acrilamida-bisacrilamida 30%. Completar o volume para 200 mL com água milli Q.

Solução 80% Desnaturante

Em um béquer, colocar 1 mL de TAE 50X, pH 7,4; 40 mL de solução acrilamida-bisacrilamida 30%. Adicionar 67,6 g de uréia e 64 mL de formamida. Completar o volume para 200 mL com água milli Q. Manter sob agitação até completa dissolução.

Preparo de Gradiente 30% – 70%

Para gradiente 30% - 7,5 mL de solução 0%, 4,5 mL de solução 80%, 80 µL de APS (persulfato de amônio) e 5 µL de TEMED.

Para gradiente 70% - 1,5 mL de solução 0%, 10,5 mL de solução 80%, 80 µL de APS (persulfato de amônio) e 5 µL de TEMED.

Stacking Gel – 5 mL de solução 0%, 50 µL de APS e 5 µL de TEMED.

ANEXO 2- Meios utilizados na Identificação Bioquímica

2.1 Fermentação de glicose e lactose

Algumas bactérias são capazes de hidrolisar os carboidratos (dissacarídeos até glicose) e metabolizar a glicose até ácidos (com ou sem liberação de gás) e/ou álcoois. O carboidrato é fermentado e pode ser transformado nos seguintes compostos: glicose e esta a ácido pirúvico > ácidos > álcoois e gases. O meio de cultura utilizado contém: água peptonada e o carboidrato a ser utilizado. Neste caso foi utilizado glicose e lactose. Nos tubos com meio são adicionados um tubo de Durham. A fermentação indica se houve produção de ácidos (viragem da cor do meio de vermelho para amarelo) com ou sem produção de gás (formação de bolha no interior do tubo de Durham).

2.2 Água peptonada (carboidratos)

Peptona -----	10 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Fosfato dipotássico -----	0,30 g
Vermelho de fenol -----	0,0018 g
Glicose ou Lactose -----	5 g
Água destilada -----	1000 ml

Para o preparo de 1L de meio, os reagentes foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada. Aqueceu se a solução até o ponto de ebulição e após o resfriamento ajustou-se o pH em 8,4 a 8,5. A solução foi distribuída em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

2.3 Meio SIM

A decomposição de proteínas (liberação de aminoácidos) produz substâncias pútridas que exalam mal cheiro como: H₂S, Indol e escatol, etc. O meio de cultura utilizado é denominado Meio SIM (S=sulfeto; I=indol; M=motilidade) e sua composição: peptona (proteína que serve como fonte de triptofano e cistina), sal de metal pesado (sal de ferro ou chumbo), água e ágar.

A produção de H₂S é devida a degradação da cistina, aminoácido que contém enxofre. O H₂S liberado no meio de cultura liga-se ao sal de ferro ou chumbo, dando como resultado um precipitado de cor negra. O resultado negativo não há produção de coloração no meio.

A degradação do triptofano ocorre pela Triptofano triptofanase a ác. pirúvico utilizado pelo metabolismo da bactéria e indol. Para a prova de Indol é adicionado após incubação, de 3 a 5 gotas do reativo de Kovacs (solução de paradimetilaminobenzaldeído). Se houver liberação de indol, formar-se-á um anel vermelho (composto denominado rosindol). Resultado: - Indol positivo: anel vermelho, Indol negativo: não utilização do triptofano. Presença de anel amarelo (cor do reativo de Kovacs).

A motilidade é observada pelo crescimento difuso até o final do tubo de meio.

Meio Ágar SIM

Peptona de caseína -----	20 g
Peptona de carne -----	6,1 g
Sulfato de ferro e amônio -----	0,2 g
Tiosulfato de sódio -----	0,2 g
Ágar -----	3,5 g

Para o preparo de 1 L de meio, foram dissolvidas 30 gramas do meio "Agar SIM" em 1000 ml de água destilada. A solução foi aquecida até a completa dissolução dos reagentes. Ajustou-se o pH para 7,3. Após a esterilização em autoclave a 120° por 20 minutos, o meio foi distribuído em tubos de ensaio de 13 x 100 mm.

2.4 Citrato de Simmons

O meio citrato indica a utilização de citrato como única fonte de carbono pelos s. Estes possuem citrato permease e enzima citratase. Fazem-se estrias sobre a superfície do Agar com um inóculo escasso. A produção de uma cor azul no meio, após 24 horas de incubação

a 37°C, indica a presença de produtos alcalinos e indica a reação como positiva. A reação negativa é evidenciada pela continuidade da coloração verde do meio.

A seguir, segue a composição e preparação do meio Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar) – DIFCO segundo fabricante.

Composição: Formulação (g.L⁻¹) - pH final: 6,8

Sulfato de magnésio.....	0,20
Fosfato de amônio monobásico.....	1,00
Fosfato dipotássico.....	1,00
Citrato de sódio.....	2,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Agar.....	15,00
Azul de bromotimol	0,08

Para preparar o meio, foi diluído 22g de meio Agar citrato em 1000 ml de água destilada e levados a fervura para dissolução completa, em seguida o meio foi distribuído em tubos de vidro de 12 X 100 mm e esterilizado a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização os tubos são deixados em posição inclinada até completa solidificação.

2.5 Prova de degradação de Uréia

Esta prova consiste na hidrólise da uréia pelos s que possuem a enzima uréase. Nesta reação há liberação de amônia, o que torna o meio alcalino. A produção de uma coloração vermelho-rosada é devido a presença do indicador de pH vermelho de fenol. Nos casos em que não há reação o meio permanece amarelo.

Meio Ágar de uréia de Christensen

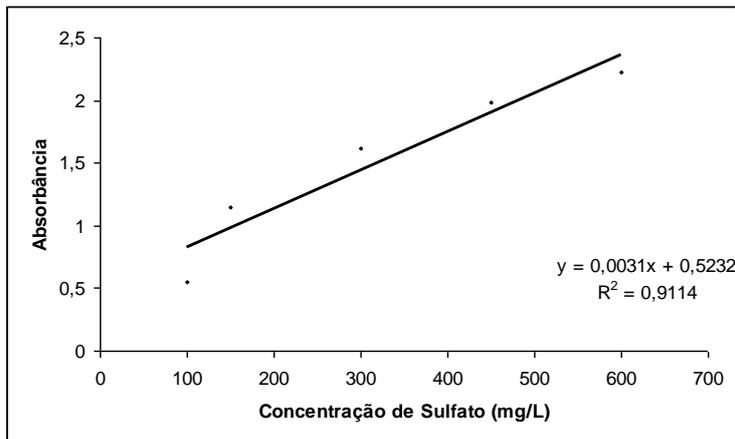
Meio Base

Peptona de carne -----	1,0 g
D (+) glicose -----	1,0 g
Cloreto de sódio -----	5,0 g
Potássio dihidronofosfato -----	2,0 g
Vermelho de fenol -----	0,012 g
Ágar -----	12 g
Aditivo	
Uréia -----	20 g

Para o preparo de 1 L de meio foram dissolvidas 21 gramas do meio "Agar Uréia de Christensen" desidratado em 1000 ml de água destilada. Para a completa dissolução é necessário hidratar por cerca de 10 minutos e aquecer agitando o meio até o ponto de ebulição. O pH da solução é ajustado a 6,8 e então esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após o resfriamento do meio base a 45°C, este foi incorporado a 50 ml de solução (esterilizada por filtração) de uréia a 40%. A solução foi distribuída em tubos de ensaio de 13 x 100mm. O meio foi resfriado até a solidificação em posição inclinada.

ANEXO 3- Experimento para dosagem de redução de sulfato

3.1 Curva padrão de sulfato



4.1 Solução condicionante (1 L de solução):

HCl concentrado (37%)----- 60 ml

Álcool etílico (95%)----- 200 mL

NaCl----- 150 g

Glicerol ----- 100 mL

Água destilada----- 540,5 mL

ANEXO 4- Publicações

4.1 Guedes, K. A., Silva, S. Q., Teixeira, M. C. Obtenção de isolados bacterianos com atividade sulfato-redutora provenientes do córrego do funil em Ouro Preto e de um reator

UASB de tratamento de esgoto. XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas - Pernambuco, 2009.

4.2 Guedes, K. A., Teixeira, M. C., Silva, S. Q., Matos, L. P., Análise por PCR/DGGE da dinâmica populacional de consórcios de bactérias redutoras de sulfato submetidos a diferentes concentrações de arsênio. III Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia (CDMICRO) e XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA), Manaus - AM, 2010.