



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO
EM RECURSOS HÍDRICOS (ProAGUA)**

**Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria
redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina**

**AUTORA: LETÍCIA RONI RAMPINELLI
ORIENTADOR: PROF. DR. VERSIANE ALBIS LEÃO
CO-ORIENTADORA: PROFa. DRa. RENATA GUERRA DE SÁ**

Ouro Preto, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO
EM RECURSOS HÍDRICOS (ProAGUA)

Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria
redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em
Recursos Hídricos da Universidade Federal de Ouro
Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Ouro Preto, 2007

R177i

Rampinelli, Letícia Roni.

Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina [manuscrito] / Letícia Roni Rampinelli. - 2007.

x, 69f.: il., color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão.

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

Área de concentração: Microbiologia. Biologia molecular.

1. Drenagem ácida - Teses. 2. Minas - Drenagem - Teses. 3. Sulfatos - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 622.5

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental
ICEB - Campus - Morro do Cruzeiro
Ouro Preto - MG - CEP 35.400-000
Fone: (031)3559-1725
E-mail: proagua@iceb.ufop.br

“Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de Mina”

Autor: Leticia Roni Rampinelli

Dissertação defendida e aprovada, em 24 de agosto de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores

Professor Dr. Versiane Albis Leão - Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Pesquisadora Dr^a. Silvana de Queiroz Silva
Universidade Federal de Minas Gerais

Professora Dr^a. Renata Guerra de Sá
Universidade Federal de Ouro Preto

Professor Dr. Luiz Henrique Rosa
Universidade Federal de Ouro Preto

*"Os pequenos atos que se executam são melhores que todos
aqueles grandes que se planejam."
George C. Marshall*

*Aos Meus pais, Luiz e Maria José,
pelo ensino da determinação e pela dedicação
incondicional a minha formação humana.*

*A minha irmã Monique,
por está sempre ao meu lado me incentivando.*

*À Tom,
por seu amor e companheirismo,
o que tornou esta caminhada mais fácil.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Versiane Albis Leão, pela orientação e pelo apoio constante durante a realização desta dissertação, possibilitando a concretização deste trabalho.

À Prof. Dra. Renata Guerra de Sá, pela co-orientação e principalmente pela acolhida em seu laboratório, o que foi essencial para a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Mônica Teixeira, pela disposição demonstrada que contribuiu para finalização deste trabalho.

À Roberta D'Ângelo de Azevedo, pela grande amizade e por nunca ter negado ajuda toda vez foi necessário.

À Adarlêne Moreira Silva, pela grande amizade, por sempre está ao meu lado, me ajudando e me apoiando em todos os momentos.

Ao Sérgio Chaves dos Santos, pelo convívio e pela a realização das análises na cromatografia que foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos colegas do NVMM: Flávio, Valdilene, Elaine, Júlio César, Daniel, Karine, Fernando Armani, Carlúcio, Claudiney, Jean Carlo, Pablo, Silva e Márcio. Obrigada pelo apoio.

Aos colegas do LBBM: Nilza, Matheus, Roenick, Cássio, Maísa, Robertinha, Helaine, Nayara, Naiara, Natália, Leonardo, Leandro, Roberta, Tiago e Eneida, pelo carinho e atenção em todos os momentos que solicitei ajuda.

Ao Laboratório de Microbiologia da Escola de Farmácia, pela disponibilização do espaço para a realização das análises microbiológicas;

À Halyne Angélica Madazio, Paola Ferreira Barbosa e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do DEGEO/EM – UFOP, pelas análises das amostras no MEV.

Ao Centro de Investigação e Desenvolvimento em Fermentação Industrial (CINDEFI) CONICET-UNLP da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata, por gentilmente fornecerem as amostras de *D. vulgaris* utilizados neste trabalho.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Drenagem ácida de mina	2
1.2 Bactérias redutoras de sulfato	5
1.2.1 Considerações taxonômicas.....	5
1.2.2. Considerações fisiológicas	11
2. Objetivos	15
3. Relevância	17
4. Materiais e Métodos	19
4.1 Amostras	20
4.2 Enriquecimento e seleção de BRS	20
4.3 Isolamento de culturas puras.....	21
4.4 Crescimento em pH ácido.....	21
4.5 Características morfológicas.....	22
4.6 Curva de crescimento bacteriano e redução de sulfato.....	22
4.7 Caracterização molecular.....	23
4.7.1 Extração do DNA genômico	23
4.7.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo	24
4.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
4.7.4 Purificação do produto de PCR	26
4.7.5 Purificação de fragmento de dna utilizando o método freeze squeeze.....	26
4.7.6 Clonagem e sequenciamento	27
4.7.6.1 Reação de ligação.....	27
4.7.6.2 Preparação de células <i>Echerichia coli</i> DH5a competentes.....	28
4.7.6.3 Transformação bacteriana.....	28
4.7.7 PCR de colônias	29
4.7.8 Minipreparação de dna plasmidial.....	29
4.7.9 Reação de sequenciamento.....	30
4.7.10 Análise das seqüências	30
4.7.11 Extração do rna total.....	31
4.7.12 RT-PCR (Reverse- Transcription Polimerase Chain Reaction)	32
5. Resultados	34
5.1 Enriquecimento e isolamento de BRS	35
5.2 Características morfológicas do isolado C.1.....	36
5.3 Curva de crescimento e redução de sulfato.....	37
5.4 Caracterização molecular da cultura C.1	40
5.4.1 Extração do DNA	40
5.4.2 Produtos de PCR	40
5.4.3 PCR de colônias	41
5.4.4 Análise das seqüências dos clones	42
5.4.5 Análise computacional das seqüências.....	42
5.4.6 Extração do RNA	46
5.4.7 RT-PCR (Reverse- Transcription Polimerase Chain Reaction)	47
6. Discussões	48
7. Conclusões	56
8. Perspectivas	58
9. Referências bibliográficas	60
10. Apêndice	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de gêneros de BRS descritos e sua classificação com relação à oxidação da matéria orgânica. Taxonomia baseada no polimorfismo do RNAr 16S adaptado de Castro et al., 2001.....	6
Tabela 2- Filogenia dos procariontes redutores de sulfato. Classificação baseada no polimorfismo do 16S RNAr, segundo Kaksonen (2004).....	8
Tabela 3- Composição do meio de cultura de Postgate C modificado por Cheung e Gu (2003).	20
Tabela 4- Amostras utilizadas na análise de caracterização molecular.....	23
Tabela 5- Oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR.....	25
Tabela 6- Reagentes utilizados na reação de PCR.....	25
Tabela 7- Análise da identidade das seqüências de <i>dsrB</i> com seus ortólogos.	43
Tabela 8- Análise das seqüências de aminoácido preditos do gene <i>dsrB</i> utilizando o programa BLASTp.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** (A) Mapa esquemático mostrando a organização genética do operon *dsr*. As seguintes abreviaturas representam as janelas abertas de leitura-ORF (*Open Reading Frame*): *dsrA* e *dsrB*, subunidades alfa e beta, respectivamente, da redutase sulfito dissimilatória; *DsrD*, redutase sulfito dissimilatória D; a qual tem um possível papel na regulação da transcrição do gene *dsr*; *dsrN*, putative siroheme amidase; *dapA*, dihidrodipicolinato sintase; OFR, janela aberta de leitura não identificada. (B) Organização genética de todos os operons de BRS já descritos. Janela aberta de leitura (ORF): *dsrC*, subunidade gama da redutase sulfito dissimilatória; *fdx*, ferredoxina. Número de acesso: *Desulfovibrio vulgaris*, AE017285; *Desulfohalobacter vibrioformis*, AJ250472; *D. toluolica*, AJ457136; *D. psychrophila*, NC_006138; *Desulfohalobacter rhabdoformis*, AJ250473; *Thermodesulfohalobacter norvegica*, AJ277293; *Desulfotomaculum thermocisternum*, AF074396; *A. fulgidus*, NC_000917 e *Achaeeoglobus profundus*, AF071499. 10
- Figura 2-** Rota metabólica da redução de sulfato em bactérias redutoras de sulfato (adaptado de Madigan *et al*, 1997). LDH – Lactato desidrogenase; cyt C₃ – citocromo C₃; H₂ase – hidrogenase; Hmc – complexo de citocromo. 13
- Figura 3-** Estrutura molecular do ATP, APS e PAPS. Vias metabólicas de redução de sulfato: assimilativa e dissimilativa. Observando as duas vias metabólicas de redução de sulfato, verifica-se que o sulfato não necessita de ativação para ser metabolizado pelas BRS. O sulfato pode ser substituído pelo tiosulfato (Kaksonen, 2004; Madigan *et al.*, 2003). 14
- Figura 4-** Vetor plasmidial pGem T-easy. Ilustração do vetor pGEM-T easy mostrando os pontos referentes as seqüências do vetor plasmidial de sequenciamento. 27
- Figura 5-** Cromatograma obtido após a leitura em gel de sequenciamento automático. 30
- Figura 6-** Tubos de ensaio com meio Postgate C. (1) Meio de cultura sem inóculo e (2) Meio com inóculo. A mudança da coloração do meio de cultura indica a precipitação do metal Fe na forma de FeS após 7 dias de incubação à 37°C. O FeS é um indicativo da presença de BRS no meio de cultura. 35
- Figura 7-** Microscopia eletrônica de varredura das células bacterianas da cultura pura C1. Uma alíquota de 100 µL do inóculo da cultura isolada (C.1) foi fixada em lâminas e em seguidas metalizadas com carbono. 36
- Figura 8-** Curva de crescimento e redução de sulfato da cultura isolada C.1 (A) pH 5,5 (B) pH7,0. Meio Postgate C modificado sem FeSO₄⁻²; inóculo 1% (v/v); temperatura 37°C, D.O. a 600nm 38
- Figura 9-** Curva de crescimento e redução de sulfato da cultura enriquecida C (A) pH 5,5 (B) pH7,0. Meio Postgate C modificado sem FeSO₄⁻²; inóculo 1% (v/v); temperatura 37°C, D.O. a 600nm. 39
- Figura 10-** Análise da integridade do DNA genômico. 1- Cultura referência: *Desulfovibrio vulgaris*; 2- Cultura mista pH 4,5; 3 – Cultura mista pH 5,5 e 4- Cultura isolada. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo. 40

Figura 11- Produto de PCR do primer *dsr* (sulfito redutase). PM- padrão de peso molecular 100pb; 1- *Desulfovibrio vulgaris*; 2- C.a (cultura mista pH 4,5); 3- C.b (cultura mista pH 5.5) e 4 - C.1 (cultura isolada). A seta indica a banda de interesse de 350 pb. 40

Figura 12- Produto de PCR do primer *hyd* (Hidrogenase). PM- padrão de peso molecular; 1- *Desulfovibrio vulgaris*; 2- C.a (cultura mista pH 4,5); 3- C.b (cultura mista pH 5.5) e 4 - C.1 (cultura isolada)..... 41

Figura 13- Gel de agarose 1,2% ilustrando a análise da presença de fragmento de interesse por PCR de célula. PM – Padrão de peso molecular 100pb. 1-3 Clones provenientes da transformação bacteriana com amostra da cultura de BRS isolada..... 41

Figura 14- Análise da minipreparação dos clones em gel de agarose a 0,8%. Cerca de 3 µL da minipreparação foram analisados em gel de agarose a 0,8% e corado com brometo de etídeo.. 42

Figura 15- Representação esquemática da localização dos domínios conservados. A- representa os domínios para os genes *dsrA*- Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridina), sub-unidade alpha e beta..... 43

Figura 16 - Alinhamento da região predita de aminoácidos do *dsrB* obtido da cultura C.1 com seus ortólogos. Os alinhamentos representam somente as regiões do domínio conservado da proteína DSR. O número de acesso dos ortólogos são *Desulfovibrio burkinensis* [|AB061536.1|](#), *Desulfovibrio aerotolerans* [|AY749039.1|](#), *Desulfovibrio fructosovorans* [|AB061538.1|](#), *Desulfovibrio alkalitolerans* [|AY864856.1|](#), *Desulfosarcina* sp. [AF360646](#), *Desulfovibrio africanus* [|AF271772.1|](#), *Desulfovibrio longus* [AB061540.1|](#), *Desulfovibrio aespoensis* [|AF492838.1|](#), *Desulfovibrio aminophilus* [|AY626029.1|](#), *Desulfovibrio gabonensis* [|AY626027.1|](#), *Desulfovibrio gigas* [|DGU80961|](#), *Desulfovibrio simplex* [|AB061541.1|](#), *Desulfovibrio desulfuricans* [|DDE249777|](#), *Desulfomonas pigra* [|AB061534.1|](#), *Desulfovibrio termitidis* [|AB061542.1|](#), *Desulfonatronum lacustre* [|AF418189|](#), *Desulfoarculu baarsii* [|AF334600|](#), *Desulfofustis glycolicus* [|AF482457.1|](#), *Desulfacinum infernum* [|AF482454.1|](#), *Thermodesulfobacterium thermophilum* [|AF334598.1|](#), *Thermodesulfobacterium commune* [|AF334596.1|](#) e *Thermodesulforhabdus norvegicus* [|AJ277293.1|](#).....45

Figura 17- Árvore filogenética baseada na seqüência de nucleotídeos do fragmento gênico *dsrB* (376 pb) do isolado C.1. A barra indica que para 100 nucleotídeo 2 são substituídos. O número de acesso dos ortólogos são *Desulfovibrio burkinensis* [|AB061536.1|](#), *Desulfovibrio aerotolerans* [|AY749039.1|](#), *Desulfovibrio fructosovorans* [|AB061538.1|](#), *Desulfovibrio alkalitolerans* [|AY864856.1|](#), *Desulfosarcina* sp. [AF360646](#), *Desulfovibrio africanus* [|AF271772.1|](#), *Desulfovibrio longus* [|AB061540.1|](#), *Desulfovibrio aespoensis* [|AF492838.1|](#), *Desulfovibrio aminophilus* [|AY626029.1|](#), *Desulfovibrio gabonensis* [|AY626027.1|](#), *Desulfovibrio gigas* [|DGU80961|](#), *Desulfovibrio simplex* [|AB061541.1|](#), *Desulfovibrio desulfuricans* [|DDE249777|](#), *Desulfomonas pigra* [|AB061534.1|](#), *Desulfovibrio termitidis* [|AB061542.1|](#), *Desulfonatronum lacustre* [|AF418189|](#), *Desulfoarculu baarsii* [|AF334600|](#), *Desulfofustis glycolicus* [|AF482457.1|](#), *Desulfacinum infernum* [|AF482454.1|](#), *Thermodesulfobacterium thermophilum* [|AF334598.1|](#), *Thermodesulfobacterium commune* [|AF334596.1|](#) e *Thermodesulforhabdus norvegicus* [|AJ277293.1|](#).....46

6

Figura 18- Extração de RNA total dos estágios de crescimento da cultura C.1 em pH 5,5 e 7,0. Gel de agarose/formaldeído 1% contendo em cada canaleta aproximadamente 5 µg de RNA total. (1) 30 hours de crescimento em pH 5,5; (2) 100 horas de crescimento pH 5,5; (3) 30 horas de crescimento em pH 7,0 e (4) 100 horas de crescimento em pH 7,0. 47

Figura 19- Expressão do gene *dsrB*. Cerca de 10µL do produto de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida (10%) e corado com nitrato de prata. (1) 30 horas de crescimento em pH 5,5; (2) 100 horas de crescimento pH 5,5; (3) 30 horas de crescimento em pH 7,0 e (4) 100 horas de crescimento em pH 7,0. (5) controle negativo..... 47

ABREVIATURAS

- cDNA** – DNA complementar
- CTAB** – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- DEPEC** - Dietilpirocarbonato
- dNTP** – Deoxinucleosídeo trifosfato (N = A, C, G, T)
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)
- IPTG** - isopropil-(3-d-thiogalactopiranoside)
- LB** – Lúria Bertani – Meio de cultura bacteriano
- mRNA** – Ácido ribonucleotídeo mensageiro
- MOPS** – [Ácido 3-(N-Morfolino) Propanosulfônico]
- pb** – pares de base
- PIPES** – Piperazine-N,N'-bis (ácido 2-ethanesulfonice)
- RNase** – Ribonuclease
- SDS** – Dodecilsulfato de sódio
- Taq** – *Termus aquaticus*
- Tris** – Tris-hidroximetilaminometano
- X-Gal** – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactopiranoside

LISTA DE AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	ABREVIÇÃO DE TRÊS LETRAS	ABREVIÇÃO DE UMA LETRA
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cyd	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Try	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

RESUMO

Drenagem ácida de mina (DAM) constitui um dos principais problemas ambientais, gerado pela atividade mineradora em todo mundo. A DAM é caracterizada pela alta acidez ($\text{pH} < 4,0$), elevadas concentrações de sulfato e metais dissolvidos, os quais são tóxicos para muitos organismos. Nos últimos anos, a utilização de bactérias redutoras de sulfato (BRS), vem mostrando ser uma alternativa promissora para o tratamento de DAM. O principal objetivo deste trabalho foi verificar se DAM poderia ser uma fonte para o isolamento de BRS. Inicialmente, utilizando um precipitado de DAM ($\text{pH} \sim 2$) e o meio Postgate C, foi possível obter uma cultura enriquecida e a partir desta, isolar uma cultura denominada C.1, capaz de crescer tanto em $\text{pH} 5,5$ como $7,0$ e consumir sulfato de forma expressiva nas mesmas condições. A seguir para identificar a qual gênero este isolado pertence, foi clonado e sequenciado os genes sulfito redutase e hidrogenase. Análises utilizando BLASTn e BLASTp, mostraram que a sequência obtida apresenta de 93-95% de identidade com espécies do gênero *Desulfovibrio*. Características morfológicas, fisiológicas e filogenéticas sugerem que o isolado C.1 constitui uma nova espécie de *Desulfovibrio*, com uma alta capacidade de reduzir sulfato em condições moderadamente ácidas. Além disso, estes resultados indicam que esta nova espécie de *Desulfovibrio* traz novas possibilidades para o remediação de DAM sem uma etapa prévia de neutralização.

ABSTRACT

Acid mine drainage (AMD) constitute a worldwide environmental problem. AMD waters are highly acidic (pH < 4). It also contains high concentrations of sulfate and soluble heavy metals which are very toxic to many living organisms. The use of sulfate-reducing bacteria (SRB) is a cost-effective route to treat AMD. The aim objective of this work was to verify the potential isolation SRB from AMD. Firstly, the sediments of AMD and Postgate C liquid medium was used to obtain the enrichment culture C and then use it to isolate one culture which labeled as C.1. This culture was able to grow in 5,5 and 7,0 pH and carried out one expressive reducing sulfate in this conditions. The cloning and sequencing of the genes of the enzymes sulfite reductase and hydrogenase obtained genomic DNA extracted from culture C.1. These sequence were used to the identification of the genus this culture. BLASTn and BLASTp analyses showed 93-95% identity with the species of *Desulfovibrio* genera. Morphologic, physiologic and phylogenetic analyses suggest that the C.1 strain is a new *Desulfovibrio* sp. with unexpected sulfate reducing capacity at moderately acidic pH. Also, these results shown new possibilities for the AMD treatment using this strain without a previous neutralization step.

1. Introdução

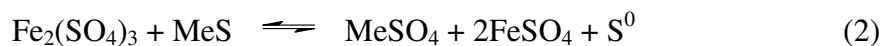
1.1 DRENAGEM ÁCIDA DE MINA

Drenagem ácida de rocha (DAR) pode ser definida como a drenagem resultante da oxidação natural de minerais sulfetados contidos em rochas expostas à ação do ar e da água e, quando esse fenômeno está relacionado à atividade mineradora, é comumente chamado de drenagem ácida de mina (DAM). A intensidade e a duração da DAM são funções complexas dos depósitos geológicos, mineralogia, hidrologia e do intemperismo a que os resíduos e a mina estão expostos. A DAM pode produzir efluentes ácidos carregados de metais pesados, muitas vezes excedendo os limites aceitos pela legislação ambiental. Por acarretar conseqüências irreversíveis uma vez iniciadas, a DAM é considerada um dos problemas ambientais mais preocupantes para as agências fiscalizadoras do meio ambiente e para as mineradoras (Lapakko *et al.*, 1999).

A toxicidade ambiental associada à DAM é muito mais relacionada às altas concentrações de metais dissolvidos, tais como Zn, Pb, Cu e As do que ao pH ácido do efluente gerado. Esses metais são liberados em solução por diversos mecanismos, incluindo oxidação direta de sulfetos metálicos (ZnS, PbS and CuS) pelo ar e pelo íon férrico (Fe^{3+}), e pelo aumento da solubilidade de minerais não-sulfetados em pH ácido (Yanful *et al.*, 1997). De acordo com Silver (1985), a pirita é oxidada na presença de bactérias segundo a equação geral (1):

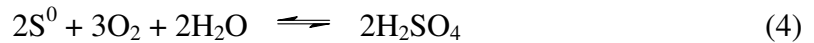


formando ácido sulfúrico e solubilizando sulfato férrico em pH inferior a 3,5. O íon férrico dissolvido oxida os sulfetos metálicos residuais presentes no rejeito ou no minério:



Onde Me representa um metal (Zn, Cu, Ni, Cd, entre outros).

Sulfatos metálicos, sulfato ferroso e enxofre elementar presentes no minério são solubilizados e podem ser reoxidados pelo ferro ou por bactérias oxidantes formando sulfato férrico e ácido sulfúrico, segundo as equações (3) e (4):



Com o aumento do pH, ocorre a hidrólise do sulfato férrico com a formação de precipitados secundários de ferro, como de jarosita, e a geração de acidez adicional:



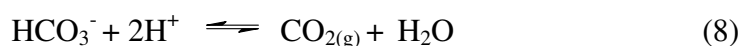
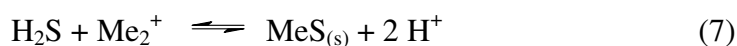
Depósitos minerais e pilhas de rejeito geradoras de ácido ocorrem freqüentemente em minas contendo sulfetos metálicos, além esses minerais associados a ouro e carvão. Como descrito nas equações 1 a 5, a DAM produz quantidades significativas de íon sulfato. Não é incomum encontrar-se DAM com pH 3,0 e níveis de sulfato na ordem de 10g/L. A DAM tem efeitos devastadores sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres, reduzindo sua biodiversidade. Existem tecnologias disponíveis para correção da acidez e precipitação dos metais. Entretanto, essas tecnologias não têm apresentado sucesso na redução dos níveis de sulfato que permanecem, então, como um desafio a ser enfrentado (Elliott *et al.*, 1998 e Kolmert e Johnson, 2001).

A remoção de sulfato pode ser obtida por precipitação com compostos de cálcio, chumbo, bário, alumínio, entre outros, denominados tratamentos ativos. Entretanto, estas opções apresentam sérios problemas. A utilização de chumbo e bário, dois metais pesados, para remover sulfato é claramente desaconselhada. A precipitação com cálcio forma gipsita ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), gesso, que é relativamente solúvel em água, deixando níveis em solução na faixa de 1,4-1,6g SO_4^{-2} /L, bem acima do máximo de 250mg/L permitido pela legislação. Além disso, esta é considerada uma solução a curto prazo, pois além da alta solubilidade do sulfato de cálcio, os metais coprecipitados podem ser ressolubilizados logo que o gesso entre em contato com água. O mais importante é que a geração de DAM pode durar milhares de anos fazendo com que os tratamentos ativos sejam considerados de alto custo para a sociedade (Luptakova e Kusnierova, 2005).

Em 1989, estimou-se que 19.300 km de rios e córregos e 72.000 ha de lagos e reservatórios, em todo mundo, estavam seriamente contaminados por DAM, porém a verdadeira escala da poluição ambiental ainda não foi medida com precisão. Atualmente, a legislação tem sido um fator determinante para que essa situação seja revertida (Johnson e Hallberg, 2005).

Recentemente, vários grupos independentes têm demonstrado que as bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem ser usadas como um processo de bioremediação de áreas poluídas por resíduos industriais, como por exemplo, a mineração e metalurgia de minério sulfetado, devido às suas características metabólicas e condições de crescimento (Kappler e Dahl, 2001; Frederiksen e Finster, 2003; Kaksonen *et al.*, 2003).

A bioremediação utilizando BRS é baseada na produção biológica de ácido sulfídrico (equação 6), na precipitação dos metais pela formação de sulfetos metálicos (MeS) (equação 7) e na neutralização da água decorrente do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (equação 8) (Webb e Lappin-Scott, 1998 e Kaksonen *et al.*, 2003).



Entretanto, o pH ótimo para crescimento da BRS é entre pH 6,0-8,0, ou seja, o crescimento desses microrganismo é desfavorecido em condições de acidez. Por isso, a literatura relata que, para a bioremediação de DAM por BRS é necessária então uma etapa de neutralização do efluente de forma a adequar o pH às condições de redução de sulfato (Tsukamoto, 2004). Contudo, têm sido isoladas BRS de regiões que apresentam pH 3,0, tanto em ambientes naturais quanto em bioreatores de escala piloto. Koschorreck *et al.* (2003) identificaram linhagens de BRS, em região vulcânica, capazes de crescer em pH menor que 3,0. Nestas condições, taxas de redução de 2,04 mmol $\text{SO}_4^{2-}/\text{m}^2/\text{dia}$ foram obtidas. Kolmert e Johnson (2001) desenvolveram um processo para redução de sulfato em um efluente de pH 3,0.

Com isso, a seleção de BRS capazes de crescer em pH ácido eliminaria a necessidade de neutralização prévia da acidez da DAM, facilitando o processo de

bioremediação. Esta perspectiva abre um campo de pesquisa para a utilização destas bactérias em processos biotecnológicos.

1.2 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

1.2.1 CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS

No ano de 1895, o cientista W. M. Beijerinck isolou a primeira BRS do sedimento do canal de Delft, localizado na Holanda, a qual foi denominada de *Spirillum desulfuricans* (Voordouw, 1995 e Melo e Azevedo, 1997). A primeira BRS identificada apresentava características morfológicas como motilidade e forma celular de vibrio, demonstrando que Beijerinck isolou e caracterizou a primeira espécie de *Desulfovibrio* (Voordouw, 1995).

A literatura registra vários trabalhos subsequentes à descoberta das BRS. John Postgate foi um cientista extremamente importante na história da pesquisa das BRS. Ele descobriu o citocromo C3, transportador de elétron indispensável no metabolismo das BRS (Voordouw, 1995). Peck e LeGall (1982) documentaram a ampla variedade de enzimas oxiredutoras, além de elucidarem seus papéis no metabolismo das BRS. Widdel e Pfennig (1981) aprofundaram o conhecimento das BRS Gram negativas por meio do isolamento e identificação de novos gêneros.

Com o desenvolvimento da análise filogenética utilizando a seqüência do gene do RNA ribossomal 16S (RNAr 16S), grandes avanços tem sido obtidos na taxonomia e filogenia das BRS. As BRS são um grupo de procariontes polifilético, distribuídos dentro dos domínios das *Bacteria* e das *Archaea* (Devereux *et. al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1998). Análises da seqüência de RNAr 16S permitiram organizar as espécies de BRS em quatro grupos distintos: (1) BRS mesófilas Gram negativas não formadoras de esporos, (2) BRS Gram positivas formadoras de esporos, (3) BRS termófilas e (4) BRS Arqueobactérias termófila, como mostrado na Tabela 1 (Castro *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Lista de gêneros de BRS descritos e sua classificação com relação à oxidação da matéria orgânica. Taxonomia baseada no polimorfismo do RNAr 16S adaptado de Castro *et al.*, 2001.

Grupo BRS	Gênero	Oxidação da matéria orgânica	
Gram-negativa			
<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>	incompleta	
	<i>Desulfomicrobium</i>	incompleta	
<i>Desulfobacteriaceae</i>	<i>Desulfomonas</i>	incompleta	
	<i>Desulfohalobium</i>	incompleta	
	<i>Desulfobulbus</i>	incompleta	
	<i>Desulfobacter</i>	completa	
	<i>Desulfobacterium</i>	completa	
	<i>Desulfococcus</i>	completa	
	<i>Desulfosarcina</i>	completa	
	<i>Desulfomonile</i>	completa	
	<i>Desulfonema</i>	completa	
	<i>Desulfobotulus</i>	incompleta	
	<i>Desulfobacula</i>	completa	
	<i>Desulfospira</i>	completa	
	<i>Desulfocella</i>	completa	
	<i>Desulfoacinum</i>	completa	
	<i>Desulforhabdus</i>	completa	
BRS termófila	<i>Desulfocapsa</i>	incompleta	
	<i>Desulfohorpalus</i>	incompleta	
	<i>Desulfofutis</i>	incompleta	
	<i>Desulfotalea</i>	incompleta	
	<i>Desulfofrigus</i>	completa	
	<i>Desulfofaba</i>	incompleta	
	<i>Desulfomusa</i>	incompleta	
	<i>Termodesulfovibrio</i>	incompleta	
	Gram-positiva		
		<i>Desulfotomaculum</i>	indefinida
	<i>Desulfosporosinus</i>	incompleta	
Archaea			
	<i>Archaeoglobus</i>	completa	

A maioria das bactérias redutoras de sulfato conhecidas até o momento pertence ao grupo das BRS Gram negativas mesófilas não formadoras de esporos, dentro da classe δ -Proteobacteria. Neste grupo, duas famílias são incluídas: Desulfovibrionaceae, Desulfobacteriaceae (Devereux *et al.*, 1989; Silva, 2004). A família Desulfovibrionaceae inclui o gênero clássico Desulfovibrio. As características comuns dessa família são: (i) a oxidação incompleta dos compostos orgânicos e (ii) presença de desulfovirdina, uma sulfito redutase, enzima importante no metabolismo das BRS. Além disso, utilizando o RNAr 16S foi possível verificar que a família Desulfovibrionaceae é um grupo monofilético (Devereux *et al.*, 1989).

A família Desulfobacteriaceae é taxonomicamente e metabolicamente mais diversa que a Desulfovibrionaceae. O principal gênero que compõe as BRS Gram-positivas formadoras de esporos é o *Desulfotomaculum*. As bactérias deste gênero apresentam formato de bastão, porém, os esporos têm a forma de cocos (Castro *et al.*, 2000). A maioria das BRS é mesófila, entretanto grupos psicrófilos e termófilos têm sido relatados (Silva, 2004).

Outros estudos realizados a partir de análises de RNAr 16S, permitiram tanto uma reclassificação mais detalhada como a organização dos microrganismos redutores de sulfato em cinco filos, sendo quatro formados por bactérias (BRS) e um de archaea. Os filos das BRS são Proteobacteria, Firmicutes, Thermodesulfobacteria e Nitrospira, enquanto o filo das arqueobactérias redutoras de sulfato (ARS) é o Euryarchaeota, como demonstrado na Tabela 2 (Kaksonen, 2004).

O filo Firmicutes e seus gêneros apresentam parede celular com ultraestrutura semelhantes a das bactérias Gram-positivas, endosporos resistentes ao calor e temperatura de crescimento entre 25°C e 65°C. As BRS termófilas pertencem aos filos Thermodesulfobacteria e Nitrospira (Kaksonen, 2004).

Tabela 2 – Filogenia dos procariontes redutores de sulfato. Classificação baseada no polimorfismo do 16S RNAr, segundo Kaksanen (2004).

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>
			Desulfomicrobiaceae	<i>Desulfomicrobium</i>
			Desulfofalobiaceae	<i>Desulfofalobium</i>
				<i>Desulfonatronovibrio</i>
				<i>Desulfonauticus</i>
				<i>Desulfothermus</i>
				<i>Desulfobacter</i>
				<i>Desulfobacterium</i>
				<i>Desulfobacula</i>
				<i>Desulfobotulus</i>
	Desulfobacteraceae	<i>Desulfocella</i>		
		<i>Desulfococcus</i>		
		<i>Desulfofaba</i>		
		<i>Desulfofrigus</i>		
		<i>Desulfomusa</i>		
		<i>Desulfonema</i>		
		<i>Desulforegula</i>		
		<i>Desulfosarcina</i>		
		<i>Desulfospira</i>		
		<i>Desulfotignum</i>		
			<i>Desulfobulbus</i>	
			<i>Desulfocapsa</i>	
			<i>Desulfofistis</i>	
			<i>Desulforhopalus</i>	
			<i>Desulfotalea</i>	
		Desulfoarcales	Desulfoarculaceae	<i>Desulfoarculus</i>
				<i>Desulfacinum</i>
			Syntrophobacteraceae	<i>Desulforhabdus</i>
				<i>Desulfovirga</i>
				<i>Thermodesulforhabdus</i>
			Syntrophaceae	<i>Desulfobacca</i>
				<i>Desulfomonile</i>
				<i>Desulfonispota</i>
				<i>Desulfosporosinus</i>
				<i>Desulfotomaculum</i>
				<i>Thermodesulfobacterium</i>
				<i>Thermodesulfator</i>
				<i>Thermodesulfovibrio</i>
				<i>Thermodesulfobium</i>
				<i>Archaeoglobus</i>
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	
Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	Thermodesulfobacteriaceae	<i>Thermodesulfobacterium</i>
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Thermodesulfovibrio</i>
Euryarchaeota	Archaeoglobi	Archaeoglobales	Archaeoglobaceae	<i>Thermodesulfobium</i>

Recentemente, a literatura vem reportando falhas na análise filogenética das BRS baseada no RNAr 16S. Como estes microrganismos pertencem a um grupo polifilético e metabolicamente diverso, o estudo taxonômico e filogenético das BRS baseada exclusivamente no RNAr 16S é dificultado porque não existe um único oligonucleotídeo iniciador que possa detectar todas as BRS em uma única análise (Pérez-Jiménez, *et al.*, 2001; Dhillon *et al.*, 2003; Geets *et al.*, 2005; Leloup, 2006). Além disso, a análise do RNAr 16S não apresenta informações sobre a capacidade metabólica das BRS, importante no estudo da bioremediação. Com isso, uma alternativa é o uso de genes que codificam enzimas importantes na respiração dissimilatória do sulfato e que estão presentes em todas as BRS, como por exemplo, as enzimas hidrogenases, adeninafosfo sulfato redutase (APS) e sulfito redutase. Esta abordagem permite o conhecimento da diversidade das BRS e também as descobertas de novas linhagens filogenéticas (Wawer *et al.*, 1997; Dhillon *et al.*, 2003; Geets *et al.*, 2005).

A região de 1.9-kb do DNA que codifica as subunidades α e β da sulfito redutase (*dsrAB*) é encontrada somente em microrganismos capazes de fazer a redução dissimilatória do sulfato, como mostra a figura 1. A comparação das seqüências de aminoácidos do gene *dsrAB* mostra um alto grau de conservação, permitindo a construção de oligonucleotídeos específicos para a síntese *in vitro* de DNA utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e a utilização destes dados para elucidar a história evolutiva das BRS (Wagner *et al.* 1998; Zverlov *et al.*, 2005).

Zverlov *et al.* (2005) ao fazer a comparação filogenética entre o RNAr 16S e o gene *dsrAB* (gene espécie-específico), mostrou árvores com topologias congruentes para muitas linhagens de BRS, sugerindo a existência de um ancestral comum para a enzima sulfito redutase. Com isso, pode-se reconhecer que a distribuição do gene *dsrAB* entre as BRS foi resultado da combinação de divergência de especiação (descendência vertical) e aquisição de gene via transferência lateral entre BRS.

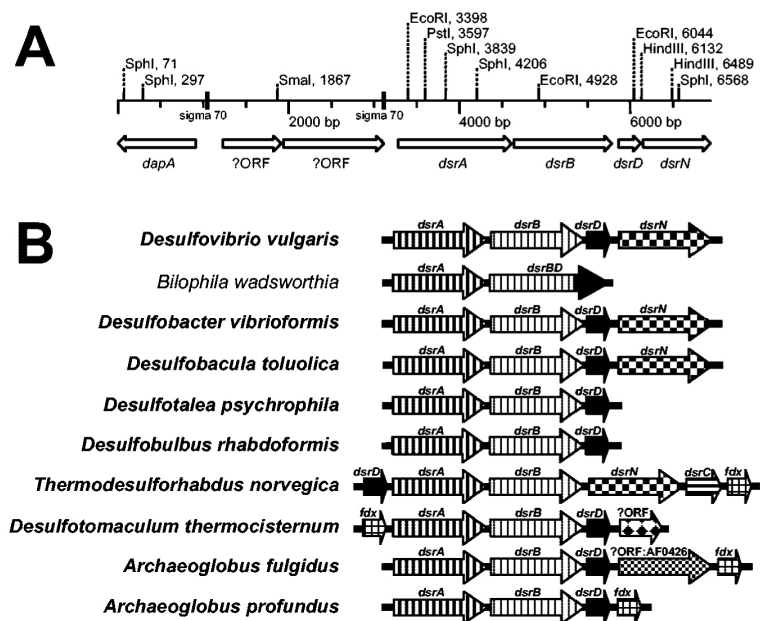


Figura 1 – (A) Mapa esquemático mostrando a organização genética do operon *dsr*. As seguintes abreviaturas representam as janelas abertas de leitura-ORF (*Open Reading Frame*): *dsrA* e *dsrB*, subunidades alfa e beta, respectivamente, da redutase sulfito dissimiltória; *DsrD*, redutase sulfito dissimiltória D; a qual tem um possível papel na regulação da transcrição do gene *dsr*; *dsrN*, putative siroheme amidase; *dapA*, dihidrodipicolinato sintase; ORF, janela aberta de leitura não identificada. (B) Organização genética de todos os operons de BRS já descritos. Janela aberta de leitura (ORF): *dsrC*, subunidade gama da redutase sulfito dissimiltória; *fdx*, ferredoxina. Número de acesso: *Desulfovibrio vulgaris*, AE017285; *Desulfobacter vibrioformis*, AJ250472; *D. toluolica*, AJ457136; *D. psychrophila*, NC_006138; *Desulfobulbus rhabdoformis*, AJ250473; *Thermodesulforhabdus norvegica*, AJ277293; *Desulfotomaculum thermocisternum*, AF074396; *A. fulgidus*, NC_000917 e *Achaeoglobus profundus*, AF071499 (Zverlov *et al.* 2005).

Pouco se sabe sobre a diversidade dessas bactérias, tanto em termos da estrutura da comunidade, que se refere à diversidade de BRS, quanto à composição da comunidade, número ou porcentagem de BRS distribuídas em um determinado ambiente. Além disso, existem poucas informações disponíveis sobre a variação da comunidade de BRS em respostas a mudanças ambientais (Chang *et al.*, 2001).

A evolução dos seres vivos faz com que sistemas biológicos preservem sua estrutura e funcionalidade. As mudanças são causadas por alterações nas moléculas de DNA e este processo faz com que seja comum a existência de seqüências semelhantes em diferentes organismos. Quanto mais semelhantes e mais próximos os organismos estão na escala evolutiva, mais semelhantes são suas seqüências genéticas. Genes homólogos são aqueles que, apesar de pertencerem a diferentes organismos, são estruturalmente similares e cumprem funções semelhantes. A análise de genes

homólogos fornece características de um novo gene por meio da inferência de genes já descritos, baseada em suas seqüências de DNA e proteínas (Durbin *et al.*, 1998).

1.2.2. CONSIDERAÇÕES FISIOLÓGICAS

BRS constituem um grupo fisiologicamente diverso que utiliza formas oxidativas de enxofre, como aceptor final de elétrons, tendo como produto dessa reação o gás sulfídrico (H_2S) (Cheung e Gu 2003; Dinh *et al.*, 2004). Esse processo é denominado de “respiração do sulfato” ou também de redução dissimilatória do enxofre (Frederiksen e Finster, 2003). As BRS são amplamente distribuídas na natureza e têm um papel importante no ciclo biogeoquímico do enxofre e na degradação da matéria orgânica em diferentes ambientes anaeróbicos (Holmer e Storkholm, 2001).

As BRS utilizam diferentes compostos orgânicos tais como lactato, acetato, propionato, álcoois monovalentes e hidrogênio como doadores de elétrons resultando na conservação de energia quimiosmótica, responsável pelo crescimento destes microrganismos (Aubert, 2000; Holmer e Storkholm, 2001; Carepo *et al.*, 2002). Além disso, a literatura descreve a capacidade das BRS utilizarem compostos aromáticos e hidrocarbonetos, além de aldeídos como doadores de elétrons e fonte de carbono (Thapper, 2006). Há também indicações de consórcios microbianos de BRS e arqueobactérias metanogênicas envolvidas na oxidação do metano, porém, tais culturas, não têm sido cultivadas com sucesso (Silva, 2004).

As BRS utilizam uma ampla variedade de compostos de enxofre como aceptores finais de elétrons como, sulfitos (SO_3^{2-}), tiosulfatos ($S_2O_3^{2-}$) e sulfato (SO_4^{2-}), sendo este último mais utilizado na redução dissimilatória de sulfato (Madigan *et al.*, 1997). Além dos compostos de enxofre, a redução de nitrato e nitrito tem sido relatada, principalmente, nos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium* e *Desulfobulbus*. Estas observações ilustram a grande versatilidade dessas bactérias, especialmente, em ambientes onde a concentração de sulfato pode ser limitada, o que representa um mecanismo de sobrevivência das mesmas (Silva, 2004).

Gall e Xavier (1996) demonstraram que as BRS não são estritamente anaeróbicas. Certas espécies de BRS têm a capacidade de tolerar a presença de oxigênio no meio

(por exemplo, *Desulfovibrio gigas*) e também de utilizar o oxigênio como aceptor final de elétrons, como acontece na respiração aeróbia (Sass et al., 1997; Fareleira et al., 2003). A tolerância ao oxigênio faz acreditar que determinadas espécies apresentam os mecanismos de defesa contra os radicais livres formados durante o metabolismo celular, a exemplo da enzima catalase (Fareleira et al., 2003; Medírcio et al., 2007).

As BRS também podem ser divididas em dois grupos metabólicos importantes, como: Grupo I, caracterizado pela oxidação incompleta do composto orgânico para acetato e, Grupo II que envolve a oxidação completa do substrato orgânico para CO₂. A oxidação incompleta do composto orgânico ocorre devido a ausência de um mecanismo para a oxidação da acetil-CoA e os principais representantes deste grupo são as espécies dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfotomaculum* e *Desulfobulus*. A maioria das BRS, incluindo as espécies dos gêneros *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus* e *Deulfosarcina*, está dentro do Grupo II (Madigan et al., 1997; Castro et al., 2000). Estas apresentam diferentes mecanismos para a oxidação do acetato a CO₂. Nas espécies do gênero *Desulfobacter*, as quais utilizam preferencialmente o acetato como doador de elétron, uma modificação no ciclo do ácido cítrico é observada, ao passo que as outras espécies deste grupo oxidam o acetato envolvendo a via da acetil-CoA. Apesar da equivalência energética, a modificação do ciclo do ácido cítrico aumentou a eficiência do metabolismo das BRS. Isto, provavelmente, é explicado pela alta taxa de crescimento observada em *Desulfobacter* em comparação as outras BRS (Silva, 2004).

O processo de redução do sulfato envolve várias enzimas oxiredutoras (Aubert, 2000), como mostrado na figura 2. Inicialmente, as bactérias utilizam uma fonte carbono, como por exemplo, o lactato, que é oxidado liberando elétrons e prótons. Estes compostos são transferidos para uma hidrogenase citoplasmática para gerar H₂. O hidrogênio molecular difunde pelo periplasma onde é reoxidado liberando elétrons que são transportados pelo citocromo e em seguida transferidos pela cadeia transportadora de elétrons ao aceptor final de elétrons. Os H⁺ formados no periplasma são responsáveis pela produção de energia (ATP) e conseqüentemente na ativação de enzimas que atuam na redução de sulfato intracelular.

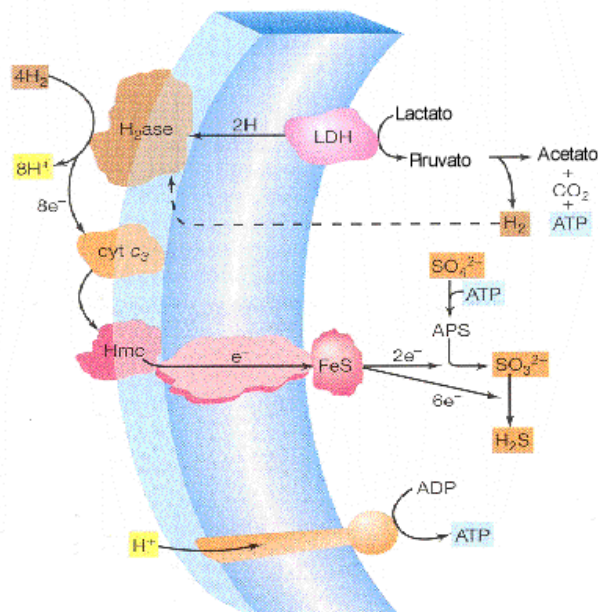


Figura 2 - Rota metabólica da redução de sulfato em bactérias redutoras de sulfato (adaptado de Madigan *et al*, 1997). LDH – Lactato desidrogenase; cyt C₃ – citocromo C₃; H₂ase – hidrogenase; Hmc – complexo de citocromo.

Em contraste com outros modelos de respiração anaeróbica como desnitrificação e metanogênese, a transferência de elétrons que envolvem as hidrogenases e as redutases terminais (APS redutase e sulfito redutase) é pouco conhecida. Matias *et al* (2005) relatam que a cadeia transportadora de elétrons da respiração do sulfato apresenta diferenças significativas relacionadas com outros sistemas como, por exemplo, a falta de importantes complexos respiratórios encontrados em outras bactérias como NADH (quinona oxiredotase) e bc1 (quinol: citocromo c). Outras diferenças são relacionadas às redutases terminais as quais estão localizadas no citoplasma ao contrário das outras bactérias. As redutases terminal não estão envolvidas diretamente na translocação de elétrons através da membrana e na geração do potencial eletroquímico, e sim na transferência de elétrons na redução do íon sulfato.

O íon sulfato, por ser muito estável, não pode ser reduzido sem antes ser ativado pela célula bacteriana. Com isso, o sulfato é catalisado pela enzima ATP sulforilase, tendo como produto a adenosina-fosfosulfato (APS). Essa reação ocorre tanto no processo dissimilativo como no assimilativo. A molécula de adenosina 5'-fosfosulfato (APS) poderá ser transformada em fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), pela enzima

APS quinase, segundo um mecanismo assimilativo ou em adenosina mono-fosfato (AMP), pela enzima APS redutase, em um processo dissimilativo. Em outras palavras, nos dois processos há redução do sulfato, porém, o metabolismo assimilativo está relacionado à incorporação das formas reduzidas do sulfato, enquanto que o metabolismo dissimilativo está relacionado ao processo respiratório das BRS, como mostrado na figura 3. O APS é reduzido diretamente a sulfito (SO_3^{2-}), consumindo elétrons. Logo após a formação do SO_3^{2-} , as reações subsequentes são realizadas rapidamente, reduzindo o sulfito (SO_3^{2-}) a H_2S (Madigan *et al.*, 2003).

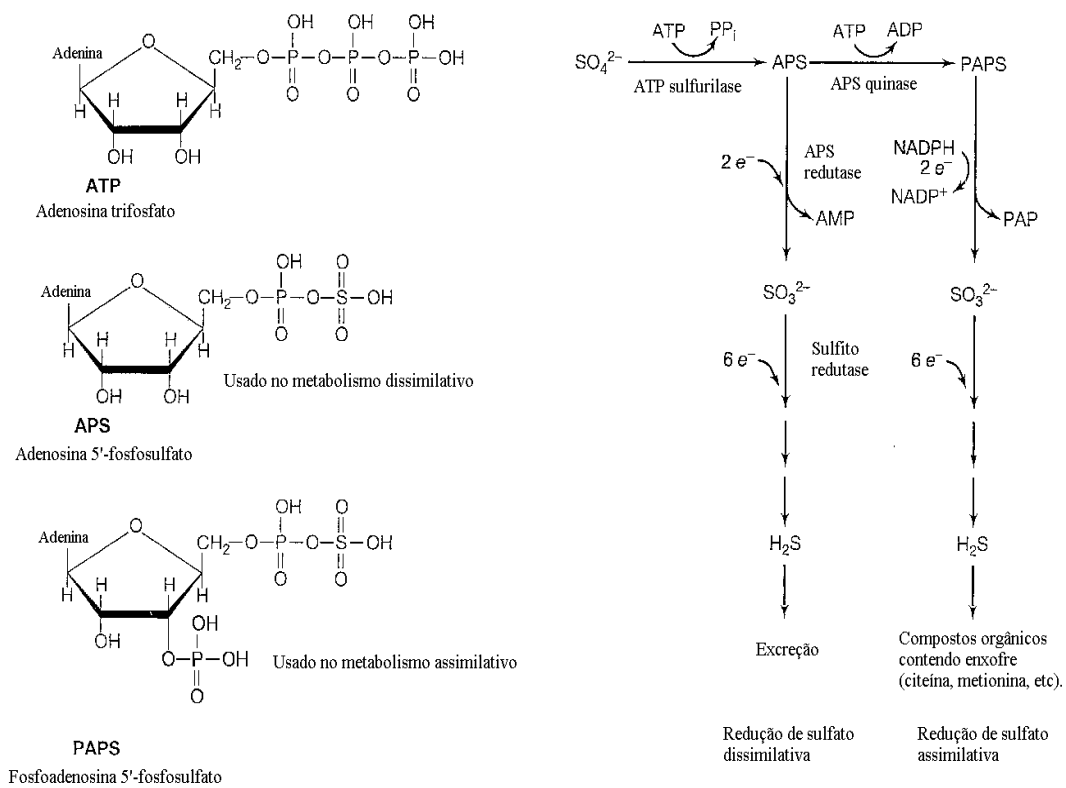


Figura 3 – Estrutura molecular do ATP, APS e PAPS. Vias metabólicas de redução de sulfato: assimilativa e dissimilativa. Observando as duas vias metabólicas de redução de sulfato, verifica-se que o sulfito não necessita de ativação para ser metabolizado pelas BRS. O sulfito pode ser substituído pelo tiosulfato (Kaksonen, 2004; Madigan *et al.*, 2003).

2. Objetivos

Este projeto teve como objetivo principal o isolamento e a caracterização molecular de BRS obtida de regiões típicas de DAM. Para isso, foram abordados os seguintes objetivos específicos:

1. Isolar BRS de amostras de corpos d'águas com pH ácido;
2. Caracterizar morfológicamente os isolados de BRS;
3. Avaliar o efeito da variação de pH no crescimento das BRS e redução de sulfato;
4. Clonar e sequenciar os genes sulfito redutase dissimilatória (*dsrB*) e hidrogenase (*hyd*);
5. Analisar a filogenia da BRS isolada por meio de programas computacionais;
6. Analisar o perfil da expressão do gene *dsrB* em diferentes condições de pH.

3. Relevância

Drenagem ácida de mina produz efluentes ácidos carregados de metais pesados e altas concentrações de sulfato, muitas vezes excedendo os limites aceitos pela legislação ambiental. Por acarretar conseqüências irreversíveis uma vez iniciadas, é considerada um dos problemas ambientais mais preocupantes para as agências fiscalizadoras do meio ambiente e para as mineradoras. A alternativa mais promissora para a remediação de drenagem ácida de mina envolve o uso de bactérias redutoras de sulfato (BRS). A utilização de BRS para a bioremediação de DAM é uma tecnologia viável, de baixo custo, que pode contribuir para a diminuição da poluição de cursos d'água pelo íon sulfato e por metais pesados.

A redução biológica de sulfato é facilmente conduzida quando os efluentes contaminados com sulfato e metais pesados são previamente neutralizados. Entretanto, para otimizar o tratamento da DAM, é necessário que sejam desenvolvidos novos processos biotecnológicos de bio-redução de sulfato com BRS capazes de crescer em pH ácido. Diante destas considerações, torna-se importante a identificação e a caracterização de BRS capazes de crescer em pH ácido, o que abre a possibilidade de estender a aplicação das BRS ao tratamento de efluentes ácidos. Esta perspectiva abre um campo de pesquisa para a utilização destas bactérias em processos biotecnológicos. Sendo este um dos pilares da tecnologia deste século, no processamento de águas residuárias, contribuindo para a preservação dos recursos hídricos o qual é um bem essencial à vida e que se tornou uma das grandes preocupações da humanidade neste momento.

4. Materiais e Métodos

4.1 AMOSTRAS

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de sedimento de diferentes áreas típicas de DAM gerada pela mineração de ouro no estado de Minas Gerais. O sedimento das DAM apresentaram o pH em entorno de 2,5. As amostras foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o Laboratório de Hidrometalurgia da Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP para o enriquecimento e a realização das análises microbiológicas.

4.2 ENRIQUECIMENTO E SELEÇÃO DE BRS

A fim de enriquecer e selecionar BRS de amostras coletadas de sedimento de DAM foi utilizado o meio de cultura Postgate C modificado por Cheung e Gu (2003), cuja composição está apresentada na tabela 3. Com o objetivo de retirar qualquer traço de oxigênio existente no meio foi adicionado tioglicolato de sódio. O pH da solução foi ajustado para $5,5 \pm 0,2$ e $7,0 \pm 0,2$, em seguida, a solução foi esterilizada em autoclave. A solução de sulfato de ferro foi autoclavada separadamente e depois adicionada à solução de sais na proporção 1:10.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura de Postgate C modificado por Cheung e Gu (2003).

Ingrediente	Quantidade g L¹
Lactato de sódio	1,20
Citrato de sódio	0,30
Extrato de levedura	0,10
NaSO ₄	4,50
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,06
NH ₄ Cl	1,00
KH ₂ PO ₄	0,50
MgSO ₄	2,00
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,50
EDTA	0,30
Tioglicolato de sódio	0,50
Agar bacteriológico	0,50

Alíquotas de 12mL de cada amostra foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo 250mL de meio de cultura estéril. Os frascos foram incubados a 35°C, durante uma semana. Após esse período, uma outra alíquota de 12mL da cultura enriquecida, foi transferida para um novo frasco erlenmeyer contendo outros 250mL do meio de cultura e novamente incubado a 35°C por mais uma semana. Alíquotas dessas culturas enriquecidas foram utilizadas para os ensaios microbiológicos e moleculares.

4.3 ISOLAMENTO DE CULTURAS PURAS

O isolamento das bactérias em meio foi realizado pelo método de “*pour plate*”, utilizando a diluição em série para a obtenção de colônias isoladas. O meio de cultura Postgate C foi solidificado com ágar bacteriológico (15g/L) e distribuídos em placa de Petri. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C, durante 24 horas. Colônias isoladas foram repicadas com alças bacteriológicas e inoculadas em meio de cultura Postgate C líquido, pH $5,5 \pm 0,2$. Após o crescimento, as culturas puras foram preservadas em glicerol a -70°C.

4.4 CRESCIMENTO EM pH ÁCIDO

Após o isolamento, foram realizados os testes do crescimento em pH ácido. Nesses experimentos foi utilizado etanol P.A. (6,7mL/L) como fonte de carbono, em substituição ao lactato. Um inóculo de 2mL de cada cultura isolada foi transferido para tubo de ensaio com rosca contendo 10mL do meio de cultura Postgate C. O pH do meio foi ajustado com HCl 1M para $4,5 \pm 0,2$. Em seguida, os inóculos foram incubados a 35°C até apresentarem o precipitado preto FeS. Esses experimentos foram feitos em triplicatas.

4.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

As culturas enriquecidas e os isolados foram caracterizados quanto ao arranjo, forma e coloração da estrutura das células pela coloração de Gram, conforme o protocolo descrito por Baron *et al.* (1994). As lâminas foram analisadas por microscopia óptica.

As células bacterianas também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa técnica foi utilizada para se ter uma melhor resolução da forma das células sem perdas das características morfológicas, que podem acontecer quando é utilizado métodos convencionais de coloração. As lâminas foram preparadas a fresco e secadas ao ar. Em seguida, foi feita a metalização das lâminas com grafite, para observação no MEV. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Microscopia Eletrônica do DEGEO/EM-UFOP.

4.6 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E ANÁLISE DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO

O crescimento bacteriano foi avaliado indiretamente por determinação de densidade óptica- D.O. (600nm) do meio em espectrofotômetro (Hitachi - U2800A). A D.O. é determinada pela função do aumento da turbidez do meio gerada pelo crescimento bacteriano.

As concentrações de sulfato foram determinadas por meio da cromatografia líquida de íons (Metrohm) em coluna de polimetacrilamida-quartenária tendo como eluente o carbonato (2.0mmol/L NaHCO₃ e 1.3mmol/L Na₂CO₃). As amostras foram preparadas antes de serem injetadas na cromatografia. O íons sulfeto foi removido com uma solução concentrada de acetato de zinco. O pH foi corrigido para 11,0 com o objetivo de precipitar o excesso de zinco da solução, em seguida amostra filtrada com filtro 0,45µm (Millex, Millipore).

Para os isolados estudados, foi avaliado o efeito do pH na redução de sulfato e no crescimento bacteriano. Uma alíquota de 12mL de cada cultura foi transferida para um frasco âmbar contendo 1L de meio de cultura Postgate C modificado estéril (sem FeSO₄ 7H₂O) e o pH foi ajustado para pH 5,5 e pH 7,0. Como suporte para o

crescimento bacteriano foi utilizada areia, previamente esterilizada, e transferida para o fundo do frasco âmbar. Os frascos foram incubados a 35°C por 8 horas. Após esse período, foram retiradas alíquotas a cada 8 horas para a leitura de D.O.₆₀₀ e para a análise da redução de sulfato. Os experimentos foram feitos em duplicata.

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A caracterização ao nível molecular das bactérias redutoras de sulfato foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP.

4.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

As amostras utilizadas para a caracterização molecular estão descritas na tabela 4. Como controle positivo foi utilizado à espécie *D. vulgaris*. Esta cultura foi gentilmente cedida pelo Centro de Investigação e Desenvolvimento em Fermentação Industrial (CINDEFI) CONICET-UNLP da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata.

Tabela 4: Amostras utilizadas na análise de caracterização molecular.

Nome da cultura	Tipo de cultura	pH cultivado
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Isolada	7,0
C.a	Mista	4,5
C.b	Mista	5,5
C.1	Isolada	5,5

As culturas de BRS obtidas do enriquecimento e do isolamento foram centrifugadas e o precipitado, contendo em torno de 5×10^8 células de BRS por mL, foi transferido para um tubo tipo eppendorf e mantido a -20°C. Em seguida, procedeu-se a extração do DNA genômico utilizando o método do CTAB simplificado por Costa (1997).

Para cada 100µL do precipitado da cultura de BRS, foram adicionados 250µL do tampão de lise (Tris 0,05 mM, pH 7,5, EDTA 1mM, 1% de N-Laurilsarcosina) e mantidos em banho maria a 37°C durante 1 hora. Em seguida, foram adicionados 100µg/mL de proteinase K e a mistura, incubada a 37°C por 4 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 100µL de NaCl 5M e a amostra incubada novamente por 10 minutos a 37°C. Posteriormente foram adicionados 50µL de uma solução de CTAB/NaCl a 10%, seguido por incubação por 20 minutos a 65°C. A extração do DNA foi realizada com a adição de igual volume de clorofórmio, homogeneizado com auxílio de um vortex e centrifugado durante 10 minutos a 12.000xg. Após centrifugação ocorreu a separação em duas fases, uma aquosa (superior) e outra orgânica (inferior). A seguir, a fração aquosa foi transferida para um tubo tipo eppendorf estéril (1,5mL). O DNA genômico foi, posteriormente, precipitado pela adição de igual volume de isopropanol, invertido suavemente e acondicionado a -20°C, durante 30 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 12000xg por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 12000xg. Após a centrifugação, o DNA precipitado foi seco, ressuspendido em água Milli-Q e armazenado a 4°C.

Para a avaliação da qualidade da extração, cerca de 3µL de DNA genômico extraído foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídeo e visualizados com auxílio de um transiluminador (Vilber Lourmat em UV).

4.7.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Para as reações de PCR foram utilizados iniciadores espécie-específicos que amplificam seqüências gênicas de enzimas importantes no metabolismo da redução de sulfato de BRS: sulfito redutase (*dsrB*) e hidrogenase (*Hyd*). Os oligonucleotídeos iniciadores foram construídos segundo Geets et al. (2005) e Wawer e Moyer (1995), respectivamente. A tabela 5 mostra a seqüência dos oligonucleotídeos, com as respectivas temperaturas de anelamento utilizadas e o tamanho dos produtos esperados nas reações de PCR.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR.

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos	Temperatura de ligação	Produto esperado (pb)
<i>drsB</i>	5' GTGTAGCAGTTACCGCA 3' 5' CAACATCGTYACCCAGGG 3'	55°C	350
<i>hyd</i>	5' CGCCACGCCAGCACTTCACCCAGCGC 3' 5' GCAGGGCTTCCAGGTAGTGGGCGGTGGCGATGAGGT 3'	60°C	400

4.7.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para amplificar parte das seqüências correspondentes aos genes *drsB* e *hyd*, foi utilizada a técnica de PCR. Em um tubo tipo eppendorf com capacidade para 200µL foi adicionada a mistura da reação de PCR com um volume final de 50µL. Os componentes da reação estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Reagentes utilizados na reação de PCR.

Componentes	Volume	Concentração
Tampão da reação (sem Mg ²⁺)	5µL	10x
MgCl ₂	1,5µL	50mM
dNTPs	1µL	10M
Solução de oligonucleotídeos específicos diretos e inversos	2µL	10mM
Taq DNA polimerase	1µL	5u/µL
Água Milli-Q	37,5µL	
DNA genômico ou DNA plasmidial	2µL	

A mistura reacional foi incubada em um termociclador (Thermo Hybaid Px2) a 94°C, durante 4 minutos para desnaturação do DNA e ativação da platinum Taq DNA polimerase. Após a desnaturação, a reação de amplificação consistiu de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, uma etapa de 1 minuto a 55°C (*dsrB*) e a 60°C (*hyd*) para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 1 minuto para extensão a 72°C. Ao final dos ciclos a reação foi mantida por 6 minutos a 72°C e resfriada a 4°C. A seguir, 5µL do produto da reação foram analisados em gel de agarose 1,2%. Os amplicons foram corados com brometo de etídeo e visualizados com auxílio de um transiluminador em UV. O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por comparação com um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen).

4.7.4 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Cerca de 100µL do produto de reação, obtidos como descrito acima foram transferidos para um novo tubo eppendorf. Em cada tubo foi adicionado 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M pH 7,0 (10µL) e 2,5 do volume (250µL) de etanol absoluto. Essa mistura foi incubada a -20°C por 30 minutos. Em seguida centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e seco. O DNA foi suspenso em 50µL de TE (Tris-HCl 10mM/EDTA 1 mM pH 8,0).

4.7.5 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE DNA UTILIZANDO O MÉTODO FREEZE SQUEEZE

A recuperação de fragmentos de DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tautz & Renz (1983). Primeiramente, com auxílio de um bisturi, foi cortado do gel o bloco de agarose contendo a banda de interesse. Em seguida, este bloco foi transferido para um béquer contendo 10mL de uma solução composta de NaOAc 300mM/EDTA 1mM, pH 7,0 e incubada ao abrigo da luz, sob agitação lenta por 30 min. Posteriormente, o bloco de agarose foi transferido para um tubo contendo lã de vidro e mantido a -70°C por 30 minutos. O DNA livre da agarose

foi obtido por centrifugação a 12000xg por 15 minutos e recuperado a -20°C pela precipitação com solução de 1/10 de acetato de sódio 3M pH 7,0 e 2,5 volumes de etanol absoluto. Após a lavagem com etanol 70% e seco, o DNA foi suspenso em 50µL de TE.

4.7.6 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

4.7.6.1 REAÇÃO DE LIGAÇÃO

As amostras purificadas dos amplicons correspondentes aos genes *dsrAB* e *hyd* obtidos da BRS isolada e da BRS de referência (*D. vulgaris*) foram inicialmente ligadas no vetor pGEM-T easy (Promega) o qual está ilustrado na figura 4. Para cada reação foi utilizado os seguintes componentes: 5µL de tampão, 3µL do produto de PCR, 1µL de vetor pGEM-T easy e 1µL de DNA ligase. A reação foi incubada no termociclador a 4°C por 16 horas.

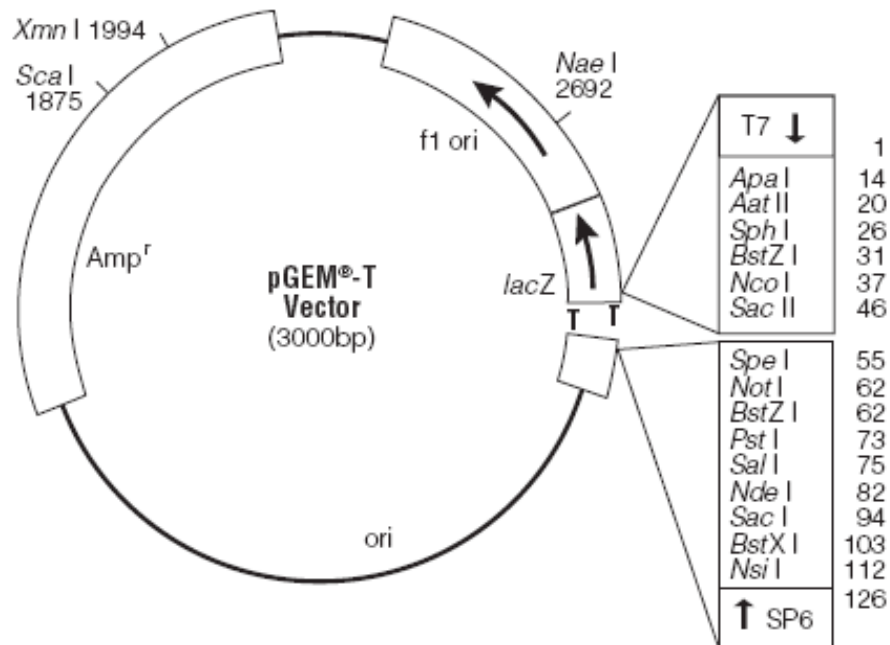


Figura 4 – Vetor plasmidial pGem T-easy. Ilustração do vetor pGEM-T easy mostrando os pontos referentes as seqüências do vetor plasmidial de sequenciamento.

4.7.6.2 PREPARO DE CÉLULAS *ESCHERICHIA COLI* DH5 α COMPETENTE

As células de *E. coli* DH5 α foram tornadas competentes por meio da técnica descrita a seguir. Uma colônia de bactéria DH5 α foi inoculada em 5mL de meio LB (bacto-triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 5g/L; pH=7,5), em tubo tipo Falcon de 15mL e encubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Após a incubação, 250 μ L do pré-inóculo foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 50mL e o volume completado para 25mL com meio SOB (bacto-triptona 2g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 0,58; KCl 0,2g/L; pH=7,5) suplementado com 250 μ L de MgSO₄ 1M e 250 μ L de MgCl₂ 1M. A cultura foi incubada por duas horas a 37°C sob agitação de 200 rpm até que concentração de células atingisse uma densidade ótica (600nm) entre 0,4 e 0,6. A seguir, as células foram incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Após o tempo de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com auxílio de um pipetador automático em 10mL de tampão Pipes (60mM de CaCl₂, 10mM de Pipes e 15% de glicerol P.A) para a lavagem das células. Em seguida, as bactérias foram novamente centrifugadas a 2000xg durante 10 minutos a 4°C. A lavagem foi repetida duas vezes nas mesmas condições. Após as lavagens, as células foram incubadas por 30 minutos em banho de gelo e em seguida centrifugadas a 2000xg por 10 minutos a 4°C. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 1,2mL de tampão Pipes. As células competentes foram armazenadas a – 80°C até o momento do uso.

4.7.6.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A uma alíquota de 100 μ L de células competentes foram adicionadas 5 μ L do produto da reação de ligação, obtido conforme item 4.7.6.1. Essa mistura foi incubada em banho de gelo durante 30 minutos, submetida a choque térmico à 42°C por 90 segundos e retornou ao banho de gelo, em seguida, por 2 minutos. A mistura foi transferida para um tubo tipo eppendorf contendo 950 μ L de meio SOB e incubada durante 90 minutos a uma temperatura de 37°C sob agitação constante (200 rpm). Após

esse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 3000xg por 5 minutos e o precipitado transferido para placas de Petri com meio LB-ágar contendo ampicilina (100µg/mL), X-Gal (20µg/mL) e IPTG, e espalhadas com uma alça de Drigalski. A presença de X-Gal permitiu a seleção de clones com inserto no plasmídio dos que não apresentavam o inserto através da mudança na coloração da colônia formada. As placas contendo as células transformadas foram incubadas, durante 16 horas, a 37°C, em estufa.

4.7.7 PCR DE COLÔNIAS

Para a confirmação da presença do inserto de interesse na colônia a ser utilizada, três colônias recombinantes foram transferidas para 1,5mL de caldo LB/ampicilina durante 14 horas e submetidas à amplificação por PCR como descrito no item 4.7.3.

A seguir, 5µL da reação foram analisadas em gel de agarose 1,2%. Os amplicons foram corados com brometo de etídeo e visualizados com auxílio de um transiluminador em UV. O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por comparação com um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen).

4.7.8 MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Alíquota de 5µL da cultura das células transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB/ampicilina (100µg/mL) e incubadas durante 16 horas a 37°C sob agitação constante (200 rpm). O método de extração utilizado foi o da lise alcalina descrito por Maniatis et al. (1989). O procedimento adotado está resumido a seguir: 1,5mL de cultura bacteriana obtida como descrito acima, foram centrifugados a 14000xg durante 3 minutos, o sobrenadante removido e o procedimento realizado novamente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado suspenso em 100µL de solução TGE (Glicose 50mM, EDTA 10mM e Tris-HCl 25mM, pH 8,0) suplementada com RNase 20mg/mL. Após a lise alcalina das bactérias com solução composta de NaOH 0,2N e SDS a 1% e precipitação das proteínas com acetato de potássio 3M pH 4,0, o sobrenadante foi submetido a extração com igual volume de clorofórmio. O DNA plasmidial foi recuperado a -20°C pela precipitação com 1/10 de acetato de sódio 3M

pH 7,0 e 2,5 volume de etanol absoluto. Após a lavagem com etanol 70% e seco, o DNA foi suspenso em 50µL de TE (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM pH 8,0).

Posteriormente, 5µL da reação foram analisadas em gel de agarose 0,8%. Os amplicons foram corados com brometo de etídeo e visualizados com auxílio de um transiluminador em UV.

4.7.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para o sequenciamento dos fragmentos gênicos, utilizou-se a técnica do término do crescimento da cadeia, inicialmente desenvolvida por Sanger *et al*, 1997. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *Big-Dye Terminator* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante e as reações, analisadas no sequenciador automático de DNA, ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os plasmídeos foram sequenciados nas direções “direto” e “reversa”. O sequenciamento foi realizado em colaboração com a Universidade de São Paulo -USP – Riberão Preto.

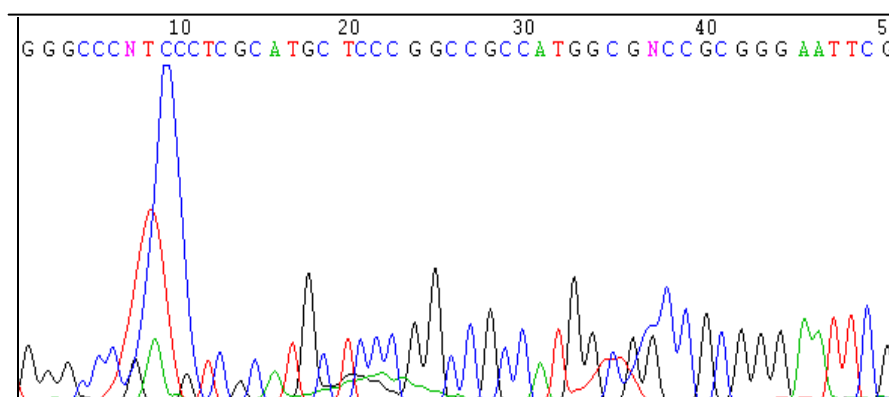


Figura 5 - Cromatograma obtido após a leitura em gel de sequenciamento automático

4.7.10 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

As seqüências obtidas foram submetidas a uma busca por homologia de nucleotídeos e aminoácidos com uso dos algoritmos BLASTn e BLASTp, respectivamente (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a identificação das prováveis regiões codificadoras foram realizadas análises das seqüências utilizando Artemis (Rutherford,

2000). O banco de dados COG e Pfam foram utilizados para a determinação do domínio da proteína. O alinhamento das seqüências de aminoácidos, obtidas com os ortólogos, foi realizado com auxílio do programa CLUSTALX (Thompson et al., 1997). A árvore filogenética foi construída pela método de distância, utilizando o algoritmo Neighbor-Joining. O software utilizado para a construção das árvores filogenéticas foi o Mega 4.0

4.7.11 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS CULTURAS ISOLADAS

Nos experimentos de extração de RNA, a água utilizada foi inicialmente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC-Sigma) na proporção de 1/1000, deixada em repouso por 12 horas e a seguir esterilizada com auxílio de uma autoclave, 1atm 120°C, para tornar-se isenta de RNases. Todos os materiais, tais como: ponteiras, tubos eppendorfs, e vidrarias foram lavados com água DEPC e autoclavados por 40 minutos.

Para a extração de RNA total, 2×10^8 de células bacterianas foram adicionadas a 1mL de Trizol (Gibco-BRL). Em seguida, a mistura foi homogeneizada três vezes com o auxílio de um vórtex. A mistura foi incubada por 40 minutos à temperatura ambiente. Após este intervalo foram adicionados 200µL de clorofórmio e agitado vigorosamente por 1 minuto em vórtex. A mistura resultante foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e a seguir centrifugada por 10 minutos a 10.000xg. A fase aquosa foi então transferida para um eppendorf de 1,5mL e adicionado 500µL de isopropanol (Sigma). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 30 minutos a -20°C. Após este período os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 xg e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 10.000 xg, e o sobrenadante descartado novamente.

Posteriormente, o RNA total foi mantido por 20 minutos à temperatura ambiente para a evaporação total do etanol. A seguir, foi ressuscitado em 25µL de água DEPC e incubado 56°C por 10 minutos. Para quantificar o RNA, foram diluídos 4µL da solução em 1000 µL de água. A leitura foi processada em 260 e 280 nm, para estimar o grau de contaminação com proteínas. Segundo Maniatis et al., (1989), 1 unidade de absorção na D.O. a 260nm corresponde a 40µg de RNA/mL.

A integridade da preparação foi verificada em gel de agarose a 1,2% em MOPS 1X diluído com água DEPC (Mops 21g, Acetato de sódio diidratado 3,4g, EDTA tetrassódico 1,9g, água DEPC 500mL, o pH 7 e autoclavado). Antes de aplicar as amostras no gel de agarose, 10µg de RNA foram adicionados a 15µl de tampão de amostra (formamida 187,5µL, formaldeído 27,5µL, Mops 10X 37,5µL, azul de bromofenol [100mg/mL] 1µL, água DEPC 42µL e brometo de etídeo 0,5µL). Essa mistura foi desnaturada por 15 minutos a 65°C, seguida de banho de gelo por 3 minutos. As amostras foram aplicadas no gel e adotou-se uma voltagem de 45 a 50 volts sendo o tampão de corrida MOPS 1X. O padrão de RNA (0,24 a 9,5 Kb Gibco) foi tratado nas condições descritas acima.

4.7.12 RT-PCR (Reverse - Transcription Polimerase Chain Reaction)

A análise da expressão do gene *dsrB* crescidas em diferentes pHs, foi realizada por RT-PCR. A partir do RNA total obtido das células bacterianas foi sintetizada a primeira fita do cDNA pela atividade da enzima transcriptase reversa (*Thermoscript RT- PCR System* -Invitrogen), como brevemente descrito abaixo. Inicialmente foram utilizados aproximadamente 5µg de RNA total, 50pmol de oligonucleotídeos iniciadores específicos, 10mM de dNTPs e água livre de RNase para um volume final de 10µL. A desnaturação do RNA foi realizada através da incubação da mistura a 65°C em termociclador (*ThermoHybaid*) durante 5 minutos, seguido de banho de gelo por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado o tampão da enzima, 0,1M de DTT (ditiltreitol) e 15 unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, essa mistura foi incubada em termociclador a 37°C durante 60 minutos, seguida de outra incubação a 85°C por 5 minutos. Finalizando a reação foi acrescentado 1,0µL de RNase H e a amostra incubada por 20 minutos a 37° C para a digestão do RNA utilizado como molde. A amostra foi estocada a -20°C até o momento do uso.

No intuito de obter o cDNA fita dupla, ampliações foram realizadas utilizando 2µL do cDNA, combinados com os oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene *dsrB*. A mistura reacional foi incubada em um termociclador (Thermo Hybaid Px2) a 94°C, durante 4 minutos para desnaturação do DNA e ativação

da platinum Taq DNA polimerase. Após a desnaturação, a reação de amplificação consistiu de 25 ciclos formados por uma etapa de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, uma etapa de 1 minuto a 55°C para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 1 minuto para extensão a 72°C. Ao final dos ciclos a reação foi mantida por 6 minutos a 72°C e resfriada a 4°C.

5. Resultados

5.1 ENRIQUECIMENTO E ISOLAMENTO DE BRS

A partir das técnicas utilizadas para o enriquecimento e seleção de bactéria redutora de sulfato (BRS) das amostras de sedimento de uma região de drenagem ácida de mina (DAM), foi obtido três culturas enriquecidas de diferentes locais, denominadas de A, B e C, as quais foram capazes de produzir o gás sulfídrico. Devido a este gás e a presença de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio de cultura ocorreu a formação de um precipitado preto de FeS , durante o enriquecimento das culturas, conforme pode ser observado na figura 6. O precipitado de FeS é um indicativo da presença de BRS no meio de cultura.

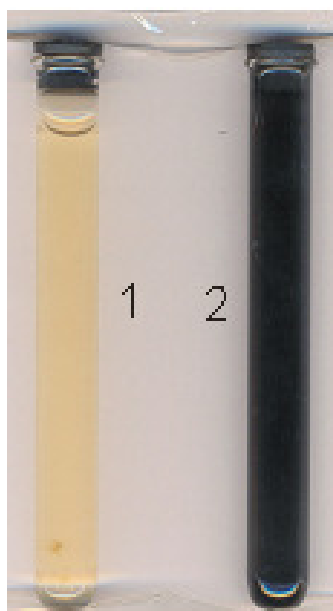


Figura 6 –Tubos de ensaio com meio Postgate C. (1) Meio de cultura sem inóculo e (2) Meio com inóculo. A mudança da coloração do meio de cultura indica a precipitação do metal Fe na forma de FeS após sete dias de incubação à 37°C . O FeS é um indicativo da presença de BRS no meio de cultura.

Entretanto, somente a cultura C apresentou crescimento em pH 5,5. Como o objetivo deste trabalho é a obtenção de BRS capazes de crescer em condições ácidas, foi realizado o isolamento das culturas, a partir da cultura C. Um total de 17 culturas puras foram isoladas. Em seguida, cada isolado foi inoculado em meio modificado, Postgate C, para possível confirmação da presença de BRS. Entretanto, somente uma cultura pura, denominada de C.1, foi capaz de produzir o gás sulfídrico em $\text{pH } 4,5 \pm 0,2$, com a

formação de precipitado negro de FeS. As outras 16 culturas foram mantidas em freezer -70°C para trabalhos posteriores.

5.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO ISOLADO C.1

A partir da coloração da cultura isolada C.1 pela técnica de coloração de Gram, foi possível observar em microscópio óptico trata-se de células bacterianas na forma de bastonetes Gram negativos. Este resultado foi confirmado usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual proporcionou a observação mais nítida da forma celular do isolado C1, confirmando-se a forma de bastonetes (figura 7).

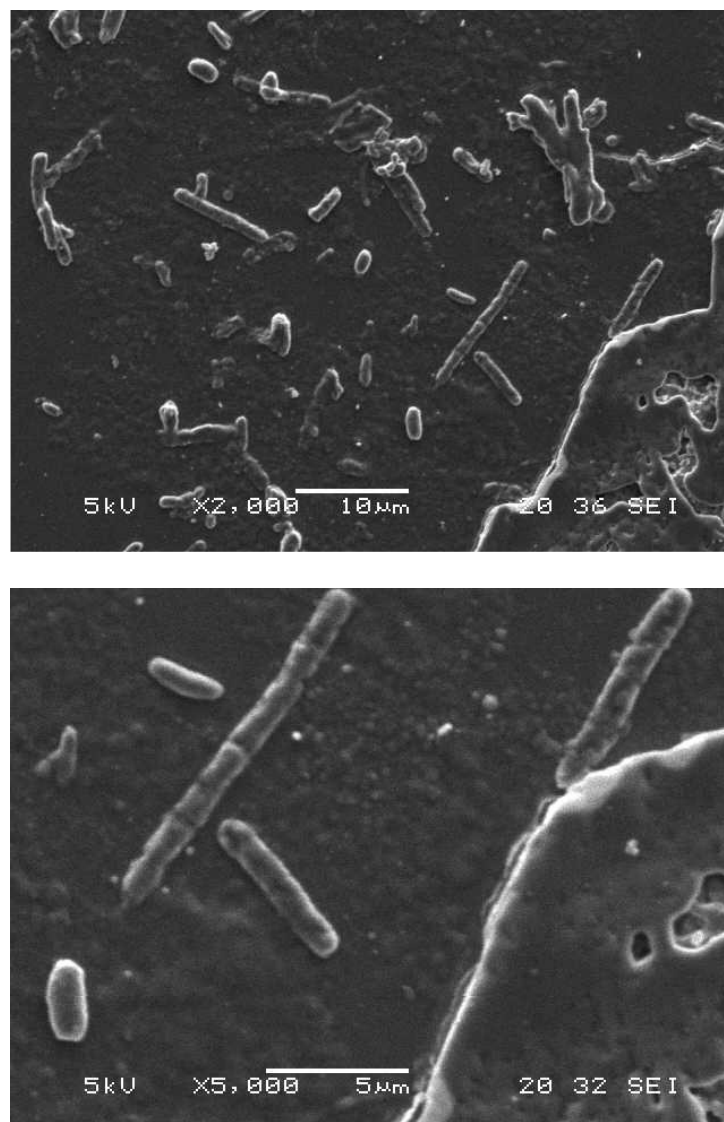


Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura das células bacterianas da cultura pura C1. Uma alíquota de 100 µL do inóculo da cultura isolada (C.1) foi fixada em lâminas e em seguida metalizadas com carbono.

5.3 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO E ANÁLISE DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO

Com propósito de conhecer a dinâmica de crescimento da cultura C.1 e da cultura mista C em diferentes pHs (5,5 e 7,0) e o potencial de redução de sulfato em pH moderadamente ácido, foi determinada às curvas de crescimento baseadas na leitura da densidade óptica ($D.O_{600nm}$) e a detecção da concentração sulfato ao longo do crescimento. As figuras 8 A e B, mostram a curva de crescimento e a redução de sulfato da cultura C.1, em pH 5,5 e 7,0. Pode-se observar um perfil equivalente frente à mudança de pH. A $D.O_{600nm}$ máxima de $0,44 \pm 0,01$ foi observado nos dois pHs. Após 10 dias de inoculação foram observadas células viáveis. Também se pode observar que o consumo de sulfato nas duas condições avaliadas foi de 50%. A taxa de redução de sulfato na fase exponencial de crescimento bacteriano nos ensaios em pH 5,5 e 7,0 foram $0,054g/L/h$ e $0,062g/l/h$, respectivamente.

As figuras 9 A e B ilustram a curva de crescimento e a redução de sulfato da cultura enriquecida C. O perfil da curva de crescimento desta cultura não apresentou mudanças nos pHs 5,5 e 7,0. A $D.O_{600nm}$ máxima de $0,44 \pm 0,01$ também foi observada nos dois pHs. O consumo de sulfato desta cultura foi maior que a cultura isolada C. O gráfico mostra que a redução de sulfato, para os dois pHs, foi de 60%. A taxa de redução de sulfato na fase exponencial de crescimento bacteriano da cultura enriquecida nos ensaios em pH 5,5 e 7,0 foram $0,062g/l/h$ e $0,024g/L/h$, respectivamente.

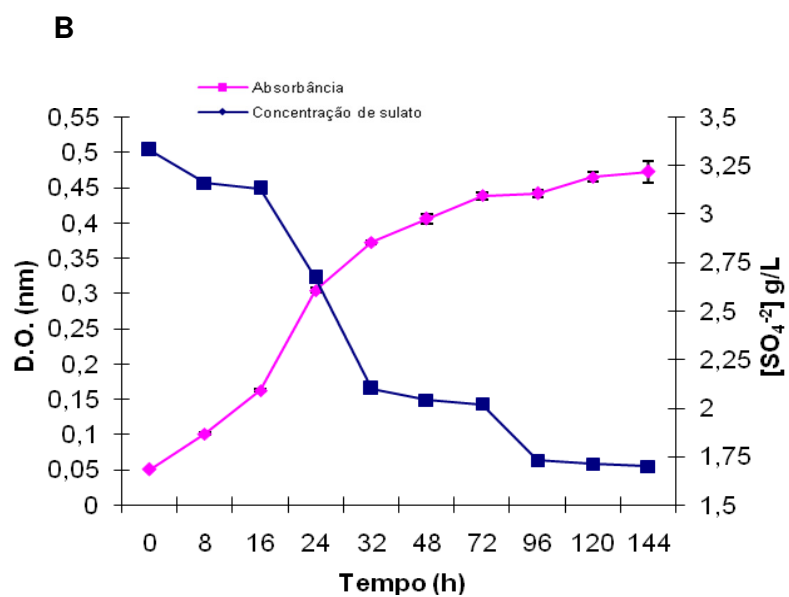
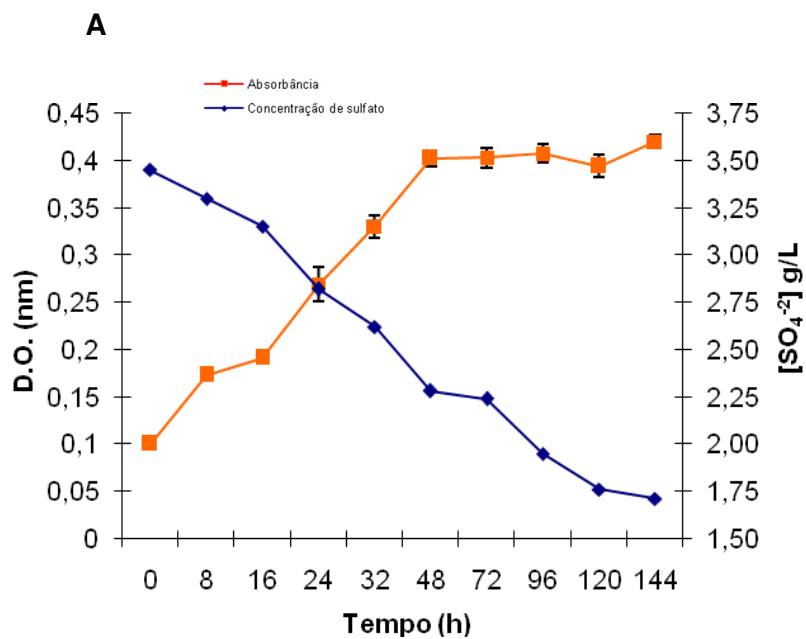


Figura 8 – Curva de crescimento e redução de sulfato da cultura isolada C.1 (A) pH 5,5 (B) pH7,0. Meio Postgate C modificado sem FeSO₄²⁻; inóculo 1% (v/v); temperatura 37°C, D.O. a 600nm.

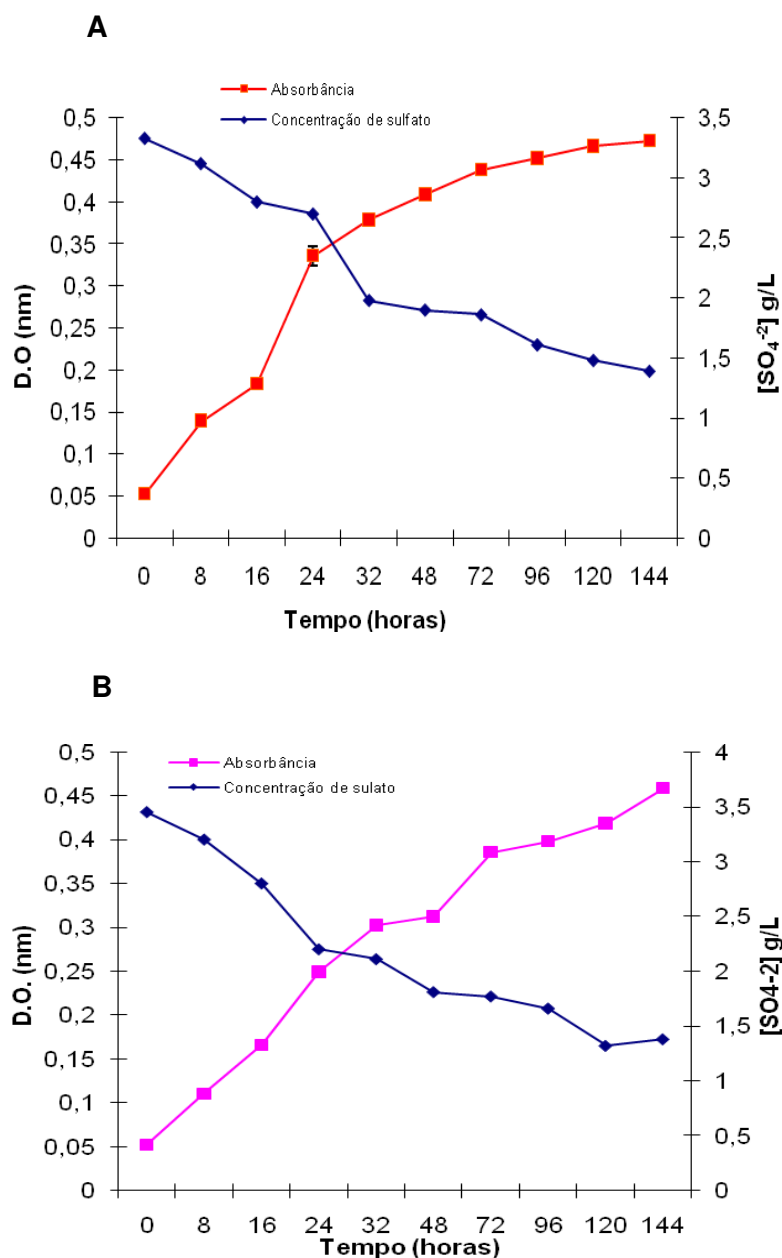


Figura 9 – Curva de crescimento e redução de sulfato da cultura enriquecida C (A) pH 5,5 (B) pH7,0. Meio Postgate C modificado sem FeSO₄⁻²; inóculo 1% (v/v); temperatura 37°C, D.O. a 600nm.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA CULTURA C.1

5.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Após a extração do DNA genômico das culturas *D. vulgaris* (controle positivo), C.a (cultura mista pH 4,5), C.b (cultura mista pH 5,5) e C.1 procedeu-se a análise da integridade do DNA em gel de agarose a 0,6%, como mostrado na figura 10. Pode-se notar que todas as preparações contêm DNA integro e livres de RNA.

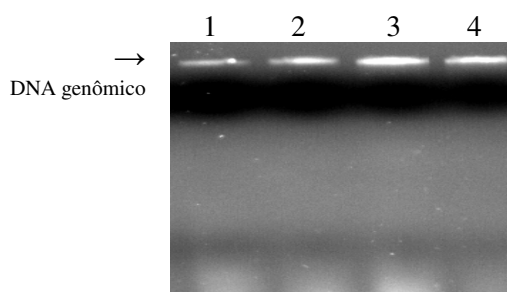


Figura 10 - Análise da integridade do DNA genômico. 1- Cultura referência: *D. vulgaris*; 2- Cultura mista pH 4,5; 3 - Cultura mista pH 5,5 e 4- Cultura isolada. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo.

5.4.2 PRODUTOS DE PCR

A amplificação dos genes de interesse nesse estudo, *dsrB* e *hyd*, foi realizada pela técnica de PCR. Para o fragmento do gene *dsrB*, mesmo após a amplificação em alta estringência ($T = 55^{\circ}\text{C}$), foram obtidas bandas inespecíficas com mais ou menos 250pb. Posteriormente, a banda de interesse, indicado pela seta (350 pb), foi purificada e clonada. A figura 11 mostra os produtos obtidos nesta reação.

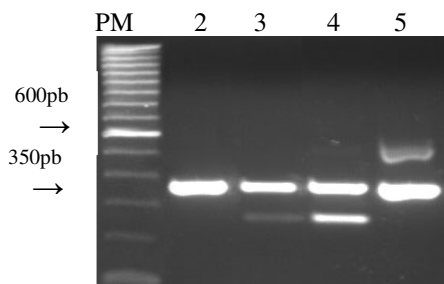


Figura 11 - Produto de PCR do primer *dsr* (sulfito redutase). PM- padrão de peso molecular 100pb; 1- *D. vulgaris*; 2- C.a (cultura mista pH 4,5); 3- C.b (cultura mista pH 5,5) e 4 - C.1 (cultura isolada). A seta indica a banda de interesse de 350 pb.

O produto de PCR gerado pela amplificação do DNA genômico referente ao fragmento gênico *hyd* está ilustrado na figura 12. Mesmo após a amplificação em alta estringência, após vários testes com diferentes temperaturas de anelamento, foram obtidas bandas inespecíficas com mais ou menos 500pb. Posteriormente a banda de interesse, indicado pela seta (450 pb), foi purificada e clonada.

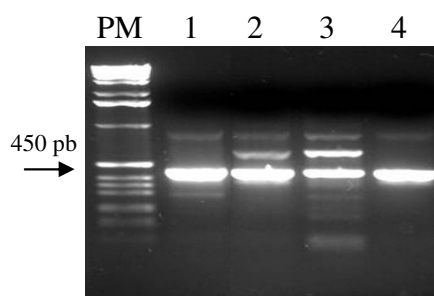


Figura 12: Produto de PCR do primer *hyd* (hidrogenase). PM- padrão de peso molecular; 1- *D. vulgaris*; 2- C.a (cultura mista pH 4,5); 3- C.b (cultura mista pH 5.5) e 4 - C.1 (cultura isolada).

5.4.3 PCR DE COLÔNIAS

Três colônias recombinantes foram obtidas da transformação bacteriana, conforme descrito em materiais e métodos. Para a confirmação da presença do inserto de interesse na colônia foi realizado o PCR de colônia. Os amplicons foram corados com brometo de etídeo e visualizados com auxílio de um transiluminador em UV, como mostrado na figura 13.

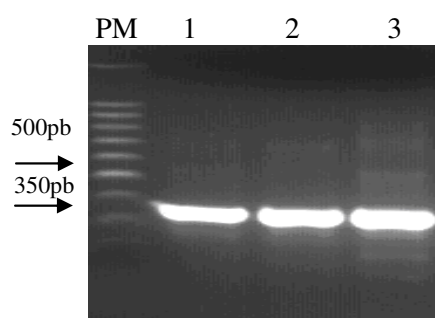


Figura 13 : Gel de agarose 1,2% ilustrando a análise da presença de fragmento de interesse por PCR de célula. PM – Padrão de peso molecular 100pb. 1-3 Clones provenientes da transformação bacteriana com amostra da cultura de BRS isolada.

5.4.4 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DOS CLONES

Após a confirmação da presença do inserto pelo PCR, três colônias independentes foram crescidas em meio LB suplementado com ampicilina. Em seguida, o DNA plasmidial (figura 14) dos clones foi extraído e purificado para posterior seqüenciamento.

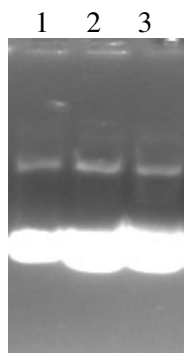


Figura 14 : Análise da mini-preparação plasmidial em gel de agarose a 0,8%. Cerca de 3 μ L da minipreparação foram analisados em gel de agarose e corado com brometo de etídeo.

5.4.5 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQÜÊNCIAS

A partir dos resultados do sequenciamento de três corridas independentes, foram obtidas as seqüências consensos como mostrado no apêndice item 1 figura 1.1. Entretanto o tamanho da seqüência consenso referente ao gene *hyd* não coincidiu com os produtos de PCR mostrados na figura 12. Com isso, esta seqüência não foi utilizada nos estudos de filogenia.

Após a obtenção da seqüência consenso do gene *dsrB*, esta foi depositada no banco de dados GenBank (NCBI-NIH, Bethesda, USA) com o seguinte número de acesso EU086051. Em seguida, foi realizado o alinhamento local com as seqüências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI-NIH, Bethesda, USA), utilizando o programa BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A seqüência *dsrB* da cultura C.1 apresentou identidades significativas com 3 espécies do gênero *Desulfovibrio*, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7– Análise da identidade das seqüências de nucleotídeo de *dsrB* com seus ortólogos.

Nº de acesso	Descrição	E-value	Identidade
<u>AB061538.1</u>	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	8e ⁻¹⁶⁰	93%
<u>AB061536.1</u>	<i>Desulfovibrio burkinensis</i>	8e ⁻¹⁶⁰	93%
<u>AY749039.1</u>	<i>Desulfovibrio aerotolerans</i>	2e ⁻¹⁵⁴	92%

O algoritmo BLASTN analisou a homologia da seqüência com as seqüências dos ortólogos depositadas no banco de dados. A identidade indica a porcentagem de resíduos idênticos observados na região de alinhamento. As seqüências indicadas pelo programa BLAST são consideradas estatisticamente significantes quando o e-value for $\leq e^{-5}$.

Para a identificação das prováveis regiões codificadoras da proteína DSR, foi utilizado o programa Artemis. Este programa é capaz de evidenciar a janela aberta de leitura referente à seqüência em estudo. O fragmento amplificado para o gene *dsrB* apresenta uma janela aberta de leitura localizada na posição +2, codificando 125 resíduos de aminoácidos. Esse fragmento faz parte de uma porção maior do gene em questão. Dos 125 aminoácidos preditos, 119 pertencem ao domínio conservado da proteína estudada (COG2221.2) (figura 15).

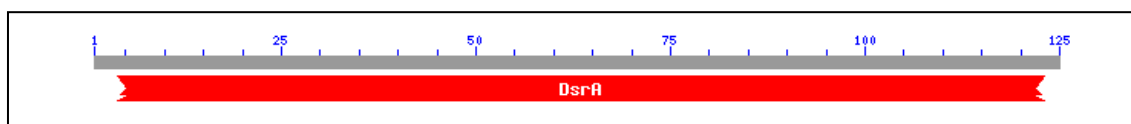


Figura 15 - Representação esquemática da localização dos domínios conservados. A – Representa os domínios para os genes *DsrA*- “Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridina), sub-unidades alpha e beta”.

A seqüência de aminoácidos predita foi alinhada com diferentes ortólogos, utilizando o programa CLUSTALX 2.0. O resultado do alinhamento mostrou que o fragmento cobre uma região conservada do gene *dsrB* (figura 16). Entretanto, comparando a seqüência da cultura C.1 com as seqüências dos ortólogos que apresentou maior similaridade (*D. fructosovorans*, *D. burkinensis* e *D. aerotolerans*) nota-se a ausência de um resíduo de histidina, na posição 4 e uma substituição de tirosina por

leucina na posição 124. A seguir, esta seqüência predita de aminoácidos foi submetida à busca de identidade/similaridade utilizando-se o algoritmo BLASTp e a base de dados disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov (tabela 8).

Tabela 8 – Análise das seqüências de aminoácido preditos do gene *dsrB* utilizando o programa BLASTp.

Nº de acesso	Descrição	E-value	Identidade
AB061538.1	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	5e ⁻⁶³	95%
AB061536.1	<i>Desulfovibrio burkinensis</i>	6e ⁻⁶³	95%
AY749039.1	<i>Desulfovibrio aerotolerans</i>	7e ⁻⁶²	94%

A identidade indica a porcentagem de resíduos idênticos observados na região de alinhamento. As seqüências indicadas pelo programa BLASTp são consideradas estatisticamente confiáveis quando o e-value for $\leq e^{-5}$.

A árvore filogenética foi construída pela método de distância, utilizando o algoritmo “Neighbor-Joining”. O software utilizado para a construção das árvores filogenéticas foi o Mega 4.0 (Figura 17). A relação filogenética da seqüência de nucleotídeos do gene *dsrB* com seus ortólogos mostrou que a seqüência C.1 formou um ramo independente do grupo monofilético constituído pelas espécies *D. fructosovorans*, *D. burkinensis* e *D. aerotolerans*.

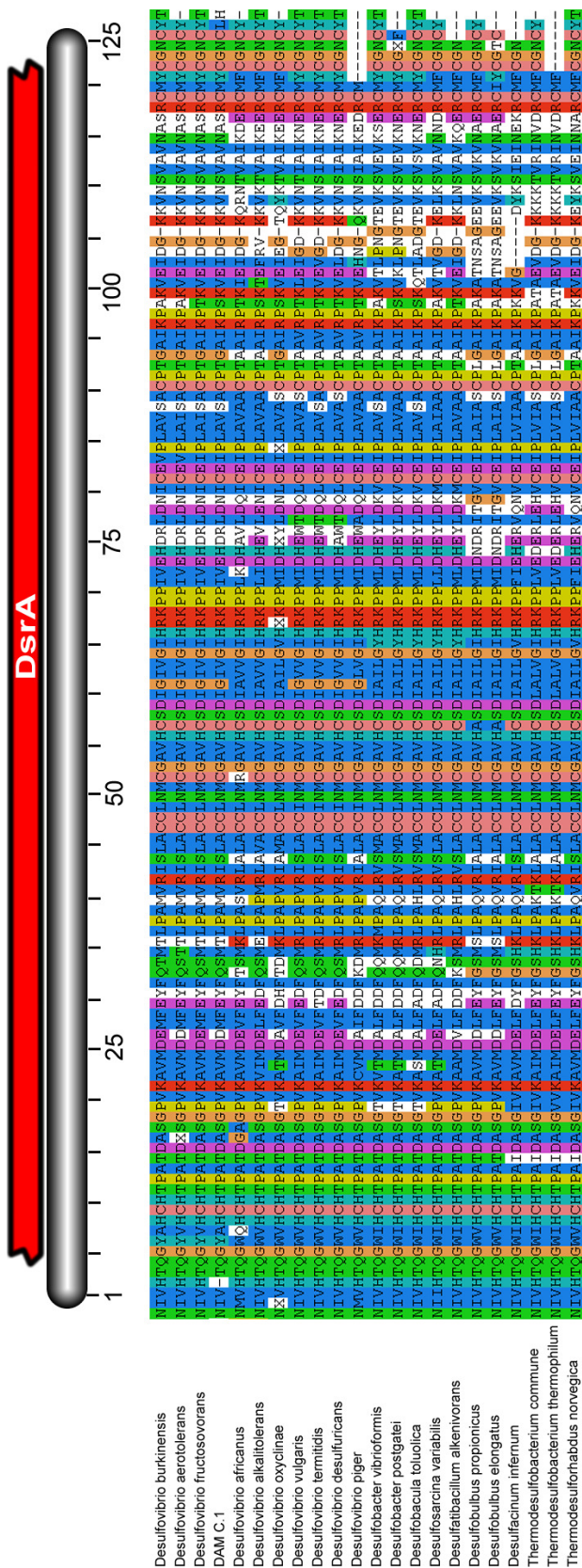


Figura 16 - Alinhamento da região predita de aminoácidos do *dsrA*B obtido da cultura C.1 com seus ortólogos. Os alinhamentos representam somente as regiões do domínio conservado da proteína DSR. O número de acesso dos ortólogos são *Desulfobacterium burkinensis* [|AB061536.1|](#), *Desulfobacterium aerotolerans* [|AY749039.1|](#), *Desulfobacterium fructosovorans* [|AB061538.1|](#), *Desulfobacterium alkalitolerans* [|AY864856.1|](#), *Desulfosarcina* sp. [|AF360646|](#), *Desulfobacterium africanus* [|AF271772.1|](#), *Desulfobacterium longus* [|AB061540.1|](#), *Desulfobacterium aespoensis* [|AF492838.1|](#), *Desulfobacterium aminophilus* [|AY626029.1|](#), *Desulfobacterium gabonensis* [|AY626027.1|](#), *Desulfobacterium gigas* [|DQU80961|](#), *Desulfobacterium simplex* [|AB061541.1|](#), *Desulfobacterium desulfuricans* [|DDE24977|](#), *Desulfomonas pigra* [|AB061534.1|](#), *Desulfobacterium termitidis* [|AB061542.1|](#), *Desulfonatronum lacustre* [|AF418189|](#), *Desulfosarcina baarsii* [|AF334600|](#), *Desulfotrustis glycolicus* [|AF482457.1|](#), *Desulfococcus infernus* [|AF482454.1|](#), *Thermodesulfobacterium thermophilum* [|AF334598.1|](#), *Thermodesulfobacterium commune* [|AF334596.1|](#) e *Thermodesulfobacterium norvegica* [|AJ277293.1|](#).

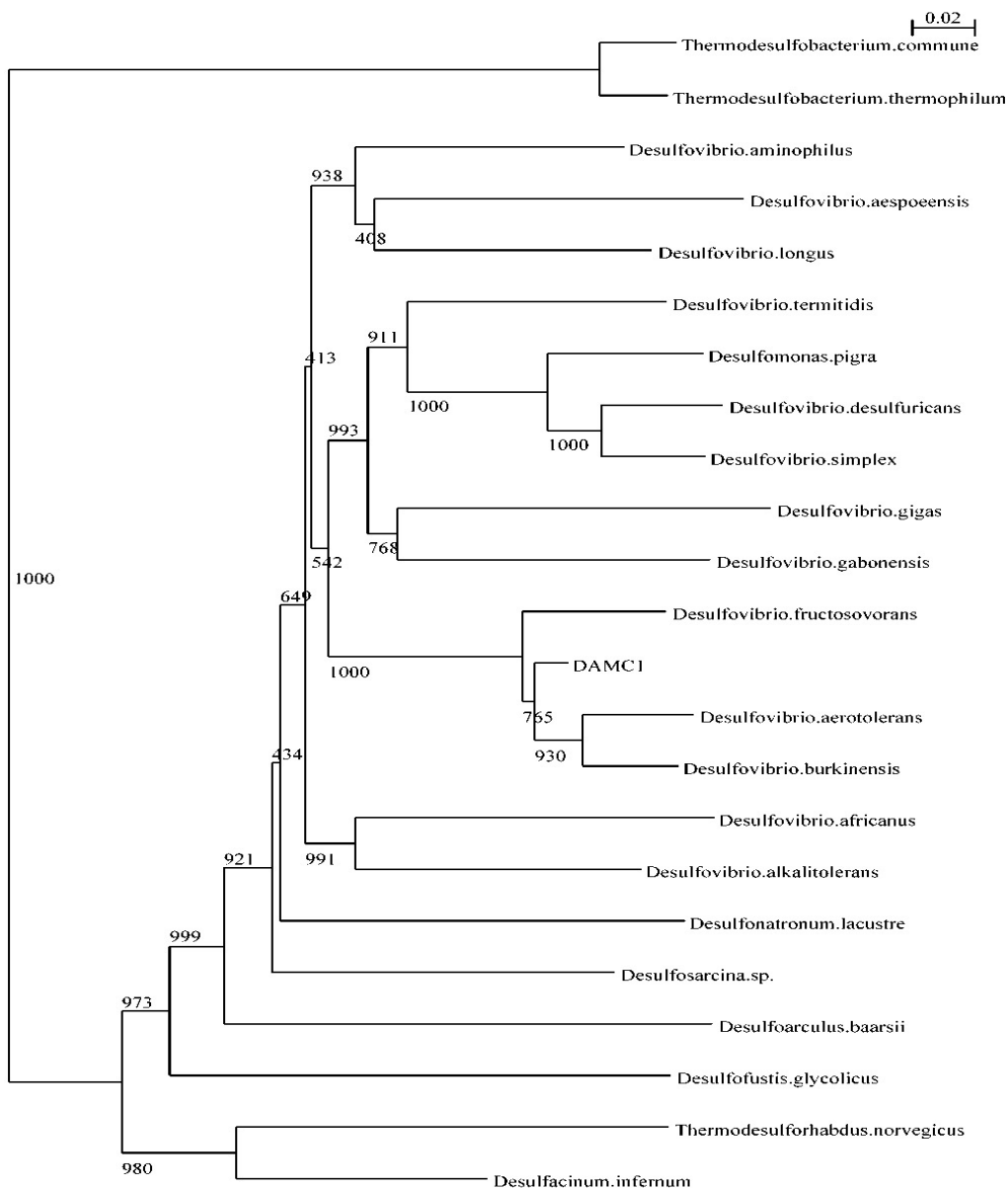


Figura 17 : Árvore filogenética baseada na seqüência de nucleotídeos do fragmento gênico *dsrAB* (376 pb) do isolado C.1. A barra indica que para 100 nucleotídeo 2 são substituídos. O número de acesso dos ortólogos são *Desulfovibrio burkinensis* [AB061536.1], *Desulfovibrio aerotolerans* [AY749039.1], *Desulfovibrio fructosovorans* [AB061538.1], *Desulfovibrio alkalitolerans* [AY864856.1], *Desulfosarcina* sp. [AF360646], *Desulfovibrio africanus* [AF271772.1], *Desulfovibrio longus* [AB061540.1], *Desulfovibrio aespoensis* [AF492838.1], *Desulfovibrio aminophilus* [AY626029.1], *Desulfovibrio gabonensis* [AY626027.1], *Desulfovibrio gigas* [DGU80961], *Desulfovibrio simplex* [AB061541.1], *Desulfovibrio desulfuricans* [DDE249777], *Desulfomonas pigra* [AB061534.1], *Desulfovibrio termitidis* [AB061542.1], *Desulfonatronum lacustre* [AF418189], *Desulfoarcu baarsii* [AF334600], *Desulfofustis glycolicus* [AF482457.1], *Desulfacinum infernum* [AF482454.1], *Thermodesulfobacterium thermophilum* [AF334598.1], *Thermodesulfobacterium commune* [AF334596.1] e *Thermodesulfobacterium norvegicus* [AJ277293.1].

5.4.6 EXTRAÇÃO DO RNA

Após a extração do RNA total da cultura C.1 crescida em pH 5,5 e 7,0, procedeu-se a análise da integridade do RNA em gel de agarose a 1%, como mostrado na figura 17. A concentração foi ajustada para um 1µg/µL para a realização dos experimento de análise da expressão.

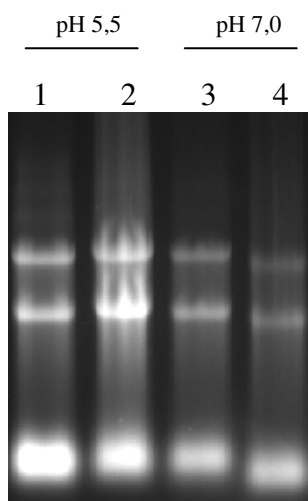


Figura 18 - Extração de RNA total da cultura C.1 em pH 5,5 e 7,0. Gel de agarose/formaldeído 1% contendo em cada canaleta aproximadamente 5 µg de RNA total. (1) 30 horas de crescimento em pH 5,5; (2) 100 horas de crescimento pH 5,5; (3) 30 horas de crescimento em pH 7,0 e (4) 100 horas de crescimento em pH 7,0.

5.4.7 RT-PCR (Reverse- Transcription Polymerase Chain Reaction)

O perfil da expressão do gene *dsrB* foi investigado em dois estágios de crescimento da cultura C.1 em meio Postgate C com pHs iniciais ajustados para pH 5,5 e 7,0. Como observado na figura 18, a expressão dos genes em questão foi equivalente nos dois pHs e nos diferentes tempo de crescimento, sugerindo que o pH 5,5 não afeta a transcrição deste gene.

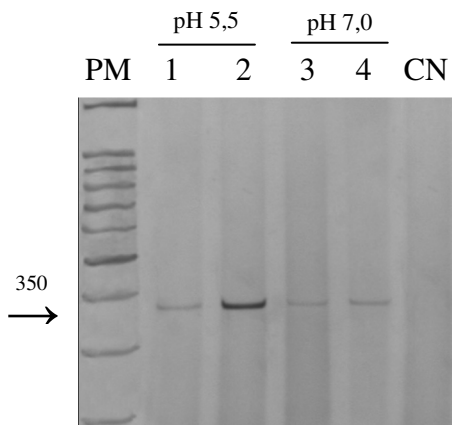


Figura 19 : Expressão do gene *dsrB*. Cerca de 10µL do produto de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida (10%) e corado com nitrato de prata. (PM) peso molecular; (1) 30 horas de crescimento em pH 5,5; (2) 100 horas de crescimento pH 5,5; (3) 30 horas de crescimento em pH 7,0 e (4) 100 horas de crescimento em pH 7,0. (CN) controle negativo. O fragmento de 350 nb está indicado nela seta.

6. Discussões

Um dos maiores problemas que afetam as empresas de mineração é a geração de DAM. A escolha de um tratamento para a remediação da DAM é ditada pelo custo econômico e pelo fator ambiental. Muitas vezes o verdadeiro valor ambiental de um processo de remediação não é imediatamente aparente, sendo somente observado após alguns anos de aplicação do método. Tradicionalmente, um grande volume de DAM tem sido tratado por processos químicos, chamado tratamento ativo, porém, o alto custo dos reagentes e o problema com a disposição do lodo gerado, ressalta a importância da utilização de tratamentos alternativos. Atualmente, as mineradoras têm demonstrado interesse pelo tratamento passivo utilizando BRS (Johnson e Hallberg, 2005).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de aprimorar as técnicas de redução de sulfato utilizando BRS em sistemas de bioreatores. Uma das questões a ser resolvida é a sensibilidade das BRS à acidez, o que dificulta o potencial na biotecnologia da remediação de efluentes ácidos, já que uma das características da DAM é a alta acidez (Kolmert e Johnson, 2001).

Estudos ecológicos voltados para sustentabilidade ambiental ainda são falhos. Ambientes extremos, como regiões ácidas, termófilas e áridas são considerados importantes “hot spots” da megadiversidade microbiana. Estas regiões são habitats de microrganismos adaptados a condições extremas (Ghauri *et al*, 2005).

Johnson (1995) relata que a diversidade microbiana de ambientes ácidos é alta, incluindo bactérias que catalisam a redução de ferro e enxofre, confirmando assim a importância do estudo dessa diversidade a partir do isolamento e caracterização de BRS desses ambientes. Entretanto, o potencial das BRS tem sido pouco estudado. Considerando estes aspectos entende-se que o uso de ambientes extremos para isolar microrganismos adaptados poderá evidenciar novas espécies para o uso sustentáveis em processos biotecnológicos. Diante disso um dos objetivos deste trabalho foi selecionar e isolar BRS de DAM e correlacionar o seu potencial de redução de sulfato em diferentes valores de pHs. Este tipo de análise também permitirá comparar a atuação de microrganismos isolados ou em consórcio em processos de bioremediação.

Na literatura vários trabalhos descrevem a ocorrência de redução de sulfato a sulfeto por BRS em ambientes acidófilos. Tem-se tentado o isolamento de BRS acidófilas, porém o que se observa é o uso inadequado da matéria orgânica para o

crescimento de BRS como, por exemplo, ácido orgânico lactato, o qual nesta condição existe predominantemente na forma de ácido lipofílico não dissociável (Johnson, 1998).

Grandes avanços foram obtidos com crescimento de BRS em pH ácido utilizando substratos não iônicos tais como glicerol, etanol e metanol (Johnson, 1998). Isto foi comprovado pelo presente trabalho, pois, na tentativa de crescer BRS em pH 4,3, tendo o lactato como fonte de carbono, não se obteve resultados satisfatórios. Entretanto, quando se substituiu o lactato por etanol, foi possível observar formação de precipitado preto (FeS) durante o crescimento da cultura enriquecida C e da cultura pura C.1 em pH 4,5. Contudo, não foi possível avaliar a redução de sulfato e a curva de crescimento, neste pH. Isto ocorreu devido ao crescimento lento e inconstante destas culturas. Em pH 4,5, as culturas C e C.1 apresentaram o precipitado preto (FeS) somente depois de 3 a 4 semana de incubação, sendo então inviável o encaminhamento dos estudos neste pH pelas condições propostas pelo trabalho. Por este motivo foi realizado o teste da redução de sulfato e da curva de crescimento em pH 5,5 e 7,0.

Em 1965, Postgate avaliando o crescimento de espécies de *Desulfovibrio*, ele detectou um problema prático na determinação da taxa de crescimento. A presença de ferro no meio de cultura dificulta a leitura da densidade óptica por espectrofotometria. Este problema foi observado neste trabalho. Quando o experimento era realizado em meio Postgate C com ferro não era possível realizar a leitura em espectrofotômetro devido ao precipitado preto (FeS). A contagem de bactéria em câmara de Neubauer também era dificultada, pois o precipitado de FeS aglomeravam-se nas células dificultando a contagem em microscópio óptico, por isso, viu-se a necessidade de retirar o ferro do meio de cultura.

A cultura C.1 mostrou uma taxa de crescimento semelhante para os dois valores de pHs. Este resultado divergiu com os valores apresentados pela literatura, pois a maioria dos estudos descrevem pH ótimo de crescimento de BRS entorno de 7,0 (Leu et al., 1999). A redução de sulfato seguiu o comportamento do crescimento bacteriano, a qual foi similar nos dois pHs iniciais (5,5 e 7,0). Como mostrado na figura 8, após 144 horas de crescimento, a porcentagem de redução de sulfato foi de 50%, sugerindo também que o pH inicial 5,5 não altera a redução de sulfato, isto corroborando a hipótese de que o metabolismo da cultura C.1 não é afetado com o aumento do potencial hidrogeniônico.

Existem poucos trabalhos na literatura, que descrevem o uso de culturas puras na redução de sulfato, principalmente em sistema de batelada. Medírcio *et al.* (2007) relatam uma redução de sulfato de 26% na presença de manganês enquanto que Cabrera *et al.* (2006) descreveram uma cepa de *D. vulgaris* com potencial de 40% de redução de sulfato. Entretanto, estas taxas de redução foram obtidas em pH 7.0, o qual está dentro da faixa ótima de pH para o crescimento de BRS. A literatura não relata culturas puras de BRS com uma capacidade significativa de reduzir sulfato em pHs moderadamente ácidos como foi descrito por este trabalho. Com isso, estes resultados abrem uma perspectiva para o uso de DAM como fonte para isolar microrganismos que sobrevivem em condições de pH extremos.

Também foi estudo, a eficiência da redução de sulfato da cultura enriquecida C.1. Apesar de até o momento não se conhecer totalmente a composição da população de microrganismo desta cultura, estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o seu potencial de redução de sulfato em condições moderadamente ácidas. As figuras 9 A e B mostram que o aumento do pH inicial não afetou nem o crescimento e a redução de sulfato. Taxas significativas de redução foram obtidas no crescimento da cultura C em meio Postgate C (~60%). Estes resultados em conjunto mostram que não houve diferenças expressivas no consumo de sulfato quando se comparou uma cultura pura de uma aparentemente em consórcio, que neste caso a cultura pura tem um grande potencial para ser utilizada em reatores no tratamento de DAM.

Muitos estudos têm relatado o uso de consórcios de BRS em reatores contínuos na bioremediação de DAM, entretanto não é relatado taxa tão altas de redução de sulfato como as detectadas utilizando uma cultura pura como descrito neste trabalho. Vários grupos independentes mostraram que BRS acidófilas presentes em bioreatores são capazes de reduzir sulfato e gerar alcalinidade de efluentes com pH 3 (Johnson, 1995 e Kolmer e Johnson, 2001, Johnson *et al.*, 2006). Elliott *et al.* (1998) operaram um bioreator contínuo, utilizando BRS, em condições ditas não apropriadas para a redução de sulfato, os valores de pHs de entrada eram 4,5; 4,0; 3,5 e 3,25. Em pH 3,25 o sistema removeu 38,3% de sulfato e aumentou o pH do meio para 5,82. Em pH 3,5, a produção de sulfeto não foi detectada e 14,4% do sulfato foi removido. Isto é explicado porque nestes consórcios possivelmente existem bactérias com capacidade fermentativa e acetogênicas. Com isso ocorre uma combinação da atividade metabólica entre as

bactérias, pois os produtos metabólicos de certas BRS aceleram o metabolismo de outras (Dwyer *et al.*, 1988). Esses tipos de consórcios sintróficos de microrganismos redutores de sulfato acetogênicos e fermentativos têm um papel importante na bioremediação de DAM (Iegen e Harrison, 2006). Entretanto, são raros os trabalhos que mostram bons resultados de bioremediação utilizando culturas isoladas.

Para amenizar o problema da acidez no uso das BRS no tratamento de drenagem ácida, muitos trabalhos de engenharia têm proposto técnicas alternativas na utilização de reatores contínuos. Kaksonen *et al.* (2003) trataram DAM (pH 2,5-5,0, 1,0-2,2g/L de sulfato) em reator contínuo. A técnica utilizada pelos autores foi à recirculação do efluente do reator, o qual tem o valor de pH próximo de 7,0. A mistura do efluente com a água ácida, aumenta o valor de pH antes de entrar no reator. Outra técnica foi desenvolvida por Tsukamoto *et al.* (2004), eles adaptaram BRS com o acréscimo contínuo de acidez em colunas. Os autores observaram que o aumento do pH afetava a eficiência das BRS, e uma fonte alcalina era necessária para que a redução de sulfato fosse eficiente. A partir destes trabalhos pode-se observar que independente do tipo de reator usado para a redução de sulfato, a DAM deve ser previamente neutralizada para que a atividade das BRS não seja afetada.

Uma das grandes contribuições deste trabalho foi o isolamento de uma cultura de BRS capaz de reduzir 50% de sulfato em pH 5,5, o que abre uma perspectivas para próximos trabalhos no sentido de testar o uso desta BRS para o tratamento de DAM, sem uma etapa prévia de neutralização. Além disso, os resultados do presente trabalho reforçam que a microbiologia de DAM deve ser estudada com detalhes já que BRS capazes de crescer em pHs ácidos podem ser isoladas e identificadas desses ambientes.

Durante muitos anos, a abundancia e a diversidade de BRS foram baseadas em técnicas tradicionais de microbiologia e hibridização com oligonucleotídeos iniciadores específicos para rRNA. Outra técnica comumente utilizada foi a análise da seqüência do rRNA 16S, como critério de definição de diferentes níveis de táxons. Porém a seqüência do rRNA 16S não informa sobre a diferença dos potenciais fisiológicos entre BRS (Chang *et al.*, 2001).

O estudo do perfil da comunidade de BRS baseada nos genes *dsrAB* permite um maior conhecimento da atividade metabólica desses microrganismos. Estudos recentes de diversidade de população de BRS por clonagem e sequenciamento de genes

específicos do metabolismo desses microrganismos, como sulfito redutase dissimilatório (*dsrAB*), demonstraram ser eficiente na identificação e na estimativa da diversidade de BRS no ecossistema (Geets *et al.*, 2005). Com isso, o presente trabalho estudou uma alternativa para a identificação de BRS de amostras região de DAM, tendo como marcadores moleculares os genes *dsrAB* e o *hyd*. Com o propósito de amplificar o fragmento gênico *dsrAB*, foi utilizado oligonucleotídeos iniciadores propostos por Geets *et al.*, 2005 e para o gene *hyd*, como descrito por Wawer e Muyer, 1995.

A literatura tem validado o uso do oligonucleotídeos iniciadores DSR1F/DSR4R, que amplificam 1.9-kb do fragmento gênico *dsrAB* para o estudo da identificação BRS (Wagner *et al.*, 1998). Trabalhos subsequentes têm-se baseado na análise do fragmento gênico de 350pb da subunidade β do gene *dsr* (Dhillon *et al.*, 2003 e Dar *et al.*, 2007). Estudos demonstraram uma topologia congruente entre as árvores filogenéticas do gene *dsrAB* (1.9-kb) e o fragmento gênico *dsrB* (350pb) (Pérez-Jimenez *et al.*, 2001, Geets *et al.*, 2005), outros estudos indicam que seqüências pequenas do gene *dsr* podem ser utilizadas com sucesso na análise filogenética de BRS. Porém, Dar *et al.* 2007, relatam que seqüências pequenas não podem ser utilizadas para traçar a história evolutiva de BRS, com isso o uso de pequenas seqüências de fragmento gênico é mais apropriado para a identificação de BRS em amostras ambientais.

Apesar do fragmento genômico correspondente ao gene *hyd* ter sido clonado e seqüenciado, tanto a seqüência de nucleotídeos com a proteína predita não foram utilizados neste trabalho, uma vez que as análises iniciais mostraram que este gene é polimórfico e que a utilização de um fragmento não iria gerar dados confiáveis. Novos experimentos estão sendo realizados para clonar à janela de leitura completa o que certamente evidenciará aspectos interessantes deste gene que pode está relacionado com o seu metabolismo de sulfato em pH moderadamente ácido.

O resultado do BLASTN mostrou alta similaridade com as espécies do gênero *Desulfovibrio*. As espécies que apresentaram maior similaridade foram *D. fructosovorans* ([AB061538.1](#)) e *D. burkinensis* ([AB061536.1](#)) com identidade semelhantes 93% e *D. aerotolerans* ([AY749039.1](#)) com 92% de identidade. O alinhamento da seqüência de aminoácidos preditos com os ortólogos, mostrado na figura 16, mostrou que o gene *dsrB* da cultura C.1 também apresenta uma região conservada para o domínio desta enzima. Entretanto, comparando a seqüência da

cultura C.1 com as seqüências dos ortólogos que apresentou maior similaridade, nota-se uma ausência de um histidina, na posição 4 e uma substituição de tirosina por leucina na posição 124, isto sugerindo que esta seqüência apresenta duas regiões polimórficas. A importância destas diferenças na cinética desta enzima será futuramente analisada.

Para inferir a relação filogenética da cultura C.1 com seus ortólogos, foi utilizado a seqüência de nucleotídeos do gene *dsrB*, para minimizar o efeito “bias”. Estas análises estão apresentadas na figura 17. A cultura C.1 formou um ramo independente dentro do grupo monofilético composto pelas espécies *D. fructosovorans*, *D. burkinensis* e *D. aerotolerans*, sugerindo fortemente que estas espécies apesar da proximidade evolutiva são distintas. Além disso, a pontuação de confiabilidade deste ramo sugere que a cultura C.1 é uma nova espécie de *Desulfovibrio*.

Durante a realização das análises filogenéticas ficou claro a semelhança entre a cultura C.1 e *D. fructosovorans*. Para confirmar a hipótese de que C.1 não é desta espécie, foram comparadas as características morfológicas e fisiológicas descritas para a espécie *D. fructosovorans*. Ollivier *et al.* (1988) identificou pela primeira vez esta espécie do sedimento de estuário, mostrando que além de degradar a frutose apresenta motilidade pela presença de um flagelo simples polar. Por estas características serem distintas das outras espécies de *Desulfovibrio*, esta foi denominada *D. fructosovorans*.

O resultado de MEV obtido da cultura C.1 (figura 7), mostra a ausência de flagelo, corroborando que são espécies distintas. Também foram realizados testes com o isolado C.1, em meio Postgate C tendo a frutose como fonte de carbono. Estes resultados revelaram taxas de crescimento insatisfatórias (resultados não mostrados).

Trabalhos recentes na literatura têm descrito que a estrutura da população é modificada depois da produção de sulfeto pelos microrganismos. Iegen e Harrison (2006-a) demonstraram que durante tratamento anaeróbio com água contendo altas concentrações de sulfato, as BRS competem entre si pela disponibilidade do substrato. O resultado dessa competição entre as BRS depende exclusivamente das condições ambientais impostas pelas bactérias. As condições mais importantes que determinam o domínio de grupos BRS durante o processo de redução de sulfato, são os valores de pH e a concentração de sulfeto no meio.

Em seus estudos, Iegen e Harrison (2006-b), demonstraram que os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio* são mais competitivos na presença de

sulfetos. Isso indica que esses gêneros têm alta tolerância a sulfeto comparado com outros grupos de BRS, cujas atividades são inibidas na presença do mesmo. Esses resultados vão de encontro com os resultados obtidos neste trabalho, já que com as análises de biologia molecular depois de sucessivos enriquecimentos e o posterior isolamento de BRS foi possível identificar uma espécie *Desulfovibrio*, o que demonstra que esse gênero prevalece na cultura enriquecida.

DsrAB é uma enzima chave na redução dissimilatória de sulfato e ocorre em todas as BRS. Esta enzima é importante no metabolismo destas bactérias já que ela cataliza a redução de sulfito para sulfeto com a transferência de seis elétrons (Zverlov 2005, Dar *et al.* 2007). O perfil da expressão do gene *dsrB* foi investigado em pH inicial de crescimento ajustado para 5,5 e 7,0, com o propósito de determinar a atividade metabólica da cultura C.1 nestes pHs. Os resultados mostram (figura 19) que nos dois pHs e nos dois tempos de crescimento a expressão é equivalente. Esta investigação é essencial para o monitoramento da atividade metabólica das BRS em processos de bioremediação.

Devido ao grande potencial do isolado C.1 para a bioremediação de DAM, uma série de experimentos deverão ser realizados para estabilizar um meio de cultura ideal para potencializar a redução de sulfato e sua aplicação biotecnológica envolvendo reatores anaeróbios.

7. Conclusões

Os principais resultados obtidos neste trabalho foram:

- Isolamento de uma cultura de BRS a partir de sedimentos de DAM. Esta cultura mostrou capacidade crescimento nos pH 5,5 e 7,0;
- Análises de MEV e Gram mostraram que a cultura isolada apresenta forma celular de bastonetes e Gram negativa;
- A cultura isolada apresenta a capacidade de reduzir sulfato em quantidades equivalentes nos dois pHs avaliados;
- Utilizando ferramenta de biologia molecular foi possível identificá-la como pertencente uma nova espécie do gênero *Desulfovibrio*;
- O perfil da expressão do gene *dsrB* analisado por RT-PCR sugere que o crescimento em pH 5,5 e 7,0 não afeta a expressão deste gene.

A partir dos resultados apresentados pode-se concluir de amostras de sedimento de DAM foi isolada uma nova espécie de *Desulfovibrio* com uma expressiva capacidade de redução de sulfato em condições moderadamente ácida. Isto traz novas possibilidades para o tratamento de DAM, já que as águas ácidas podem ser processadas sem uma etapa previa de neutralização.

8. Perspectivas

- Estabelecer um meio de cultura ideal para maximizar a capacidade do isolado C.1 de reduzir sulfato visando à implementação em reatores contínuos.
- Clonagem, sequenciamento e expressão em sistema heterólogo dos genes *dsrAB* e *hyd*.
- Caracterizar o(s) plasmídeo(s) presentes na cultura C.1.

9. Referências Bibliográficas

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. E. e Walter, P. (2004). *Biologia Molecular da Célula*. Artmed, 4ª ed., Porto Alegre.
- Baron, E; Peterson, L R. e Finnegold, S. M. (1994). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 9ª ed, p. 69-70, Estados Unidos da América.
- Cabrera, G.; Pérez, R.; Gómez, J. M.; Ábalos, A.; Cantero, D. (2006) Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *J Hazard Mater*, v. 135, p. 40-46.
- Castro, H. F.; Willians, N. H. e Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 31, p. 1-9.
- Castro, H. F. (2003). Microbial ecology of anaerobic terminal carbon mineralization in Everglades soils, with emphasis on sulfate-reducing prokaryotic assemblages. Florida.
- Carepo, M; Baptita, J. F.; Pamplona, A, Frauque, G; Moura, J.J.G. e Reis, M.A.M. (2002). Hydrogen metabolism in *Desulfovibrio desulfuricans* strain New Jersey (NCIMB 8313) – comparative study with *D. vulgaris* e *D. gigas* espécies. *Anaerobe*, v. 8, p. 325-332.
- Chang, Y.; Peacock, A. D.; Long, P. E.; Stephen, J. R.; Mckinley; J. P.; Macnaughton, S. J.; Hussain, A. K. M. A.; Saxton, A. M. e White, D. C. (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 7, p. 3149-3160.
- Cheng, K. H. e Gu, J. D. (2003) Reduction of chromate (CrO_2^-) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*, v.52, p. 1523-1529.
- Costa, P.I. (1997). Estudo da expressão de um gene codificado para o maior precursor proteico do envoltório do ovo do trematoda *Schistosoma mansoni*. Trabalho apresentado ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção de Título de Doutorado em Bioquímica, p.45-46.
- Dar, S. A.; Kuenen, J. G. e Muyzer G. (2005). Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol.*, v.71, p.2325-2330.
- Dar, S. A.; Yao, L.; Dongen, U. , Kuenen, G e Muyzer, G. (2007). Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* gene as molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 2, p.594-604.

- Devereux, R.; Delaney, M.; Widdel, F e Stahl, D. (1989). Natural relationships among Sulfate-Reducing Eubacteria. *Journal Bacteriology*, v. 171, p. 6689-6695.
- Dhillon, A.; Teske, A.; Dillon, J. Stahl, D.A. e Sogin, M. (2003). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 2765-2772.
- Dinh, H. T.; Kuever, J.; Mußmann, M., Hassel, A. W.; Stratmann M. e Widdel, F (2004). Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature*, v.427, p. 829-832.
- Durbin, R; Eddy, S.; Krogh, A. e Mitchison, G. (1998). *Biological sequence analysis*. Cambridge.
- Dwyer, D.F.; Weeg-Aerssens, E.; Shelton, D.R.; Tiedje, J.M. (1988). Bioenergetic Conditions of Butyrate Metabolism by a Syntrophic, Anaerobic Bacterium in Coculture with Hydrogen-Oxidizing Methanogenic and Sulfidogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* v 54, p. 1354-1359.
- Elliott, P.; Ragusa, S. e Catcheside, D. (1998). Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Wat. Res.*, v. 32, p. 3724-3730.
- Fareleira, P.; Santos, B.S; António, C.; Ferreira, P.M e Legall, J. (2003). Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio giga*. *Microbiology*, v. 149, p.1513-1522.
- Frederiksen, T.M. e Finster, K. (2003). Sulfite-oxido-reductase is involved in the oxidation of sulfite in *Desulfocapsa sulfoexigens* during disproportionation of thiosulfate and elemente sulfur. *Biodegradation*, v. 14, p. 189-1198.
- Gall, J.L. e Xavier, A, (1996). Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe*, v. 2, p. 1-9.
- Geets, J; Vangronsveld, J.; Borremans, B.; Van Der Lelie, D., Diels, L. e Vanbroekhoven, K. (2005). Application of PCR-DGGE targeting the dissimilatory sulfite reductase gene to detect sulfate-reducing bacteria during in situ immobilization of heavy metals, proceedings of 16th International Biohydrometallurgy Symposium, p. 853-859.
- Holmer, M. e Storkholm, P. (2001). Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. *Freshwater Biology*, v. 46, p. 431-451.
- Iegen, B. e Harrison, S (2006a). Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate. *Microbiology*. v. 157, p. 922-927.

- Iegen, B. & Harrison, S (2006b). Exposure to sulfite causes populations shifts in sulfate-reducing bacteria consortia. Research in Microbiology. In Press.
- Johnson, D. B. (1995). Acidophilic microbial communities: candidates for bioremediation of acidic mine effluents. International biodeterioration & biodegradation. p. 41-58.
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiology ecology, v. 27, p. 307-317.
- Johnson, D. B & Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. Science of the total environment. v. 338. p. 3-14.
- Johnson, D. B.; Sen, A. M.; Kimura, S.; Rowe, O. F. e Hallberg K. B. (2006). Novel biosulfidogenic system for selective recovery of metal from acidic leach liquors and streams. Mineral processing and extractive metallurgy. v. 115., n.1. p. 19-24.
- Kaksonen, A.H.; Franzmann, P.D. e Purakka, J.A. (2003). Performance and ethanol oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. Biodegradation, v.14, p. 207-217.
- Kaksonen, A. (2004). The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed reactors treating acidic metal – and sulfate – containing wastewater. Tesis for the degree of Doctor of Technology, Tampere University of Technology, publication 489.
- Kappler, U. e Dahl, C. (2001). Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation. FEMS Microbiol. Lett, v 203, p. 1-9.
- Kolmert, A. e Jonhson, D. B. (2001). Remedition of acidic waste water using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 76, p. 836-843.
- Koschorreck, M., Wendt – Potthoff, K. e Geller, W. (2003). Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina, Environmental Science & Techonology, v. 37, p. 1159-1162.
- Lapakko, K.A, W.W. White li e R.L. Cox. (1999). “The environmental geochemistry of mineral deposits, part A: Theory and background”, G. S. Plumlee and M. Logsdon (editors), Society of economic Geologists Reviews in economic Geology, v. 7A, p. 325-338.
- Leloup, J.; Quillet, L.; Berthe, T. & Petit, F. (2006). Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. FEMS Microbiology Ecology, v. 55, p. 230-238.

- Leu, J.-Y.; MCGovern-Traa, C.P.; Porter, A.J.R. e Hamilton, W.A. (1999). The same species of sulphate-reducing *Desulfomicrobium* occur in different oil field environments in the North Sea. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p. 246-252.
- Luptakova, A. e Kusnierova, M., 200. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SR. *Hydrometallurgy*, v. 77, p. 97-102.
- Madigan, T.M.; Martinko, J.M.; Parker, J. (1997). *Brock Biology of microorganisms*, 18^a ed. Estados Unidos da América.
- Malki, S.; De Luca, G.; Fardeau, M. L.; Rousset, M; Belaich, J. P. e Dermoun, Z. (1997). Physiological characteristics and growth behavior of single and double hydrogenase mutants of *Desulfovibrio fructosovorans*. *Arch. Microbiol.*, v. 167, p. 38-45.
- Matias, P.M.; Pereira, I.A.; Soares, C.M.; Carrondo, M.A. (2005) Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Prog Biophys Mol Biol*, v 89, p.292-329.
- Maniatis, T; Fritsch, E. F. e Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2^a ed. Livro 1, p. 35-31, Nova York.
- Melo, I.S. E Azevedo, J.L. (1997) – *Microbiologia ambiental Jaguariúna: Embrapa-CNPMA*.
- Medircio, S. N.; Leão, V. A.; Teixeira, M. C. (2007) Specific growth rate of sulfate reducing bacteria in the presence of manganese and cadmium. *J Hazard Mater*, v.143, p.593-596
- Ollivier B.; Cord-Ruwisch R.; Hatchikian E. C. e Garcia J. L. (1988). Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov.. *Arch. Microbiology*. v.149. p. 447-450.
- Peck, H.J. e Legall, J. 1982. Biochemistry of dissimilatory sulphate reduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, v. 298, p.443-466.
- Pérez-Jiménez, J.R.; Young, L.Y. e Kerkhof, L.J. (2001). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia ad pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsr* AB) genes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 35, p. 145-150.
- Postgate, J. R. (1965). Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological review*, v. 29, n.4, p. 425-441.

- Sass, H.; Cypionka, H e Babenzien, H-D. (1997). Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin, FEMS Microbiology Ecology, v. 22, p. 245-255.
- Silva, S.Q. (2004). Activity and diversity of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in contrasting sediments from the River Colne estuary. Tesis for the degree of Doctor of Philosophy, department of Biological Sciences, University of Essex, London.
- Silver, M. (1985). Analytical techniques for research on the abatement of bacterial acid generation in pyritic tailing, Canmet Report 86-3E, Minerals Research Program, Mineral sciences Laboratories, Ottawa.
- Rutherford, K.; Parkhill ,J.; Crook ,J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream ,M. A. e Barrell, B. (2000) Bioinformatics v16, p. 944-5.
- Tanaka, Y.; Sogabe, M.; Okumura, K. e Kurane, R. (2002). A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil, Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology, v. 35, p 242-246.
- Tauts, D. e Renz, M. (1983). Na optimized free-squeeze method for recovery o DNA fragments from agarose gels. Anal. Biochem., v. 48., p. 671-681.
- Thapper, A.; Rivas, M.G.; Brondino, C.D.; Ollivier, B.; Fauque, G.; Moura, I.; Moura, J.J. (2006) Biochemical and spectroscopic characterization of an aldehyde oxidoreductase isolated from *Desulfovibrio aminophilus*. J Inorg Biochem,v.100, p. 44-50.
- Thompson , J. D. ; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, v.25, p.4876-4882.
- Tsukamoto, T. K.; Killion, H. A.; Miller, G. C. (2004) Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. Wat. Res., v. 38, p.1405-1418.
- Voordouw, G. (1995). The genus *Desulfobibrio*: The centennial. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, pp. 2813-2819
- Yaful, E.K.; Mycroft, J., Pratt, A. R. e St-Araud, L. C. (1997). Factors controlling metal leaching from mine rock: The case of Stratmat and Selbaie waste rocks, Proceedings from the Fourth International Conference on Acid Rock Drainage, Vancouver, v. II, p. 665-679.
- Wagner, M.; Roger, A. J.; Brusseau, G. A. e Stahl, D. A. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulfite reductase supports an early origin of sulfate respiration. Journal of Bacteriology, v.180, p. 2975-2982.

- Wawer, C e Muyzer, G. (1995). Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of {NiFe} hydrogenase gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 2203-2210.
- Wawer, C; Jetten, M. S. M. e Muyzer, G. (1997). Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase large-subunit gene of *Desulfovibrio* spp. In environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p. 4360-4369.
- Webb, J. S. e Lappin-Scott, A.M. (1998). Metal removal by sulphate-reducing bacteria from natural and constructed wetlands, *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, p. 240-248.
- Widdel, F. e Pfennig, N. (1981). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiology*, v. 129, p. 395-400.
- Zverlov, V.; Klein, M.; Lücker, S.; Friedrich, M. W.; Kellermann, J.; David, A. S.; Loy, A e Wagner, M. (2005). Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n.6, p.2203-2208.

10. Apêndice

1- Sequências referentes ao sequenciamento dos produtos de PCR do DNA genômico que codificam a as enzimas *dsrAB* e *hyd* .

A

CAACATCGTCACCCAGGGTACGCCACTGCCACACCCCGGCCACCGACGC
CTCCGAGCCCGGTCAAGGCCGTCATGGACGACATGTTTCGAGTACTTCCAGTCC
ATGACCCTGCCGGCCATGGTGCGCATCTCCCTGGCCTGCTGCCTCAACATGTG
CGGCGCGGTCCACTGCTCCGACATCGGATCGTCGGCATCCACCGCAAGCCGCC
CATCGTCGAGCATGACCGCCTGGACAACATCTGCGAGATCCCGCTCGCCGTCT
CCGCCTGCCCGACCGGCCATCAAGCCGTCCAAGGTCGAGATCGACGGCAA
GAAGGTCAACTCCGTCGCGGTCAACGCCTCCCGCTGCATGGTACT**TGCGGTAA**
CTGCTTACAC

B

TCGAGGGCGTGCAGGTGGTAGAAGTGGACGATGTGGTCATGCAGGTA**CTGG**
GAGGCCATGACCAGGTTGCGCATCATGCGCGCGTTGAGCCGGGATAGCCTTGA
CCTTGACGGCGTCCGTCACGCAGCGGGTGGAGGCCAGGGCGTGGACGTACCGT
GCACACGCCGCAGGC**GCGCTGGCGTGAAGTGCTGGGCGTGGCG**

1.1 - Sequências consensos da amostra C.1. A - Sequência do gene *dsrAB* e B – Sequência do gene *hyd*. As sequências de nucleotídeos em negrito e sublinhado referem-se aos oligonucleotídeos direto e reverso.

2. Sequências de aminoácido

A

```
TSSPRVTPTATPRPPTPPSPVKAVMDDMFEYFQSMTLPAM  
VRISLACCLNMC GAVHCSDIGSSASTASRPSSSMTAWTTS  
ARSRSPSPPARPAPSSRPRSSTARSTPSRSTPPAAWYCG  
NCLH
```

B

```
RHAQHFTPARLRRVHGTSTPWPPAAWTTPSRSRLSRLN  
ARMMRNLMASQYLHDHIVHFYHLHAL
```

2.1. Sequência de aminoácido da amostra C.1. A- Sequência do gene *dsrAB* e B – Sequência do gene *hyd*.

•