

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
PPGBIOTEC

---

Dissertação

---

**PROSPECÇÃO DA TOLERÂNCIA DE  
BACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO  
DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO A  
DIFERENTES AGENTES TÓXICOS**

*Sibele Aryadne da Silva*

Ouro Preto  
2020



**UFOP**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



SIBELE ARYADNE DA SILVA

**PROSPECÇÃO DA TOLERÂNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO DO  
QUADRILÁTERO FERRÍFERO A DIFERENTES AGENTES TÓXICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

**Orientadora:** Profa. Dra. Camila Carrião Machado Garcia.

Co – orientador: Prof. Dr. Leandro Moreira.

OURO PRETO

2020

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586p Silva, Sibebe Aryadne da.  
Prospecção da tolerância de bactérias isoladas da região do  
Quadrilátero Ferrífero a diferentes agentes tóxicos. [manuscrito] / Sibebe  
Aryadne da Silva. - 2020.  
94 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Camila Carrião Machado Garcia.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro  
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Biotecnologia. 2. Bactérias. 3. Metais Pesados. 4. Quadrilátero  
Ferrífero (MG). I. Garcia, Camila Carrião Machado. II. Moreira, Leandro  
Márcio. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.21

Bibliotecário(a) Responsável: Sione Galvão Rodrigues - CRB6 / 2526



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



### FOLHA DE APROVAÇÃO

Sibele Aryadne da Silva

Prospecção da tolerância de bactérias isoladas da região do quadrilátero ferrífero a diferentes agentes tóxicos

Membros da banca

Izinara Rosse da Cruz - Doutora- UFOP

Natália Rocha Barbosa - Doutora - UNA

Versão final

Aprovado em 10 de setembro de 2020

De acordo

Professora Orientadora Dra. Camila Carrião Machado Garcia



Documento assinado eletronicamente por **Camila Carriao Machado Garcia, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/09/2020, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0082971** e o código CRC **D3BF5AEF**.

**Referência:** Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.006737/2020-85

SEI nº 0082971

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

Dedico este trabalho ao Todo Poderoso, nosso Deus Criador, onipotente, onisciente e onipresente. E o agradeço eternamente por sua infinita misericórdia. Grande Comandante do Universo. Senhor, sempre na frente do caminho, que me concebeu a graça da vida e a oportunidade de ser uma aprendiz de sua ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Sou eternamente grata ao nosso Senhor Jesus Cristo, luz que ilumina minha vida. Ao Glorioso São Miguel Arcanjo, anjo guardião, que guarda todos os meus passos.

Eu não tenho palavras para descrever minha gratidão ao meu pai Henrique Lúcio da Silva, minha mãe Rosilda Maria Braga e a todas as pessoas de minha família. Eu os amo tanto e o amor não se descreve, somente se sente e vocês me mostraram o que é a verdadeira união, lealdade, força, fé, disciplina e perseverança.

Agradeço a Dra. Christiane Contigli, brilhante pessoa e pesquisadora que fez brotar em mim a semente do amor e da curiosidade pela ciência. Agradeço a MSc. Carla Pittella, ser especial cheio de alegria e que também me inspirou a seguir nesse caminho.

Agradeço a um grande amigo que a vida me trouxe, um reencontro. Hoje MSc. Pierre Henrique de Menezes Paixão. Grande alma. Amizade dessas de se guardar a sete chaves.

Agradeço a minha orientadora Dra. Camila Carrião pela oportunidade, paciência, compreensão e todos os ensinamentos. Agradeço ao Dr. Leandro Moreira pela disponibilidade e auxílio em diversas dificuldades.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório, pela amizade e parceria em especial, Maria Rosilene, Camila Lemes, Marília Romão, Angélica Sanchez, Rosilene Cristina, Lorrana Cachuite e Camila Guerra.

Agradeço a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho durante essa jornada, em especial a Aniely dos Reis, Sttefany Viana, Marcelle Salles, Flávio Pignataro, Nauhara Vieira, e Taís Mares. Pessoas essas que sempre me estenderam as mãos e foram inúmeras vezes o ombro amigo e também me proporcionaram grandes momentos de alegria.

Agradeço ao CNPQ e a UFOP pelo financiamento e oportunidade.

Agradeço também a todas as pedras no caminho, porque o que não nos mata, nos fortalece.

*“Conhece-te, aceita-se, supera-te”.*

Santo Agostinho

## RESUMO

O Quadrilátero Ferrífero (QF) está localizado na porção centro-sul de Minas Gerais. Possui solo rico em metais e minerais de alto interesse econômico, o que justifica a intensa atividade mineradora na região. Ao mesmo tempo, possui alta diversidade de plantas com elevado grau de endemismo, que estão diretamente associadas à elevada pressão seletiva induzida por características como ampla variação diária de temperatura, alta incidência de radiação solar, baixa umidade relativa do ar, pobreza de nutrientes e água, além da presença massiva de metais no solo. Dadas características peculiares, o objetivo deste trabalho foi prospectar o potencial biotecnológico de 64 bactérias cultiváveis previamente isoladas de solos de canga e plantas obtidas na Serra da Moeda e Jardim Canadá quanto a capacidade de tolerar distintos agentes tóxicos. Para isso todas as bactérias foram desafiadas a diversas doses de sais metálicos, luz ultravioleta, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), bromato de potássio (KBrO<sub>3</sub>), variações de pH, além de ensaio para a quantificação da produção de biofilme. Do total de isolados testados, 11 apresentaram tolerância a todos os metais pesados e ao arsênio em todas as doses utilizadas. Quanto a tolerância à luz UVC, 14 isolados foram tolerantes à dose de 75,6 J/m<sup>2</sup> de luz UVC. Nove isolados foram tolerantes ao peróxido de hidrogênio (100mM). Cinquenta e um isolados cresceram em pH 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 12,0 e todos apresentaram também a capacidade de produzir biofilme. O sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S permitiu identificar algumas bactérias dos gêneros *Pantoea sp*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus sp*, *Lysinibacillus sp* e *Sporolactobacillus sp*, gêneros previamente relatados em processos de biorremediação de águas e solos. Deste modo, nossos dados apontam que as bactérias isoladas da região do quadrilátero ferrífero poderão contribuir para o desenvolvimento de produtos de elevado interesse econômico como para a utilização em processos de biorremediação de efluentes ou áreas contaminadas com metais pesados.

**PALAVRAS – CHAVES:** Quadrilátero Ferrífero, Danos de DNA, Bioprospecção.



## ABSTRACT

The Quadrilátero Ferrífero (QF) is located in the south-central portion of Minas Gerais. It has soil rich in metals and minerals of high economic interest, which justifies the intense mining activity in the region. At the same time, it has a high diversity of plants with a high degree of endemism, which are directly associated with high selective pressure induced by characteristics such as wide daily variation in temperature, high incidence of solar radiation, low relative humidity, nutrient and water poverty in the soil, in addition to the massive presence of metals in the soil. Given these peculiar characteristics, the objective of this work was to explore the biotechnological potential of 64 cultivable bacteria previously isolated from canga soils and plants obtained in Serra da Moeda and Jardim Canadá in terms of their ability to tolerate different toxic agents. For this purpose, all bacteria were challenged to a range doses of metal salts, ultraviolet light, hydrogen peroxide, potassium bromate, pH variations, in addition to tests the quantification of biofilm production were also performed. Eleven of the total of isolates showed tolerance to all heavy metals and to arsenic in all tested doses. Fourteen isolates were tolerant to the dose of 75.6 J/m<sup>2</sup> of UVC light. Nine isolates were tolerant to hydrogen peroxide (100mM). Fifty one isolates grew in the pHs 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 and 12; 0 and all of them showed the ability to produce biofilm. The sequencing of the partial region of the 16S gene allowed the identification of some bacteria of the genera *Pantoea sp*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus sp*, *Lysinibacillus sp* and *Sporolactobacillus sp*, genera previously reported in processes of water and soil bioremediation. In this way, our data indicate that bacteria isolated from the region of the iron quadrilateral may contribute to the development of products of high economic interest as well as for use in processes of bioremediation of effluents or areas contaminated with heavy metals.

KEY WORDS: Quadrilátero Ferrífero, DNA Damage, Bioprospecting.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura (1): Modelo de placa matriz .....	35
Figura (2): Modelo de placa H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
Figura (3): Modelo de placa KBRO <sub>3</sub> .....	39
Figura (4): Ensaio de tolerância (AlCl <sub>3</sub> e CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O).....	44
Figura (5): Ensaio de tolerância (FeCl <sub>3</sub> e MnSO <sub>4</sub> ).....	45
Figura (6): Ensaio de tolerância (CdCl <sub>2</sub> e Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).....	46
Figura (7): Ensaio de tolerância (NaAsO <sub>2</sub> .(As <sup>3+</sup> ) e (Na <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub> . (As <sup>5+</sup> )).....	47
Figura (8): Heatmap – metais pesados e arsênio.....	48
Figura (9): Ensaio de tolerância a Luz UVC.....	49
Figura (10): Heatmap – Luz UVC.....	50
Figura (11): Ensaio de tolerância ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e KBRO <sub>3</sub> .....	51
Figura (12): Heatmap- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e KBRO <sub>3</sub> .....	53
Figura (13): Bactérias cultiváveis em diversas faixas de pH.....	54
Figura (14): Heatmap – pH.....	55
Figura (15): Gel de agarose.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela ( 1 ): Parâmetros inorgânicos: CONAMA.....	16
Tabela (2): Identificação dos isolados investigados.....	32
Tabela (3): Concentração (mM) dos íons metálicos e arsênio.....	36
Tabela (4): Doses UVC (J/m <sup>2</sup> ) utilizadas na exposição dos isolados.....	37
Tabela (5): Isolados selecionados para o sequenciamento 16S.....	41
Tabela (6): Resultados do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico (1): Produção de biofilme.....	56
Gráfico (2): Produção biofilme: canga x plantas.....	57
Gráfico (3): Os 64 isolados em relação a origem e a tolerância.....	58
Gráfico (4): Perfil de tolerância dos 64 isolados utilizados nos ensaios.....	59

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTAS DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1. Metais pesados e contaminação ambiental .....	15
1.1.1 Arsênio .....	17
1.1.2 Ferro .....	18
1.1.3 Manganês.....	19
1.1.4 Cádmiio .....	20
1.1.5 Cobre .....	21
1.1.6 Alumínio.....	22
1.1.7 Chumbo .....	22
1.3. O uso de bactérias na remoção de metais .....	24
1.4. Produção de Biofilme .....	27
1.5. Processos redox e pH.....	28
1.7 Tolerância à Luz UVC.....	30
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1. Isolados investigados .....	32
3.2. Preparo da placa matriz .....	34
3.3 Ensaio de tolerância bacteriana a metais .....	35

3.4 Ensaio de tolerância bacteriana à luz UVC .....	37
3.5 Ensaio de tolerância bacteriana ao peróxido de hidrogênio .....	38
3.6. Ensaio de tolerância bacteriana ao bromato de potássio .....	39
3.7. Ensaio de tolerância bacteriana a diversos valores de pH do meio .....	39
3.8. Ensaio de produção de biofilme .....	40
3.9. Identificação de isolados bacterianos – Extração de DNA.....	40
3.9.1. Amplificação da região parcial do gene ribossomal 16S .....	41
3.9.2. Análise das sequências de DNA.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Tolerância a metais e arsênio.....	43
4.2. Tolerância a Luz UVC.....	49
4.3. Ensaio de tolerância a agentes oxidantes .....	51
4.4. Tolerância ao pH .....	54
4.5. Produção de Biofilme .....	56
4.6 Análise global dos resultados de tolerância.....	57
4.7 Resultados extração de DNA e PCR .....	59
4.8 Identificação dos isolados.....	60
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No estado de Minas Gerais (MG), sudeste do Brasil, se encontra uma região cercada por peculiar estrutura geológica de formato quadrangular, denominada Quadrilátero Ferrífero (QF), com seus cerca de 7200 km<sup>2</sup> (JACOBI *et al.*, 2007). Nessas unidades encontramos uma série de metais e minerais de interesse econômico associados a rochas, como arsenopirita (FeAsS) (BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, R. B.; CAVALCANTI, 2004).

No Quadrilátero, verificamos a formação de campos rupestres em áreas mais elevadas (MENEZES & GIULLIET, 1986) e substrato composto principalmente por quartzitos ferruginosos e faixas de canga, com ocorrência natural elevada de metais pesados como Fe, As e Al (ANDRADE *et al.*, 2012). Em algumas áreas de campos rupestres podemos identificar ainda alguns tipos básicos de formações vegetais, como os capões de mata, os campos gramíneos secos e úmidos e aqueles associados aos afloramentos rochosos quartzíticos (PERON, 1989).

A vegetação que evoluiu nesse cenário é influenciada por fatores do solo, climáticos e possuem alta biodiversidade e endemismos, devido aos inúmeros anos de isolamento geográfico (GIULIETTI *et al.*, 1987). As grandes variações de temperatura diárias, alta incidência de radiação solar, exposição ao vento, escassez de água e baixa umidade relativa do ar, pobreza do substrato e presença de metais pesados, impostos por esse ambiente, são considerados adversidades para muitos organismos. As espécies dessas regiões, inclusive as endêmicas, desenvolveram inúmeras adaptações anatômicas, morfofisiológicas, ecológicas e comportamentais para sobreviverem ali (RIZZINI, 1979; GIULIETTI *et al.*, 1997; POREMBSKY *et al.*, 1994). Os metais pesados estão presentes naturalmente no solo, porém devido a ação de eventos como os intemperismos e a alta demanda industrial, relacionada também ao aumento do crescimento populacional trás consequentemente maior exploração do solo e consequentemente, maior quantidade de rejeitos contaminados oriundos das ações antrópicas, ocasionando assim aumento considerável da poluição do meio ambiente (BAKER *et al.*, 1994; BISINOTI *et al.*, 2004; SANTOS, 2005). Alguns dados demonstram que o aumento da biodisponibilidade de metais pesados no solo ocorreu devido as atividades mineradoras no início do século XIX através do processamento de metais (BISINOTI *et al.*, 2004).

Os metais pesados são um grupo heterogêneo de elementos químicos, que incluem, metais, semi-metais e não metais, possuindo número atômico maior que 20 ou peso específico superior “g/cm<sup>3</sup>, sendo encontrados na natureza em forma de traços em partes por milhão (ppm)

(MALAVOLTA, 1994). Existem naturalmente no ambiente e são necessários em concentrações mínimas para manutenção dos processos vitais dos seres vivos, conhecidos como oligoelementos ou micronutrientes (GRIFFIN, 1994). A quantidade excessiva de metais pesados no solo, prejudicam todo o meio ambiente, contaminando desde as águas subterrâneas até mesmo o ar e os animais. Isto devido aos metais pesados serem altamente reativos, sendo capazes de interagir com outras substâncias presentes no meio ambiente, além serem biocumulativos (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2011). Alterações na diversidade de microrganismo do solo contaminado por metais pesados ocorre com a seleção dos mais tolerantes. Algumas espécies podem ser eliminadas e outras podem ter seu tamanho de população aumentado ou diminuído (GILLER *et al.*, 1998).

### **1.1. Metais pesados e contaminação ambiental**

A atividade mineradora traz grandes consequências para o meio ambiente, como intoxicação dos organismos aquáticos, severas modificações na fauna e flora aquáticas e diminuição da biodiversidade das espécies sobreviventes (MARIANO, 2001). Os metais pesados estão naturalmente no solo, porém devido a fatores como as atividades antrópicas oriundas principalmente do processo de mineração, tem aumentado consideravelmente a concentração de metais pesados no solo, água e atmosfera (DARBON *et al.*, 1992). Emissões contínuas de metais pesados podem ser absorvidos por vegetais e animais, causando intoxicações em todos os níveis da cadeia alimentar (MARKERT *et al.*, 2007). A atividade cumulativa dos metais pesados no solo ocorre através de diversos processos e fontes, como a queima de combustíveis fósseis, mineração, fundição de minérios metálicos, resíduos municipais, pesticidas, uso de pigmento e baterias (DARBON *et al.*, 1992).

O ministério do meio ambiente, junto ao conselho nacional do meio ambiente estabelecem na RESOLUÇÃO Nº 460, DE 30 DE DEZEMBRO DE 2013, que altera a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 420/2009 (altera o prazo do art. 8º e acrescenta novo parágrafo) e Altera a Resolução CONAMA no 420, de 28 de dezembro de 2009, que dispõe sobre a concentração máxima que algumas substâncias inorgânicas, como íons metálicos, podem ser encontradas no meio ambiente, para fins de fiscalização e de proteção ao meio ambiente já encontra-se estabelecido, conforme TAB.(1).



TABELA (1): Valores orientadores para solos e para águas subterrâneas CONAMA.

Substância	Solo (mg.kg-1 de peso seco)			Água Subterrânea (µg.L-1)	
	Agrícola	Residencial	Indústrial		
Arsênio	35	55		750	10
Cádmio	3	8		20	5
Ferro	-	-	-	-	2450
Manganês	-	-	-	-	400
Chumbo	180	300	900	-	10
Cobre	200	400	600	-	2000
Alumínio	-	-	-	-	3500

**Legenda:** Valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009 que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. A Resolução Nº 460, de 30 de dezembro de 2013, altera a Resolução CONAMA nº 420/2009 (alterando o prazo do art. 8º, e acrescenta novo parágrafo).

A resolução Nº 460, de 30 de dezembro de 2013, altera a Resolução CONAMA nº 420/2009 (altera o prazo do art. 8º, e acrescenta novo parágrafo). O Art. 1º do art. 8 da Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, publicada em 30 de dezembro de 2009, Seção 1, página 81 a 84, passa a vigorar com a seguinte redação: "Art. 8º Os VRQs (Valores de referência de qualidade do solo) para substâncias químicas naturalmente presentes serão estabelecidos pelos órgãos ambientais competentes dos Estados e do Distrito Federal até dezembro de 2014. E acrescenta o parágrafo 3º onde informa que os Estados e o Distrito Federal informarão trimestralmente ao Ministério do Meio Ambiente e ao Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA os resultados das ações adotadas.

A região do quadrilátero ferrífero é uma área muito antiga e bastante explorada pela indústria mineradora. Ainda não existem muitos estudos sobre as interações das plantas e do solo, na presença dos metais pesados em contato, com a água, o solo e os microrganismos presentes na região.

A contaminação de sedimentos com metais pesados na bacia hidrográfica do Rio do Peixe, no Estado de Minas Gerais, entre os municípios de Itabira e Nova Era, pertencente ao Quadrilátero Ferrífero, região que apresenta um cenário geológico distinto e diversas atividades antrópicas foi alvo de estudo. Devido a essas condições, foram realizados ensaios utilizando a técnica analítica de espectrometria de emissão óptica com plasma, a fim de quantificar as concentrações de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti e Zn nos sedimentos de fundo. Este trabalho comprovou a existência de valores indicativos de contaminação ambiental por metais pesados (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Para avaliar as contribuições antropogênicas que ocasionaram a contaminação ambiental mediada por metais pesados foram utilizados os valores de referências (backgrounds regionais) propostos por Costa (2015), pois o Brasil não possui valor de referência adaptado em relação às condições geológicas locais para a avaliação da qualidade dos sedimentos de fundo. Os valores de referência utilizados (em  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) de backgrounds de metais pesados encontrados em sedimentos do quadrilátero ferrífero, segundo, Costa (2015), apresentam os valores para arsênio: 17,55; alumínio (Al): 45.200,00; cobre (Cu): 48,34; ferro (Fe): 281.000,00; manganês (Mn): 3.264,00; chumbo (Pb): 45,40 e cádmio (Cd): 2,07 (COSTA, 2015).

Testamos no projeto alguns metais pesados, sendo os mais presentes da região sendo de importância econômica e na área da saúde. Serão utilizados os metais descritos abaixo, eles foram escolhidos devido a capacidade já conhecida de genotoxicidade, por estarem presentes e normalmente em grande quantidade na constituição do solo do Quadrilátero Ferrífero.

### **1.1.1 Arsênio**

O arsênio é considerado o vigésimo elemento um dos mais abundante da crosta terrestre, encontrado na natureza normalmente associado a compostos sulfurosos de ferro, sendo a arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) (OLSEN, E.J. *et al.*, 1999; ROY, M. *et al.*, 2015; SILVA, J.C.M., 2016). Os processos de intemperismos e a extração realizada pelas mineradoras pode levar à liberação desse metalóide no solo e acometer também corpos de água adjacentes (LIÈVREMONT *et al.*, 2009; TSAI *et al.*, 2009). Além da atividade mineradora, a indústria farmacêutica, bem como

as indústrias de fabricação de vidro e a de produtos agrícolas, podem contribuir para a liberação do metalóide no meio ambiente (LIÈVREMONT *et al.*, 2009).

O arsênio está presente na natureza sob diversas formas químicas sendo a orgânica e a inorgânica, está presente em diversos complexos biológicos e industriais como na produção de vidros e materiais utilizados como semi ou fotocondutores (HOWARD *et al.*, 1993 & STUMMEYER *et al.*, 1996). O As também é utilizado atualmente na agricultura, estando presente na composição de herbicidas e inseticidas, assim como também na flora e fauna marinha, pois as vias metabólicas desses organismos contêm em sua composição nitrogênio e fósforo, possuindo a capacidade de realizar trocas químicas com o arsênio (BURGUERA *et al.*, 1993). O arsênio também pode estar presente em águas naturais, sendo chamado assim de arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ), ( $\text{As}^{5+}$ ) arsenato, íon monometilarsênico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA). Em águas subterrâneas o arsênio se encontra na forma de arsenito e também de arsenato (ANDERSON, 1996).

Pode ser encontrado no ambiente em estados oxidativos diferentes. O arsênio pode ser encontrado na forma de arsenato " $\text{As}^{5+}$ ", arsenito " $\text{As}^{3+}$ ", arsênio elementar ( $\text{As}_0$ ) e arsenieto (As-III), sua mobilidade permite sua presença em diversas condições ambientais (TSAI *et al.*, 2009). As formas inorgânicas ( $\text{As}^{5+}$ ) e ( $\text{As}^{3+}$ ), são as principais formas encontradas em ambientes aquáticos, sua proporção é dependente de processos biológicos e condições físico-químicas (ESCALANTE *et al.*, 2009; LIAO *et al.*, 2011).  $\text{As}_0$  e arsina ( $\text{AsH}_3$ ) são encontrados em ambientes extremamente redutores. O ( $\text{As}^{5+}$ ) é a forma inorgânica de As em ambientes aeróbicos com alto Eh (potencial oxidação-redução) e pH baixo, enquanto que, inversamente, ( $\text{As}^{3+}$ ), se torna dominante em ambientes anaeróbicos, com baixo Eh e pH alto. Além de ser menos tóxico que ( $\text{As}^{3+}$ ), o ( $\text{As}^{5+}$ ), tem a tendência de ser fortemente adsorvido ligando-se com minerais inorgânicos, especialmente minério de ferro e óxidos de alumínio, sendo imobilizado no sedimento, enquanto que ( $\text{As}^{3+}$ ) é considerado mais solúvel mantendo-se biodisponível na água (OREMLAND & STOLTZ, 2005). Portanto, dependendo das características abióticas do ambiente, como o potencial redox e o pH, estados oxidativos distintos do As podem predominar.

### **1.1.2 Ferro**

O elemento ferro é o quarto metal mais abundante na crosta terrestre e o maior aceptor de elétrons do solo (REIS, 2013). O cloreto de ferro III (Cloreto Férrico) é obtido através da reação direta do óxido de ferro III em resultado do processo de ustulação de rejeitos de carvão, com o ácido clorídrico comercial (LEPREVOST, 1975).

A produção do coagulante cloreto férrico, utiliza como fonte de ferro o resíduo do processo de ustulação de rejeitos piritosos relacionado a mineração do carvão a fim de obter um produto de qualidade no mercado de coagulantes para o tratamento de água e efluentes líquidos (LOPES *et al.*,2015). O cloreto de ferro III é utilizado no tratamento de esgotos industriais e domésticos (SPIRO & STIGLIANI, 2009). Na manufatura de cores, pigmentos e tintas; como um agente clorificante e como catalisador em reações de cloração de aromáticos (PATNAIK, 2003). O cloreto de ferro III foi introduzido no processo de fotogravura por ser um composto pouco tóxico em comparação com os ácidos que eram utilizados anteriormente, como o caso do ácido nítrico. O descarte indevido da solução de cloreto de ferro III pode causar danos ambientais, como a alteração de pH, exterminação de determinadas colônias de bactérias e fungos, além de corrosão de estruturas metálicas submersas (NISHIYAMA *et al.*,2012).

### **1.1.3 Manganês**

O manganês é encontrado na natureza combinado a outros elementos formando minerais, na sua maioria, óxidos. Está disperso em rochas, geralmente estão sob a forma de óxidos, hidróxidos, silicatos, sulfatos e carbonatos (HAROLD & TAYLOR, 1994). O manganês pode chegar ao mercado no estado natural ou tratado. O tratado é beneficiado de acordo com a utilização industrial do mineral, podendo ser utilizado na fabricação de baterias, em largo uso na agricultura através da utilização na composição de fertilizantes, fungicidas e também na fabricação de rações. Também é utilizado como agente de secagem de pintura, agentes oxidantes para corantes, aromatizantes e agentes de vedação, no meio ambiente as aplicações vão desde o tratamento de água, aditivos de combustão, e na hidrometalurgia (urânio e zinco). A utilização não metalúrgica do mangânes está relacionada como agente corante em vidros, produtos da cerâmica vermelha, e, no caso dos óxidos de manganês, são utilizados como: oxidantes na manufatura de cloro, cromo e oxigênio; desinfetante, como em algumas aplicações do permanganato de potássio; agente de secagem de tintas; corante ou descorante (agente de branqueamento) do vidro, devido às propriedades oxidantes do metal; componentes de pilhas e baterias. O permanganato de potássio e o sulfato de mangânes são um dos mais importantes produtos obtidos com base no minério de grau químico. O permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) é um agente oxidante utilizado na purificação em processos químicos, como tratamento de água, controle de poluição, pois possui a capacidade de eliminar odores e gostos indesejados. (SAMPAIO *et al.*,2008). O manganês proveniente do sulfato de manganês e do cloreto de manganês, que são encontrados em solo contaminado, reage com a água formando um

complexo ( $Mn_6H_2O$ ), que consegue penetrar facilmente no organismo. O metal dissolvido em água consegue atravessar a massa encefálica, se acumulando no cérebro, podendo ocasionar neurotoxicidade (HERNÁNDEZ, R.B. *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 Cádmio

Dentre os metais pesados, o cádmio é considerado o mais perigoso, os íons desse metal não participam de nenhuma via metabólica (FRIBERG *et al.*, 1974). O cádmio, inibe as funções das proteínas que possuem pontes dissulfeto devido a sua afinidade pelos grupos sulfidrilas, também compete com vários íons bivalentes como  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  por sítios de ligação de metais nos sistemas biológicos. Este metal, pode ainda ligar-se a nucleotídeos levando a quebra da fita de DNA, ocasionando possíveis mutações (WANG *et al.*, 1997). O cádmio é principalmente obtido como subproduto da refinação do zinco (DI TOPPI & GABRIELLI, 1999). É separado do zinco pela precipitação com sulfatos ou através do processo de destilação. O zinco e o cádmio estão nos minerais na forma de sulfetos que quando em combustão originam óxidos e sulfatos e o cádmio é separado devido a maior facilidade que apresenta para sofrer redução. O metal, além de ser obtido da mineração e metalurgia do sulfeto de zinco, também é adquirido, em menor quantidade da mineração de chumbo e cobre (COLIN, B., 2005). É muito empregado na fabricação de pilhas e foi descoberto em 1817 por Friedrich Strohmeyer. A exposição ao cádmio se dá predominantemente através de água e alimentos contaminados, inalação de fumaça de cigarros e utilização de águas contaminadas na irrigação ou mesmo pelo solo contaminado (PRASAD, 1995). Em bactérias, o cádmio é internalizado pelo sistema de transporte do magnésio, enquanto que em plantas o cádmio entra pelo sistema de transporte do cálcio (LIMA, 2007). O elemento cádmio tem meia-vida de aproximadamente 10 anos, o que o torna um contaminante cumulativo (WAALKES, 2000). O cádmio é um elemento químico altamente tóxico para seres humanos, sendo absorvido através dos tratos respiratório e intestinal (BERNARD & LAUWERYS, 1984; HALLENBICK, 1984). Foi designado carcinógeno humano e animal pela “*International Agency for Research on Cancer*” e o “*US National Toxicology Program*”. A exposição ocupacional ao cádmio está relacionada ao câncer de pulmão e ao câncer de próstata (ROMAN *et al.*, 2002).

### 1.1.5 Cobre

O cobre é um elemento muito difundido na natureza. Trata-se, no seu estado puro, de um metal flexível muito utilizado na fabricação de moedas, fios elétricos, tubulações, encanamentos de água quente, e em combinação com outros metais para a produção de ligas e chapas metálicas. Os compostos de cobre são usados na agricultura, no tratamento da água para controle de algas (sulfato de cobre pentahidratado), na preservação de madeira, couro e tecidos e como aditivo em alimentos. O cobre elementar não se degrada no ambiente. As principais fontes antropogênicas do metal são: mineração, fundição, queima de carvão como fonte de energia e incineração de resíduos municipais. Pode ser encontrado em animais (ostras e mexilhões), plantas, alimentos e bebidas. No ar, o cobre geralmente é encontrado na forma de óxidos, sulfatos e carbonatos. As partículas, dependendo do tamanho, sofrem deposição seca ou são arrastadas pela água da chuva. O cobre é um elemento essencial aos organismos vivos em pequenas quantidades. Entretanto a ingestão de sais de cobre pode produzir vômito, letargia, anemia hemolítica aguda, dano renal e hepático e, em alguns casos, morte. A ingestão de água contendo altas concentrações do metal pode produzir também náusea, vômito, dor abdominal e diarreia. (AZEVEDO, 2003; KLASSEN, C.D., 2013).

Foi confirmada a associação entre a exposição ocupacional em fundições de cobre e câncer pulmonar (MARSH *et al.*, 1989). O elemento cobre é um micronutriente necessário ao desenvolvimento vegetal, porém o excesso torna-se tóxico a muitas espécies, devido à formação de radicais livres que danificam as células, ou pela interação com proteínas que prejudicam processos celulares (YRUELA, 2009). No ambiente aquático encontram-se as maiores concentrações de cobre devido aos pesticidas despejados inadequadamente, processos industriais como produção de baterias e o despejo de efluentes e também no controle de algas em piscinas (SONG *et al.*, 2011).

O teor natural de cobre em solos é variável, depende da rocha matriz e da intensidade dos processos de formação do solo (físico-químico e biológico) sobre a rocha (KING, 1996). A presença de cobre na água ameaça a saúde humana e dos organismos aquáticos (HU *et al.*, 2007). O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) é utilizado também como biocida, substância conhecida pela capacidade de eliminar microrganismos, o sulfato de cobre é muito utilizado também como pesticida (KRUMBEIN, 1988).

### 1.1.6 Alumínio

O alumínio é liberado no meio ambiente através de processos como erupções vulcânicas, erosão do solo e atividades antropogênicas (FERREIRA *et al.*, 2008). A indústria do alumínio metálico está vinculada às produções de bauxita, hidróxido de alumínio e alumina (EVANS, K., 1995; LOWE, B. M., 1992). O cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) é um importante catalisador nas indústrias química e petroquímica, usados também em desodorantes e na produção de detergentes. O alumínio é utilizado também como coagulantes atuando na redução da matéria orgânica no tratamento de água, aumentando a ocorrência do metal em água potável (FERREIRA *et al.*, 2008). A presença de alta concentração Al no solo inibe o crescimento e o desenvolvimento das raízes, alterando assim a absorção de água e nutrientes, tornando o desenvolvimento das plantas reduzido (CASSIOLATO *et al.*, 2000; KOCHIAN, 1995).

A ingestão do alumínio ocorre através de água e alimentos contaminados com o metal, pode ser ingerido também pela presença de corantes industrializados e conservantes utilizados na indústria alimentícia. A utilização de sais de alumínio como princípios ativos em antitranspirantes possui atividade estrogênica, que está relacionado ao aparecimento de câncer de mama (DARBRE, 2013). O alumínio pode causar danos cerebrais, além de desencadear processos redox (FERREIRA *et al.*, 2008).

### 1.1.7 Chumbo

O metal chumbo é considerado um elemento tóxico, não essencial ao organismo e bioacumulativo. O chumbo afeta todos os órgãos e sistema do organismo. O chumbo produz efeitos deletérios sobre muitos processos bioquímicos, afetando a síntese do grupo heme de proteínas, além de sua habilidade de inibir ou imitar a ação do cálcio, interagindo com proteínas (MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C., 2004). As fontes comumente relacionadas à exposição ao chumbo são através do solo, ar, alimentos contaminados com o metal (PAOLIELLO *et al.*, 2002). A toxicidade do chumbo está relacionada à várias atividades bioquímicas que podem atingir o sistema nervoso, renal, sanguíneo, endócrino, além do sistema gastrointestinal e reprodutivo (GOYER, R.A., 1991). O chumbo interfere no funcionamento de membranas células e enzimas, o metal é capaz de formar complexos estáveis com outros elementos químicos contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupos  $-SH$ ,  $-H_2PO_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ), que doam elétrons para o chumbo (MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C., 2004). O chumbo é utilizado em indústrias como as mineradoras, na confecção de baterias é utilizado

também na produção de tintas (FERREIRA *et al.*, 2007).

## **1.2. Biorremediação**

A biorremediação engloba processos que utilizam microrganismos como, bactérias, fungos ou leveduras, para a diminuição, completa remoção ou ainda a diminuição da toxicidade de um contaminante no meio ambiente, principalmente de metais pesados (YAKUBU, 2007). Não são processos rápidos, porém são processos alternativos e ecologicamente viáveis, que possuem um custo menor e que através de pesquisas científicas tem demonstrado bastante eficientes (GAYLARDE *et al.*, 2005). Os processos de biorremediação são ainda mais importantes atualmente devido à alta concentração de contaminantes oriundos das atividades industriais ocasionadas pelo aumento do crescimento populacional (BRITO *et al.*, 2004). Os métodos convencionais utilizados para a remoção de metais de efluentes industriais são: precipitação, redução ou oxidação química, troca iônica, filtração, tratamento eletroquímico, osmose reversa, tecnologia de membranas e recuperação por evaporação (AHLUWALIA & GOYAL, 2007). Porém, essas metodologias podem ser ineficazes ou de custo elevado, principalmente se os metais estão em altas concentrações na faixa entre 1-100 mg/L (LOU & LIN, 2008).

Em relação ao meio ambiente, a mineração é das atividades antropogênicas que mais o afeta negativamente, devido a diversos impactos advindos da extração de minerais diretamente do subsolo e também devido ao pós tratamento inadequado dos rejeitos. Devido à crescente demanda tecnológica, a extração de minérios é muito realizada e a dispersão de metais pesados no meio ambiente crescente (HATJE *et al.*, 2017).

A ação antrópica altera a qualidade do solo, água e do ar. Os rejeitos industriais são descartados em grande quantidade e inadequadamente na natureza, ocasionando diversos prejuízos ecológicos (DELLAMATRICE, 2005). Alguns microrganismos exibem capacidade de crescer em elevadas concentrações de metais. Essa capacidade pode ser resultado de diversos mecanismos intrínsecos ou induzidos (adaptativos), capazes de modificar a estrutura química dos componentes tóxicos, transformar os poluentes em uma estrutura menos tóxica em relação à molécula original ou até mesmo eliminar completamente a toxicidade de substâncias (BRITO *et al.*, 2004) (GOMES *et al.*, 1998).

As tecnologias utilizadas nos processos de biorremediação são bastante complexas e requerem estudos aprofundados, como o conhecimento sobre os tipos de contaminantes e seus riscos para o meio ambiente, para a saúde dos seres humanos e animais, bem como um estudo



sobre a composição geológica do ambiente que foi contaminado e também da legislação vigente (BALAN, 2001). Devido a atual importância dos processos de biorremediação e a necessidade urgente de encontrar novas metodologias, que sejam menos nocivas ao meio ambiente, as pesquisas científicas nesta área são importantes e necessárias para a identificação de novos microrganismos que possuem a capacidade de utilizar seus mecanismos de adaptações em processos de biorremediação, auxiliando assim de forma efetiva na recuperação de áreas contaminadas com componentes tóxicos.

Os termos resistência e tolerância são atualmente utilizados como sinônimos. A definição de resistência é como a habilidade de sobreviver a metais tóxicos por mecanismos de detoxificação produzidos em resposta direta ao metal. A tolerância, por outro lado, seria a habilidade de sobreviver à toxicidade de metais por meio de propriedades intrínsecas do organismo (GADD, 1992). Dentre os mecanismos de tolerância aos metais pesados, estão o seqüestro intra e extracelular, através da presença de bombas de efluxo, ou da redução e deposição enzimática (BIRCH & BACHOFEN, 1990; GOMES *et al.*, 1998; NIES, 1999).

### **1.3. O uso de bactérias na remoção de metais**

Apesar dos municípios e cidades que compõem o Complexo do Quadrilátero Ferrífero estarem em atual e frequente processo de exploração, devido à grande demanda da indústria, a região possui vasta diversidade microbiana. Estudos realizados com as bactérias coletadas da região demonstraram o potencial biotecnológico das mesmas (CANESCHI, W. L. *et al.*; FELESTRINO, E.B. *et al.*, 2017). Amostras de solo, oriundas de mineradoras desativadas, localizadas nos municípios de Sabará e Brumadinho, no estado de Minas Gerais, apresentaram bactérias dos gêneros: *Burkholderia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Arthrobacter*, que possuem alto potencial para a utilização em processos de biorremediação de cobre, cromo e níquel em solo e água (LOPES, 2016). As bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Arthrobacter*, apresentaram especificamente a capacidade metabólica de biossorção e interiorização de metais pesados. Demonstrando que bactérias isoladas do Quadrilátero Ferrífero apresentam alta atividade metabólica, pela capacidade de degradação de fontes de carbono, que são processos primordiais no ciclo biogeoquímico e em biorremediação. Especificamente, os microrganismos isolados dos solos de Sabará e Brumadinho apresentam diversidade funcional para degradação de aminoácidos, compostos fenólicos, além de apresentar também genes funcionais com a capacidade de remoção e interiorização de metais oriundos dos resíduos de mineração, que podem ser utilizados em processos de biorremediação (LOPES, 2016).

Bactérias redutoras de sulfato também já foram identificadas em regiões do Quadrilátero Ferrífero. Esses microrganismos que também podem ser utilizados no tratamento de efluentes de processamento mineral especificamente em drenagem ácida, conseguem realizar a precipitação dos metais, através dos seus mecanismos adaptativos. Além disso, podem ser cultivados em biorreatores, auxiliando assim no tratamento e na recuperação dos metais que estão dissolvidos nas águas de drenagem, sob a forma de sulfetos (DE JESUS, 2011).

Amostras de solo e água foram coletadas de dois locais da Bacia do Rio das Velhas, sendo a corrente Mina, localizada adjacente a uma usina de beneficiamento de ouro e a corrente Mutuca, que não sofre influência de atividades antrópicas e faz parte da estação de tratamento de água da empresa de saneamento básico de Minas Gerais (COPASA). As amostras apresentaram predominância de bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. Além da presença de *Alphaproteobacteria* que pode estar relacionadas como potenciais indicadores biológicos de sedimentos ricos em arsênio (REIS, 2013).

A mobilidade do arsênio em amostras de solo na presença de matéria orgânica e bactérias redutoras de sulfato (BRS) também tem sido alvo de estudo, com o propósito de biorremediação de áreas contaminadas com o uso de bactérias resistentes. A capacidade desses microrganismos de mobilização do arsênio, através da deposição da matéria orgânica testadas no solo e a da diversidade bacteriana dos solos da caverna foi demonstrada em microrganismos de solo coletados das minas de ouro desativadas: Mina Velha, Mina Chico Rei e a Mina Santa Rita (LOPES, 2014).

A biorremediação de áreas contaminadas com arsênio foram alvo de estudo com a utilização de bactérias consorciadas sendo, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Cupriavidus metallidurans*, *Ralstonia sp.* e *Burkholderia cepacia* prospectadas em áreas de minas subterrâneas da região do Quadrilátero Ferrífero. Os microrganismos apresentaram a capacidade de oxidar compostos orgânicos levando à precipitação como sulfeto de arsênico. A remoção de íons arsênico e sulfeto utilizando tratamentos biológicos é de grande importância e amplia a possibilidade de alternativas de baixo custo para o tratamento de águas residuais (MATOS *et al.*, 2018).

Amostras coletadas do sedimento do Córrego da Mina, região pertencente ao Quadrilátero Ferrífero e muito impactada pela ação mineradora, apresentaram concentrações superiores de arsênio às permitidas pela lei brasileira (CONAMA) e pelo *Guia Canadense de Qualidade Ambiental*. A região de estudo já é conhecida por conter muitos metais pesados em sua composição. As bactérias predominantes no sedimento do Córrego da Mina são as dos filos

*Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. As cepas encontradas e sequenciadas apresentam genes responsáveis pela transformação de arsênio. As bactérias responsáveis pela capacidade de reduzir  $As^{5+}$  e de  $As^{3+}$ , foram as dos gêneros *Thermomonas sp.* e *Pannonibacter sp.*, descritos pela primeira vez como gêneros transformadores de arsênio (COSTA, 2014). Outra pesquisa foi realizada em amostras de águas coletadas na Lagoa Gambá, na cidade de Ouro Preto, um consórcio bacteriano foi isolado das águas da lagoa e demonstraram a capacidade de metabolização de sulfato e arsênio. Os microrganismos encontrados foram os das espécies: *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter sp.*, *Ralstonia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Cupriavidus metallidurans* e *Pantoea agglomerans* (MOREIRA, 2013).

Outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, desenvolvido na Serra da Moeda, isolou microrganismos da planta endêmica de espécie *Mimosa calodendrum* (Fabaceae) que apresentaram resistência ao arsênio. Uma das bactérias, isolada de raízes desta planta foi identificada como *Alcaligenes faecalis*. Essas pesquisas demonstraram que a bactérias associadas às plantas da região podem apresentar também o potencial de rizorremediação do solo e adaptação de plantas, podendo ser utilizadas na recuperação de áreas de degradação ambiental (FELESTRINO *et al.*, 2017).

Em relação ao manganês a biorremediação ocorre através de três principais mecanismos, todos eles estão envolvidos na imobilização do metal pelos microrganismos através de processos de bioissorção, acumulação intracelular e biomineralização (GADD, 2007). Estudo realizado com amostras de bactérias isoladas do município de Ouro Preto demonstrou que a estirpe de *Serratia marcescens*, que foi isolada de águas de drenagem de mina, apresenta potencial para ser utilizada na remoção do  $Mn^{2+}$ , uma vez que ela é capaz de oxidá-lo para  $Mn^{3+}$  e  $Mn^{4+}$  (QUEIROZ *et al.*, 2018).

Outros estudos realizados com bactérias isoladas de frutos originados do café e do cacau foram conduzidos a fim de avaliar a capacidade de crescimento bacteriano em concentrações de ferro de 5, 500 e 1000 mg/L. Os isolados utilizados são pertencentes ao banco de microrganismos da Universidade de Lavras (UFLACESB 127 (*Bacillus simplex*), bactérias do solo do Cerrado, UFLASCF 590 (*Bacillus subtilis*) bactérias do café e UFLADR 6.12 (*Acetobacter tropicalis*) bactérias presentes no cacau), essas bactérias são conhecidas pela capacidade de reduzir o ferro III, utilizando o metal para seu próprio crescimento (REIS, 2013).

Como descrito acima, o uso de microrganismos para a remoção de metais tem sido alvo de muitos estudos. No entanto, dentro dos processos de remoção destes metais, as condições do meio em que esses microrganismos precisarão atuar podem ser os mais inóspitos para o

crescimento bacteriano, como extremos de pH, meio altamente oxidante, baixa disponibilidade de carbono, entre outros. Por isso, estudos que procurem microrganismos com capacidades adicionais são muito interessantes. Abaixo destacaremos algumas características que serão exploradas neste trabalho e sua importância biotecnológica.

#### **1.4. Produção de Biofilme**

O biofilme é definido como uma comunidade bacteriana aderida a uma matriz polimérica, superfície inerte ou biológica com taxa de crescimento e nível de transcrição diferentes das bactérias livres. Funcionando como proteção contra antimicrobianos naturais, amebas, surfactantes, substâncias tóxicas e ameaças ambientais (COSTERTON, 1999). Apresenta também um papel importante como meio de comunicação entre os microrganismos, por garantir a proximidade de grupos fisiológicos dependentes metabolicamente (MEYER-REIL, 1994; DUNNE, 2002; DONLAN & COSTERTON, 2002). Diversos estudos demonstram que a produção de biofilme pelas bactérias de maneira simbiótica está relacionada à proteção e tolerância às condições ambientais de estresse (COSTERTON J.W., 1995; CHMIELEWSKY R.A.N., FRANK J.F., 2003). A resistência dos microrganismos presentes no biofilme está relacionada à fisiologia e arquitetura do biofilme, como a produção de enzimas que degradam substâncias nocivas, alterações fisiológicas e as interações entre espécies (MATTILA T.S., WIRTANEN G., 1992; SIMOES M., SIMOES L.C., VIEIRA M.J., 2010). A capacidade de produção de biofilme pelas bactérias é importante para as áreas médicas, indústrias de alimentos, biorremediação ambiental. O biofilme envolve diversos processos de troca energética e ciclagem de nutrientes. Algumas espécies presentes no biofilme tem a capacidade de degradar compostos orgânicos (AZIM, 2009).

Na fase madura do biofilme ocorre o desenvolvimento da sua composição e estrutura, essas características podem ser utilizadas em processos de remoção de vários contaminantes (HOLDING *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2014). O biofilme possui a capacidade de absorção principalmente de nitrogênio e fósforo envolvendo processos de utilização para o próprio crescimento ou a transformação em fósforo solúvel disponível para outros organismos. Agindo como depósito temporário de nutrientes e auxiliando na diminuição de matéria orgânica nos processos de eutrofização, o biofilme pode ser utilizado no tratamento de águas residuais (WU *et al.*, 2014).

## 1.5. Processos redox e pH

Em condições celulares estáveis, existe equilíbrio entre a produção de radicais livres e a neutralização através dos sistemas antioxidantes (CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. F. R., 2013). Porém, sob determinadas condições, como na produção excessiva de radicais livres ou a deficiência dos sistemas antioxidantes, ocorre a formação de lesões aos constituintes celulares, como peroxidação dos lipídeos de membrana, oxidação de receptores hormonais, proteínas e danos ao material genético, como as oxidações de bases do DNA que podem provocar processos mutagênicos e tumorais (MAGDER, S., 2006; LAMBETH, J. D., NEISH, A. S., 2014; SVILAR, D. GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H., SOBOL, R. W., 2010). As principais moléculas combatentes dos processos redox, são agentes óxidos redutores e o sistema de defesa antioxidante em sistemas aeróbios. A proteção celular possui um sistema antioxidante de defesa que atua em duas fases. Uma que atua na detoxicação do agente antes que ele possa causar uma lesão. Essa linha é composta por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparação da lesão, é composta pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. A vitamina D é um antioxidante estrutural da membrana. A maior parte dos agentes antioxidantes estão presentes no meio intracelular (ROSS, D., MOLDEUS, P., 1991; HEBBEL, R., P., 1986).

Os radicais livres como espécies reativas de oxigênio (ROS), ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) e outros, são produzidos por agentes endógenos e exógenos. As fontes endógenas de geração de ROS são peroxissomos, NADPH oxidase, xantina oxidase, mitocôndria e citocromo P-450 (AFANAS'EV, I, 2014; BLAKE, R, TROUNCE, I. A., 2014). As fontes de origem exógenas ocorrem através da exposição à radiação, cigarro, pesticidas, uso de drogas, exercícios físicos em excessos e solventes (CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. F. R., 2013).

O peróxido de hidrogênio é um potente agente oxidante, superior ao dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através da atividade de catálise, o peróxido de hidrogênio pode se converter a um radical hidroxila ( $^{\cdot}OH$ ) e é menos reativo somente que o elemento flúor. Pode também ser empregado como um agente redutor. É um metabólito natural em muitos organismos e que quando decomposto, forma oxigênio e água. (PRICE, D., WORSFOLD, P.J., MANTOURA, R.F.C., 1992).

É reconhecido como o oxidante mais eficiente na conversão de SO<sub>2</sub> em SO<sub>4</sub>. O tratamento de solos através da oxidação química com o peróxido de hidrogênio pode ser realizado em hidrocarbonetos, solvente, resíduos da indústria do petróleo, pesticidas (KLEISER, G.; FRIMMEL, F. H.; S.C.I., 2000).

O bromato de potássio (KBrO<sub>3</sub>) é caracterizado por um pó branco e incolor. É inodoro e insípido. Ele se dissolve em água e é utilizado como substância química em laboratório, agentes oxidantes em produtos capilares, aditivo alimentar em farinhas, cereais maltados, utilizado também na fabricação de cerveja ou destilação de cerveja. Pesquisas realizaram ensaios em células renais de ratos e verificaram que a substância tem a capacidade de induzir tumores em células renais de ratos. O bromato de potássio também induz a formação de de 8-oxo-7, 8-di-hidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), produto da oxidação do DNA. Na produção e utilização do bromato de potássio, podem ser liberados indevidamente no meio ambiente através de resíduos da substância (PUBCHEM, 2019).

As reações de oxido-redução são primordiais para a manutenção da vida no planeta Terra. Essas reações relacionam -se com o potencial redox, que pode ser descrito como a medida de tendência do ambiente em ganhar ou ceder elétrons (MADIGAN et al., 2010). A partir de processos de oxidação dos materiais reduzidos os seres vivos obtém energia, removendo elétrons de substâncias inorgânicas e orgânicas a fim de capturar a energia disponível. Esse processo é afetado por pH, pressão e composição atmosférica, temperatura e também o quanto de substrato disponível (MOREIRA, S., 2002).

O pH é um dos parâmetros físico-químicos mais descritos e capazes de influenciar o crescimento dos microrganismos. Sabe-se que os valores de pH afetam a solubilidade dos minerais no solo, influenciando assim na disponibilidade de nutrientes. Por exemplo, o ferro, manganês são menos disponíveis em valores de pH acima de 7,0., enquanto o ferro, alumínio e manganês atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0 e estão menos disponíveis em valores muito altos ou muito baixos (MOREIRA, S., 2009). Outra característica marcante do Quadrilátero ferrífero é a grande variação de pH do solo. A maior parte das bactérias possuem um pH ótimo próximo da neutralidade ou em ambiente alcalino na escala de (6,8 - 7,5). Algumas só sobrevivem em pH mais baixo (4,0 - 6,0), criando elas próprias estas condições ao produzirem ácido através da degradação dos hidratos de carbono. São poucas as bactérias que têm preferência para condições fortemente alcalinas (8,5 - 9,0) (PEREIRA, R., 2001).

## 1.7 Tolerância à Luz UVC

A região do Quadrilátero Ferrífero possui alta incidência e oscilações de luz UV durante o dia, por isso o conhecimento do comportamento das bactérias isolados do Quadrilátero Ferrífero é de grande interesse. A radiação não ionizante compreende a luz ultravioleta que apresenta comprimento de onda (100 a 400), luz visível (400 a 800) e luz infravermelha (800 a 1700). A luz ultravioleta é a principal causadora de fotodanos cutâneos. A radiação UV é dividida em três partes sendo: UVC com comprimento de onda (100 a 280 nm), UVB (280 a 320nm) e UVA (320 a 400nm). A luz ultravioleta (UVC) é considerada bactericida e possui alto nível de energia com o menor comprimento de onda, sendo altamente lesiva ao homem e responsável por processos mutagênicos. A camada de ozônio absorve grande parte da luz UVC, de modo que a quantidade que atinge a população é pequena. A radiação UVB possui menor poder de penetração na pele, porém possui alta energia, a exposição à radiação pode ocasionar danos agudos e crônicos na pele pois consegue atingir a epiderme. A radiação UVA é menos energética e a exposição está relacionada a formação de espécies reativas, responsáveis pelo envelhecimento cutâneo precoce, fotossensibilidade e câncer (MENDONÇA, V.L.M., 1996; MASSON, P., SCOTTI, 2003; MEYBECK, A., 1983). De modo geral, a radiação não ionizante (UV) danifica o material genético da célula, tem a capacidade de oxidar lipídeos, origina radicais livres, além de causar inflamação e romper a comunicação celular, modificando a expressão dos genes e enfraquecendo a resposta imune da pele (RANGARAJAN, M.; ZATS, J., 2003).

A exploração para fins biotecnológicos é um dos ramos mais estudados dentro deste tema e é alvo de alguns trabalhos já realizados na região. (FELESTRINO *et al.*, 2017; QUEIROZ *et al.*, 2018). Porém, se faz necessário a expansão de projetos que visem explorar profundamente essa região e a capacidade de microrganismos tolerantes, a fim de buscar resultados biotecnológicos que visem tecnologia sustentável e inovação. Através de liberação de recursos para a realização de projetos maiores e que apresentem continuidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o potencial biotecnológico de bactérias do Quadrilátero Ferrífero quanto à tolerância a condições de estresse induzidas por diferentes agentes tóxicos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Identificar a capacidade de 64 isolados bacterianos em tolerar 12 diferentes agentes tóxicos;
- Investigar a capacidade da produção de biofilme por esses isolados;
- Identificar taxonomicamente os isolados mais tolerantes aos agentes investigados.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolados investigados

Os isolados bacterianos selecionados para a realização deste trabalho foram coletados de plantas e amostras de solo de canga da Serra da Moeda, no município de Moeda e Jardim Canadá, no município de Nova Lima, ambos em Minas Gerais, conforme descrito na TAB.(2 e 2.1). Os isolados utilizados no trabalho foram selecionados de amostras de vegetais (caules, raízes, folhas e flores), que foram isoladas pelo aluno Washington Luiz Caneschi em seu projeto de Doutorado. Foi realizada a lavagem das amostras com água destilada, posteriormente com solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 2 min, lavagem em etanol 70% por 2 min, lavagem com água destilada estéril e plaqueadas em meio LB sólido (10 g/l NaCl, 10 g/l peptona, 5 g/l extrato de levedura, 15 g/l ágar, em pH 7.0) contendo 0,03 mg/l do antifúngico tiofanato metílico e incubadas à 28 °C por 3 a 4 dias. As colônias isoladas foram coletadas com hastes de madeira estéreis e posteriormente plaqueadas em meio LB líquido. Após o isolamento, as suspensões bacterianas foram suplementadas com 30% de glicerol e em seguida foram estocadas a - 80 °C (CANESCHI, 2018).

TABELA (2): Identificação e origem dos isolados coletados de solo de Canga utilizados nos experimentos

Solo de Canga	
C11	C42
C12	C43
C13	C44
C14	C51
C21	C52
C22	C53
C23	C54
C24	C56
C25	C61
C31	C71
C32	C72
C33	C73
C34	C72
C41	C73

**Legenda:** a tabela informa os isolados coletados de solo de canga utilizados no trabalho. Adaptado de (CANESCHI, W.L., 2018).

TABELA (2.1): Identificação e origem dos isolados coletados de amostras de plantas utilizados nos experimentos.

Nome científico	Nome popular	Origem	ID
<i>Lychnoph pinaster Mart.</i>	Arnica Mineira	Flores	FA1
		Raiz	RA2
			RA3
			RA4
			RA5
<i>Stachytarpheta glabra Cham.</i>	Gervão	Rizosfera	RIZA1
			RIZA2
		Flores	FG1
<i>Baccharis reticularia DC</i>	Alecrim-do-campo	Flores	FG2
			FG3
			FB2
			FB3
		Folha	FoB1
			FoB3
			IPT1
<i>Gomphrena arborescens L.f.</i>	Paratudo-Perpétua	Flores	IPT2
		Raiz	IPT3
			RPT1
			RPT3
			RizPT1
		Rizosfera	RizPT3
		Tubérculo	TPT1
			TPT2
			TPT3
TPT5			

TABELA (2.2): Identificação e origem dos isolados coletados de amostras de plantas utilizados nos experimentos. Continuação.

Nome científico	Nome popular	Origem	ID
<i>Symphyopappus compressus</i> (Gardner) B. L. Rob.	-	Raiz	RS1
		Raiz	RS2
<i>Lagenocarpus rigidus</i> Nees	-	Folha	LR1
<i>Pleroma heteromallum</i> D. Don (D. Don)	-	Folha	TH1
<i>Peixotoa tomentosa</i> A. Juss.	-	Flores	P1
		Flores	P2
<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	-	Folha	FCE
		Raiz	RCE1
			RCE2
			RCE3
RCE4			

**Legenda:** a tabela informa a espécie e o nome popular das plantas utilizadas no isolamento das bactérias pesquisadas no trabalho, bem como a origem de qual parte da planta foi utilizada para o isolamento bacteriano. Adaptado de (CANESCHI, W.L., 2018).

### 3.2. Preparo da placa matriz

Para dinamizar as análises, foi feita uma placa matriz dos isolados bacterianos utilizando uma placa estéril de 96 poços. Nesta placa, todos os 64 isolados (50µl de suspensão bacteriana), previamente acondicionados em freezer -80°C, foram colocados em 140µl de meio de cultura Luria Bertani – (LB) que é um meio nutritivo e não seletivo, composto por cloreto de sódio NaCl 1g/L, extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L, para LB sólido foi adicionado 15g/L de ágar. A placa foi incubada em B.O.D. (Spalor, São Paulo, Brasil), por 24 horas a 28°C. Após o tempo de incubação foi adicionado glicerol estéril 1/1 e a placa foi congelada a -20°C. Para a realização do experimento a placa matriz exemplificada na FIG. (1), foi descongelada e os isolados foram reinoculados em outra placa de 96 poços (Estéril) com uso do multi-inoculador de 96 pontas, novamente em meio LB líquido e incubados a 28°C por 24hs. Após este período

as amostras foram plaqueadas em meio LB solidificado em placas de Petri Grande, contendo as concentrações das substâncias desejadas (agentes tóxicos).

-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C11	C12	C13	C14	C21	C22	C23	C24	C25	C31	C32	LB
B	C33	C34	C41	C42	C43	C44	C51	C52	C53	C54	C56	LB
C	C61	C71	C72	C73	C74	FA1	FB2	FB3	FCE	FG1	FG2	LB
D	FG3	FOB1	FOB2	FOB3	IPT1	IPT2	IPT3	LR1	P1	P2	RS1	LB
E	RS2	RA2	RA3	RA4	RA5	RCE1	RCE2	RCE3	RCE4	RPT1	RPT3	LB
F	RIZA1	RIZA2	RIZPT1	RIZPT3	TPT1	TPT2	TPT3	TPT5	TH1	LB	LB	LB
G	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB
H	<i>E.c.</i>	<i>E.c.</i>	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	<i>E.c.</i>	<i>E.c.</i>	LB

**FIGURA (1):** Modelo de placa matriz contendo 64 isolados bacterianos utilizados (em rosa) na realização dos ensaios de metais pesados, arsênio e também de pH. As regiões identificadas como LB, representam o meio de cultivo utilizado (LB), como controle negativo. Os quatros poços identificados como *E.c.* representam a posição do crescimento da *Escherichia coli*, bactéria utilizada como controle de sensibilidade (lilás). Figura elaborada pelo autor.

### 3.3 Ensaio de tolerância bacteriana a metais

Todas as soluções foram preparadas de maneira estéril, adicionando a solução metálica (previamente preparada em água ultrapura) em tubo de 50mL contendo meio LB (sólido) e vertido em placa de Petri de diâmetro 15mm x 90mm. Placas com meio LB - sólido sem o metal foram utilizadas como controle negativo. Os isolados foram inoculados através do multi-inoculador de pontas à 28°C e incubados por 24hs em B.O.D. O experimento foi realizado em duplicatas independentes, utilizando placas matriz diferentes. As soluções e as doses utilizadas nos experimentos estão descritas na TAB. (3). A leitura dos resultados foi realizada em cada dose em comparação com o controle, sendo considerado como tolerante à dose e ao tratamento utilizado, o isolado que cresceu em todas as 4 placas. Os resultados foram quantificados através da medida do tamanho do diâmetro da colônia da bactéria segundo (NEDER, R., N., *et al*, 1992), com o uso de um paquímetro (Western- DC-60). A escala numérica corresponde ao tamanho dos halos dos isolados, foi atribuída como número (0) que corresponde a ausência de

crescimento bacteriano, (1) a escala de isolados na faixa de (1mm à 2mm), a escala número (2) halos de valores entre a faixa de (2mm à 5mm) e a escala de número (3) apresenta halos de diâmetro  $\geq$  5mm. De acordo com o tamanho do halo apresentado pela bactéria, constitui-se a maior ou menor tolerância ao agente utilizado. Os valores obtidos para o tamanho das colônias foram tabelados e submetidos à análise no Software Best informatics Software Segundo Babick *et al.*, (2016) gerando heatmap ou mapas de calor, em formato de dendogramas de similaridade, pelo método hierárquico de ligação completo, tendo a distância Euclidiana como medida de similaridade. Através do HeatMap podemos verificar o agrupamento sob a forma de cores e da faixa de agrupamento (0, 1, 2, 3) ou através de uma faixa de porcentagem. Os isolados que são agrupados com a mesma cor possuem nível de tolerância semelhante. O HeatMap separa também as doses que foram utilizadas e os códigos dos isolados. A escala de número (0) significa que não houve crescimento bacteriano, a escala de número (1) demonstra pequena tolerância, o número (2) tolerância média e o (3) apresenta os isolados de maior tolerância.

TABELA (3). Concentração (mM) dos Íons Metálicos e Arsênio utilizados para os ensaios de tolerância dos isolados bacterianos.

<b>Soluções utilizadas</b>	<b>Concentrações (mM)</b>
Sulfato de Mangânes ( $M_nSO_4$ )	0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10
Cloreto de Ferro III ( $FeCl_3$ )	1 ; 2 ; 5
Arsenito de Sódio ( $NaAsO_2$ ) – $As^{3+}$	1 ; 3 ; 5
Arsenato de Sódio ( $Na_3AsO_4$ ) – $As^{5+}$	1 ; 5
Nitrato de Chumbo II ( $Pb(NO_3)_2$ )	0,5 ; 2 ; 5
Cloreto de Alumínio ( $AlCl_3$ )	0,5 ; 2,5 ; 5
Cloreto de Cádmiio ( $CdCl_2$ )	0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 3
Sulfato de Cobre Pentahidratado ( $CuSO_4.5H_2O$ )	0,5; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 10

**Legenda:** doses utilizadas (mM) nos ensaios de tolerância a metal pesado e arsênio.

### 3.4 Ensaio de tolerância bacteriana à luz UVC

As bactérias foram cultivadas em meio LB (líquido), com densidade óptica (OD) padronizada em 0,5. Foi plaqueado 50µl da suspensão bacteriana em meio LB sólido em placa de Petri e realizado o plaqueamento com auxílio da alça de drigalski. As bactérias foram expostas à luz UVC e em seguida incubadas em B.O.D por 24h à 28°C, conforme as doses demonstradas na TAB (4). A bactéria *Escherichia coli*, neste experimento, foi utilizada como controle negativo pois apresentou menor crescimento bacteriano. A intensidade de luz UVC foi aferida com uso de um dosímetro (Vilber LourMat, número de série: 3488) em 254 nanômetros. Para identificar qual a taxa de crescimento dos isolados expostos à luz UVC, foi realizada a densitometria das colônias pelo uso do programa ImageJ (RASBAND, W.S. *et al.*, 2018). . Através da divisão entre a medição da área da placa e a medição da área de crescimento da bactéria, gerando assim a porcentagem de crescimento bacteriano em cada placa.

TABELA (4). Doses de UVC (J/m<sup>2</sup>) e o equivalente em tempo de exposição utilizadas na exposição dos isolados

<b>Doses - Joules/ m<sup>2</sup></b>	<b>Tempo de exposição (s)</b>
25,2	30s
50,4	60s
75,6	90s
151,2	180s
302,4	360s
504	600s
854,4	240s

**Legenda:** doses de UVC equivalente ao tempo de exposição.

### 3.5 Ensaio de tolerância bacteriana ao peróxido de hidrogênio

Inicialmente, os isolados (50µl) foram incubados em 2000µl de LB (Líquido) à 28°C por 24 horas. Após o período, as amostras em suspensão foram centrifugadas a 8000 x g por 10 min. As bactérias foram padronizadas a uma densidade óptica de 0,5 em 2000µl de solução salina tamponada de fosfato (PBS - NaCl 1,40M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 73,90mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 25,73 mM em água ultrapura).

As soluções de peróxido de hidrogênio foram preparadas em água a partir da aferição da concentração estoque da droga por espectrofotômetro (Perkin Elmer - Victor X3, número de série: 20301368) à 280nm ( $\epsilon = 0,43 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Em placas de 96 poços foi adicionado 120µl de bactéria (padronizada em OD 0,5 em PBS) + 30µl de peróxido de hidrogênio na dose desejada, seguida de incubação por 30 min ao abrigo da luz. Em seguida, com o multi-inoculador de pontas devidamente esterilizado, as bactérias foram inoculadas em meio LB sólido. As placas foram incubadas à 28 °C por 24h e o crescimento bacteriano foi verificado de acordo com o tamanho do halo de crescimento da colônia da bactéria. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Controle			120 µl isolado + 30 µl 25 mM			120 µl isolado + 30 µl 50 mM			120 µl isolado + 30 µl 100mM		
120 µl isolado + 30 µl PBS											
EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC
FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1	FG1
FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3	FG3
F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1	F0B1
F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2	F0B2
FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3	FB3
FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE	FCE
TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2	TPT2

**FIGURA (2):** Placa Matriz do ensaio de tolerância ao peróxido de hidrogênio e as doses que foram utilizadas no ensaio. As primeiras colunas (azul) correspondem ao controle. Em seguida, a cada três colunas uma dose ( 25mM, 50mM e 100mM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A cor vermelha, indica que o isolado não foi tolerante à aquela dose e, o amarelo que o isolado é tolerante a dose utilizada. Figura elaborada pelo autor.

### 3.6. Ensaio de tolerância bacteriana ao bromato de potássio (KBrO<sub>3</sub>)

O ensaio foi realizado conforme a metodologia utilizada no experimento do peróxido de hidrogênio (Item 2.5) porém, utilizando as concentrações de 75mM, 150mM e 300mM de bromato de potássio. As bactérias foram inoculadas na placa de 96 poços e ficaram em contato com o bromato de potássio por 1h, antes de serem inoculadas no LB sólido. Após a exposição, as placas foram incubadas a 28°C por 24h e o crescimento bacteriano foi verificado de acordo com o halo de crescimento da colônia. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Controle (-)			120 µl de Isolado + 30 µl KBrO <sub>3</sub> 75 mM			120 µl de Isolado + 30 µl KBrO <sub>3</sub> 100 mM			120 µl de Isolado + 30 µl KBrO <sub>3</sub> 300mM		
Isolado µl + 30 µl LB											
EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC
C23	C23	C23	C23	C23	C23	C23	C23	C23	C23	C23	C23
C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24
C25	C25	C25	C25	C25	C25	C25	C25	C25	C25	C25	C25
C31	C31	C31	C31	C31	C31	C31	C31	C31	C31	C31	C31
C32	C32	C32	C32	C32	C32	C32	C32	C32	C32	C32	C32
C33	C33	C33	C33	C33	C33	C33	C33	C33	C33	C33	C33
C34	C34	C34	C34	C34	C34	C34	C34	C34	C34	C34	C34

**FIGURA (3):** Modelo de placa de 96 poços, utilizada no ensaio de bromato de potássio. As três primeiras linhas da primeira coluna representam o controle (-) *E.coli*, em azul. As células de cor verde após o controle apresentam as doses utilizadas para o tratamento dos isolados. Para o ensaio de bromato de potássio foram utilizados 75 mM, 100mM e 300 mM, todas as amostras e todas as doses foram tolerantes ao bromato de potássio, representados pela cor verde. Figura elaborada pelo autor.

### 3.7. Ensaio de tolerância bacteriana a diversos valores de pH do meio

A fim de verificar a tolerância dos isolados à diversas faixas de pH, foi utilizado placas com meio de cultura LB sólido preparados nos pHs: 4,0; 5,0; 7,0; 8,0; 9,0; 11,0 e 12,0. A variação do pH foi estabelecida com adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio ao meio LB líquido que posteriormente foi autoclavado. O meio de cultura foi então vertido em placas de petri de tamanho grande e com o multi-noculador de pontas, as bactérias previamente incubadas foram inoculadas ao meio de cultura de acordo com a Placa Matriz. As placas foram incubadas à 28 °C por 24 hs e o crescimento bacteriano foi verificado de acordo com o tamanho do halo de crescimento da colônia. Este ensaio foi realizado em duplicata.



### **3.8. Ensaio de produção de biofilme**

Os isolados foram cultivados em meio LB líquido por 18h à 28°C. A densidade óptica foi padronizada em 1,0. Foi adicionado em placa de 96 poços 100µl de cada amostra e a placa foi incubada por 18h à 28°C. Após a incubação, a placa foi lavada com água destilada para remoção das células e a mesma foi colocada em temperatura ambiente por aproximadamente 1h para secagem. Após a secagem, foi adicionado 125µl de solução de cristal violeta em cada poço e a placa foi deixada em repouso por 45 min. Após a incubação com o cristal violeta, a placa foi novamente lavada com água destilada e a mesma foi colocada em temperatura ambiente por aproximadamente 1h para secagem da placa. Após a secagem, foi adicionado 125µl de etanol 95% em cada poço da placa e deixado em repouso por 45 min para a total dissolução do cristal violeta. O experimento foi realizado em triplicata, de acordo com o método descrito por (O'Toole, 2011 ), com adaptações. Para a leitura da produção de biofilme foi utilizado o Spectramax 340pc384 de número de série: LNR 06345. A bactéria S2M atuou como controle positivo para a presença de biofilme apresentando o valor de absorbância de 0,40. O critério para a produção de biofilme foi o valor da relação entre OD 550nm e 600nm. O valor de 0,1 de absorbância foi considerado como produção fraca de biofilme, de 0,2 até 0,4 produção moderada e acima de 0,4 como alta produção de biofilme. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo a média dos resultados utilizada como valor final.

### **3.9. Identificação de isolados bacterianos – Extração de DNA**

A técnica utilizada para a extração do DNA dos isolados bacterianos foi descrita por Queipo-Ortuño *et al.*, (2008) e Diana *et al.* (2012). Um volume de 1,5mL de meio líquido contendo células bacterianas, crescidas durante a noite, foram centrifugadas a 15000 x g por 15 minutos. Ao pellet foi adicionado 1 mL de água ultrapura e centrifugado a 15000 x g por 10 min. Em seguida, ao pellet foi adicionado 40µL de água ultra pura, e assim as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 min e logo depois colocadas no freezer a -20°C por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 20s e o sobrenadante contendo o DNA genômico foi coletado.

### 3.9.1. Amplificação da região parcial do gene ribossomal 16S

Alguns isolados foram selecionados conforme TAB (5) para a realização da identificação molecular mediada por sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S, entre eles: C23, C25, C52, C73, C74, TH1, FB2, FOB1, FOB3, FB3, FCE, RA4, FA1, RIZA1, RIZA2, RIZPT1, TPT5, RPT3, IPT2, LR1, RPT1, RA3, IPT3 e RS1. Esses isolados foram selecionados devido a diversidade do perfil de tolerância que apresentaram, com características e origens diferentes.

**TABELA (5):** Isolados selecionados para a realização do sequenciamento 16S.

Fonte	ID	UVC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Metais	pH	Biofilme	KbrO <sub>3</sub>
Solo	C23	-	-	-	x	x	x
Solo	C25	x	-	-	x	x	x
Solo	C52	x	-	-	-	x	x
Solo	C73	x	-	-	-	x	x
Solo	C74	x	-	x	x	x	x
Flores	FA1	-	-	x	x	x	x
Flores	IPT2	-	x	-	-	x	x
Flores	IPT3	-	x	-	-	x	x
Flores	FB2	-	-	x	x	x	x
Flores	FB3	x	x	x	x	x	x
Folha	FoB1	-	x	x	x	x	x
Folha	FoB3	x	x	-	x	x	x
Folha	FCE	-	x	x	-	x	x
Folha	LR1	-	-	x	x	x	x
Folha	TH1	x	-	-	x	x	x
Raiz	RA3	-	-	x	x	x	x
Raiz	RA4	-	-	x	x	x	x
Raiz	RPT1	-	x	-	x	x	x
Raiz	RPT3	x	-	-	x	x	x
Raiz	RIZPT1	x	x	x	x	x	x
Raiz	RS1	x	-	-	x	x	x
Rizosfera	RIZA1	x	x	x	-	x	x
Rizosfera	RIZA2	-	-	-	-	x	x
Tubérculo	TPT5	x	-	-	x	x	x

**Legenda:** Isolados selecionados para a realização do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S, conforme a tolerância aos diversos agentes utilizados. (X) representa os isolados mais tolerantes.

Os isolados foram submetidos a reações de PCR, foram utilizados oligonucleotídeos complexos compostos por: sequência forward 5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3' e reverse 5' CCGTCAATYYTTTRAGTTT 3' para amplificar a região V4 – V5 (FOUHY *et al.*, 2016). A concentração de DNA foi padronizada através dos valores obtidos no NanoDrop Lite Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific™ e as amostras foram então diluídas para a concentração de 20ng/μl. Para cada corrida de PCR foram adicionados 3μL do tampão, acrescidos de MgCl<sub>2</sub> (10x), 1,13μL de DNTP (10nM), 4,5μL dos primers forward e reverse (10pM), 0,48μL de Taq DNA polimerase (5μl), 1μL do DNA genômico em uma concentração de 20ng/μL e 15,36μL de água ultrapura. A amplificação do DNA foi realizada através do termociclador Biocycler®, as amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 5 min por 94°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C, e um ciclo final de 5 min a 72°C. Após a finalização dos ciclos as regiões de DNA amplificadas foram analisadas em relação a sua integridade, através de gel de agarose 0,8%, utilizando 5μl do produto de PCR para avaliação da qualidade.

As amostras foram sequenciadas no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica, da UNESP Jaboticabal. Foi utilizado o Método de Sanger, através do sequenciador automático de primeira geração, o equipamento possui 96 capilares e tem por identificação, o modelo ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)). As sequências de DNA foram comparadas pelo programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), a fim de buscar similaridade entre o banco de dados e as sequências FASTA (ALTSCHUL, 1990).

### **3.9.2. Análise das sequências de DNA**

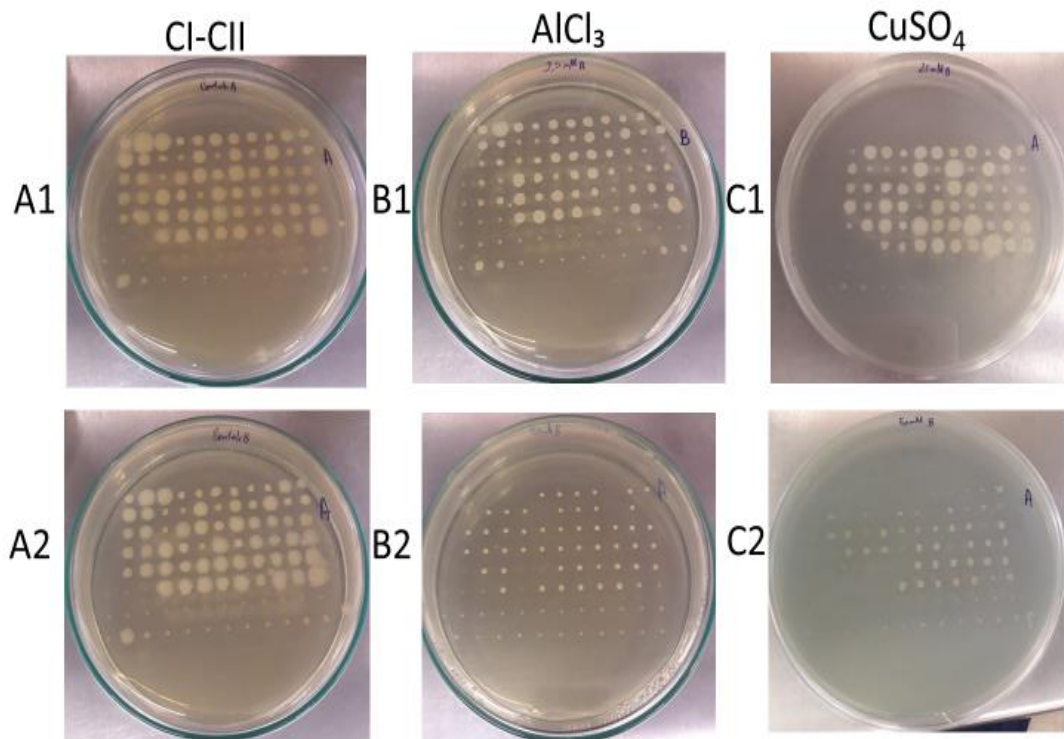
As sequências FASTA obtidas passaram por uma avaliação de qualidade e por meio do Programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation) os nucleotídeos indefinidos representados por (N) foram eliminados nas extremidades das sequências. As sequências FASTA das amostras foram então comparadas através do programa BLASTn, no banco de dados de sequências de RNAs ribossomais 16S, disponível no portal NCBI (National Center For Biotechnology Information). Os valores mais altos de cobertura, percentual de identidade, e-value e score, foram os critérios na identificação do gênero bacteriano apresentado pela sequência.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Tolerância a metais e arsênio**

Os ensaios de tolerância bacteriana a metais e arsênio foram realizados em placas como ilustrado na FIG. (4). Os experimentos foram realizados em duplicata e em dias alternados, respeitando o critério de tolerância onde somente o isolado que cresceu nas quatro placas foi considerado tolerante. Nas figuras 4, 5, e 6 demonstramos duas placas de concentrações diferentes para cada metal analisado, uma intermediária e a de concentração máxima.

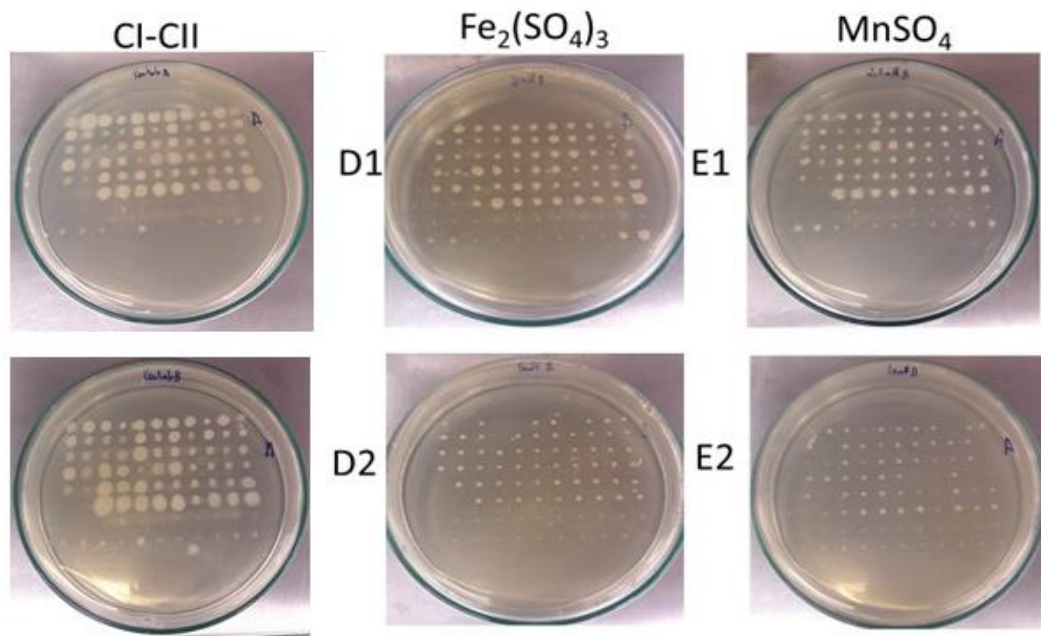
Pela análise de FIG. (4), as placas A1 e A2 representam o controle do ensaio, em que podemos observar que todos isolados cresceram, ou seja estavam viáveis. As placas identificadas como B1 e B2, respectivamente, representam bactérias que foram tratadas com 2,5mM (B1) em que todas as bactérias cresceram e 5mM (B2) de Cloreto de alumínio III onde é possível visualizar a diminuição do tamanho das colônias bem como o não crescimento de algumas bactérias. As placas (C1) e (C2) representam o crescimento bacteriano em sulfato de cobre. Pode-se notar que o metal modifica a cor do meio de cultivo, visto que o mesmo assume coloração azulada. A placa de concentração 2,5mM (C1) demonstra bactérias com tolerâncias diversas. A placa de concentração 5mM (C2) demonstra que o aumento da concentração do metal diminui bastante a quantidade de isolados tolerantes, bem como o tamanho das colônias.



**FIGURA (4):** Ensaio de tolerância dos isolados bacterianos a diferentes concentrações de metais. A1 e A2 (CI- CII - Controle Negativo); B) Cloreto de alumínio (B1: 2,5mM, B2:5mM; C) Sulfato de cobre (C1:2mM, C2:5mM). As bactérias foram inoculadas pelo uso de multinoculador em meio de cultura LB sólido e incubadas em B.O.D. à 28°C por 24 hs.

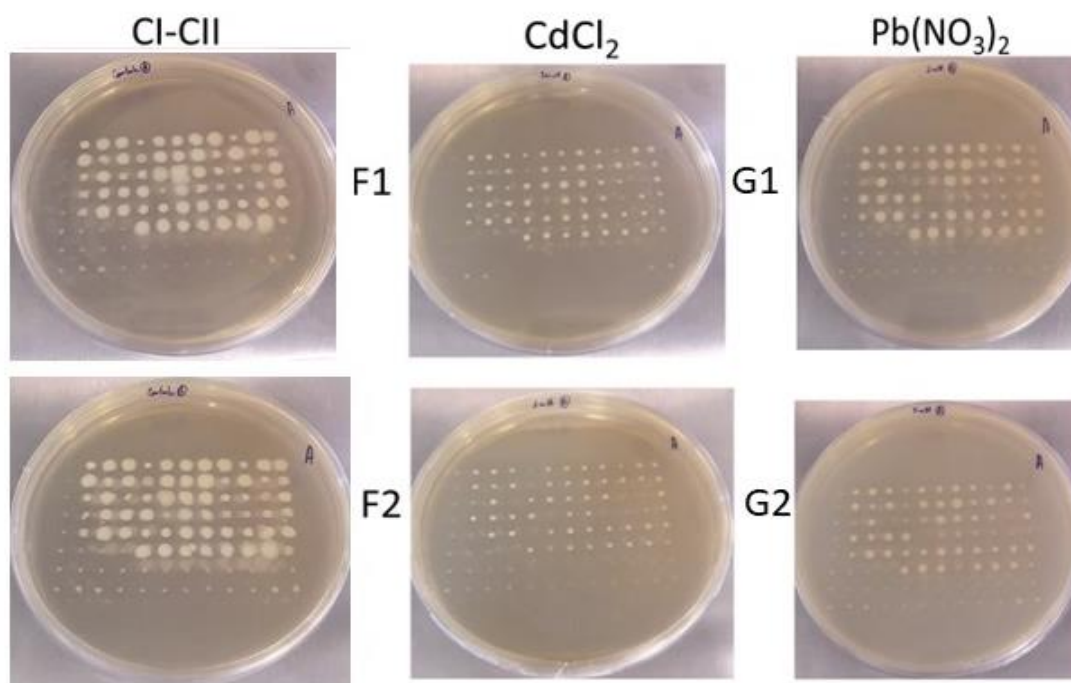
O perfil de tolerância a Fe e Mn são apresentados na FIG. (5). As placas D1 e D2 correspondem ao metal cloreto de ferro III, as concentrações utilizadas foram 2,5mM (D1) e 5mM (D2). A placa de 2mM (D1) apresentou todos os isolados tolerantes ao metal e a placa de concentração 5mM (D2) demonstrou grande diminuição do halo dos isolados em relação às placas controle (CI e CII), mostrando assim que o metal afeta o crescimento das bactérias. A placa de concentração 2mM (D2) demonstra alguns isolados que não desenvolveram e também a visível diminuição dos halos. Foram realizados testes com concentrações maiores (7,5mM), porém não houve crescimento de nenhum isolado testado.

Nas placas E1 e E2 é apresentado os resultados de bactérias tratadas com sulfato de manganês. As concentrações realizadas foram de 2,5mM (E1) e 5mM (E2). Pode-se visualizar o crescimento de todas os isolados na placa de concentração 2,5mM (E1), porém na placa de concentração 5,0mM (E3) alguns isolados não cresceram e a tolerância diminuiu. Foi realizado o teste na concentração de 7,5mM, porém não houve crescimento.



**FIGURA (5):** Ensaio de tolerância dos isolados bacterianos a diferentes concentrações de metais. CI-CII - Controle Negativo, D) Cloreto de Ferro III (D1: 2,5mM e D2:5mM) e E) Sulfato de manganês (E1: 2,5mM e 5,0mM); As bactérias foram inoculadas pelo uso de multinoculador em meio de cultura LB sólido e incubadas em B.O.D. à 28°C por 24 hs.

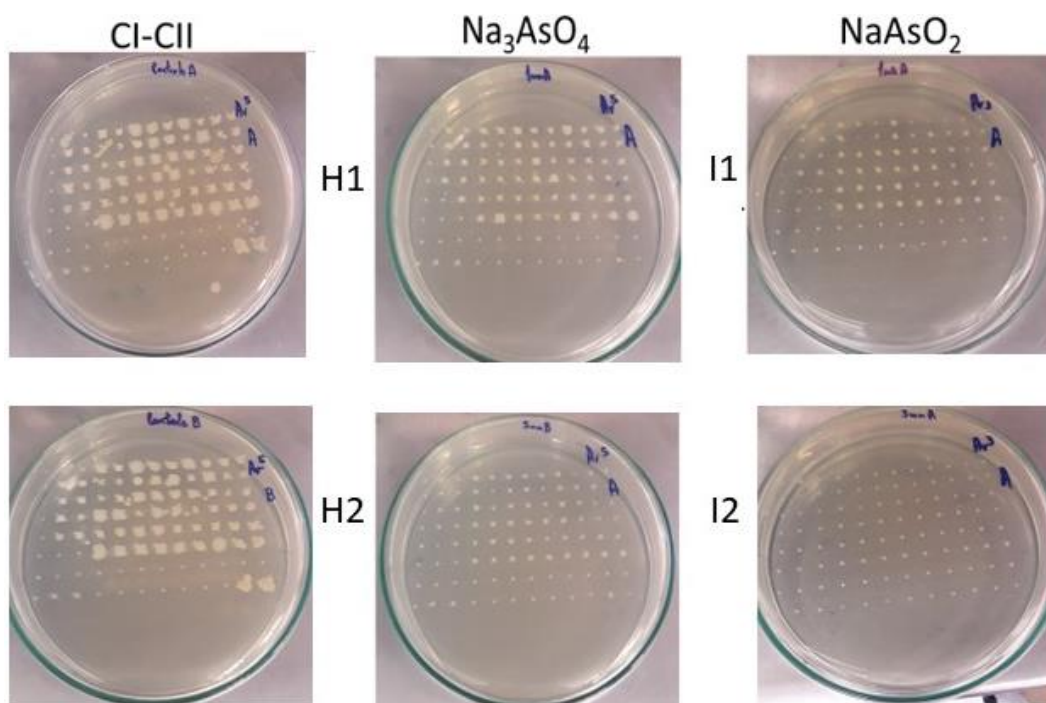
Ensaio com o cloreto de cádmio também foram realizados e são apresentados na FIG. (6), porém em concentrações menores devido a alta toxicidade do metal. As concentrações utilizadas foram 250µM (F1) e 1,0mM (F2). É possível verificar que existe crescimento na placa (F1) em quase todos os isolados, porém de halos pequenos, portanto de menor tolerância. Na menor concentração 250µM (F1) os isolados TH1, TPT3, FOB2, C71 e C53 não cresceram e na concentração de 1mM (F2) os isolados C13, C24, C52, C71, C 72, FCE, FG2, FOB1, FOB2, FOB3, IPT3, RCE3, RPT3, TH1 não cresceram. Na FIG (6) também apresentamos os resultados de tolerância ao Nitrato de Chumbo. Os isolados foram expostos às doses 2,0mM (G1) e 5,0mM (G2). Todas as amostras apresentaram tolerância até 5mM. Nenhum isolado foi tolerante à dose de 10mM. Nas amostras IPT2 e FCE detectamos o escurecimento na cor da colônia.



**FIGURA (6):** Ensaio de tolerância dos isolados bacterianos a diferentes concentrações de metais. CI-CII - Controle Negativo, F) Cloreto de Cádmio (C: 250µM e 1,0mM ) e G) Nitrato de chumbo: (2,0 mM e 5,0mM). As bactérias foram inoculadas pelo uso de multinoculador em meio de cultura LB sólido e incubadas em B.O.D. à 28°C por 24 hs.

Na FIG. (7) ilustramos os resultados de tolerância ao Arsênio. A tolerância ao arsenato de sódio nas concentrações 1,0mM e 5mM estão representadas em H1 e H2, respectivamente. Pela análise da placa (H1) observamos crescimento de todos os isolados. Já a 5mM na placa (H2), observamos o crescimento somente dos isolados: C14, C21, C25, C34, C42, C43, C53, C73, C74, FA1, FB2, FB3, FCE, FOB3, IPT1, IPT2, IPT3, LR1, P1, RA4, RCE2, RCE3, RCE4, RIZA1, RIAZ2, RIAZ1, RIZPT3, TPT1, TPT2, TPT3, TPT5, TH1, porém com halo muito pequeno. O fato demonstra que as bactérias investigadas não são muito tolerantes ao arsenato de sódio. Em relação ao arsenito de sódio, foram testadas as concentrações de 1,0mM (I1) e 5,0mM (I2), porém os isolados foram tolerantes apenas a concentração de 1mM.



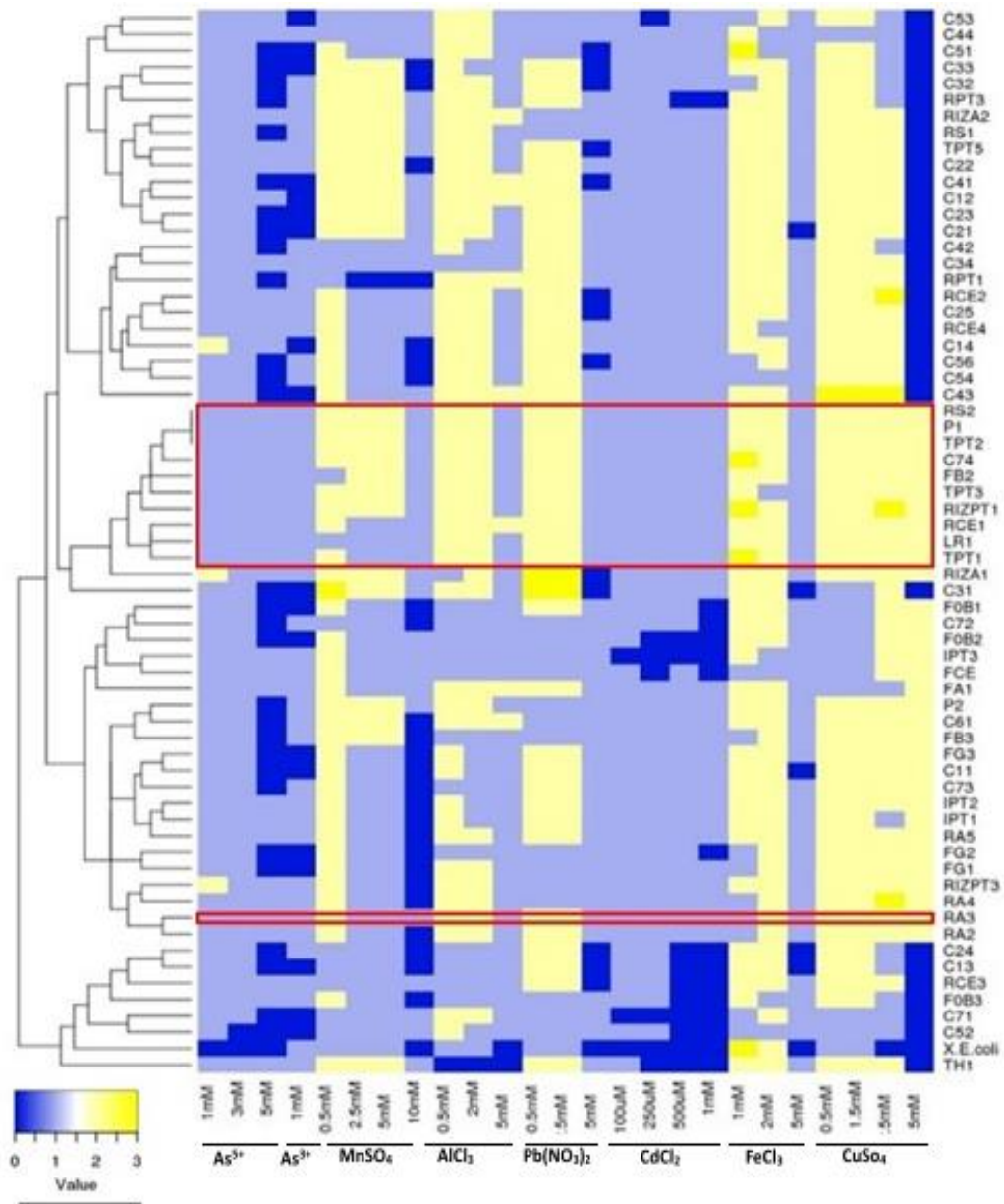


**FIGURA (7):** Ensaio de tolerância dos isolados bacterianos a diferentes concentrações de metais. CI-CII - Controle Negativo, H) Arsenato de Sódio (H1: 1,0 mM, H2: 5,0 mM) e I) Arsenito de sódio (I1: 1,0 mM e I2: 5mM). As bactérias foram inoculadas pelo uso de multinoculador em meio de cultura LB sólido e incubadas em B.O.D. à 28°C por 24 hs.

A capacidade de sobrevivência dos isolados em ambientes contaminados com metais e arsênio acabam por selecionar os microrganismos mais tolerantes e excluir os menos tolerantes. Os isolados investigados neste projeto apresentaram tolerâncias distintas aos metais e ao arsênio. Na FIG. (8) apresentamos a análise dos perfis de tolerância por heatmap, em que as amostras são agrupadas de acordo com as suas características similares.

De maneira geral podemos observar que os isolados testados apresentaram maior tolerância a cloreto de ferro III, cloreto de cádmio, nitrato de chumbo e cloreto de alumínio. Em vermelho estão destacados os isolados P1, RS2, TPT2, C74, FB2, TPT3, RizPT1, LR1, TPT1 e RA3 que apresentaram crescimento bacteriano a todos os metais e arsênio e em todas as doses testadas.

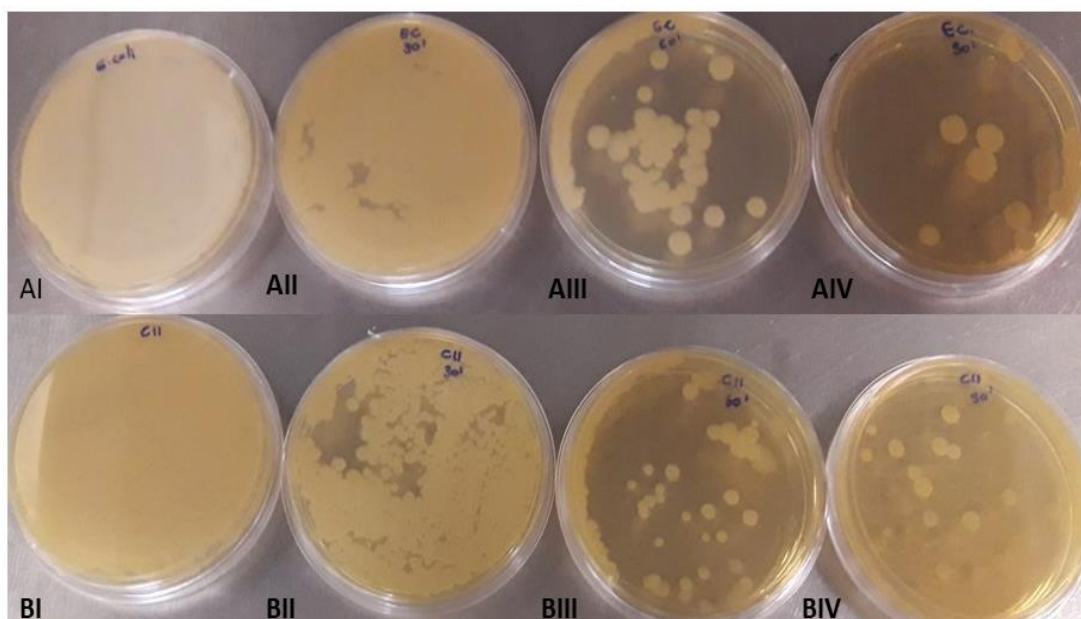




**FIGURA (8):** Análise de tolerância a diferentes doses metais (Mn, Al, Pb, Cd, Fe e Cu) e Arsênio. Os resultados são expressos através de mapas de calor. Os dados foram gerados com o uso do Best informatics Software. Os níveis de tolerância são expressos em cores em escala de azul a amarelo, sendo (0) Azul escuro - sem crescimento bacteriano, (1) azul claro - pequena tolerância, (2) amarelo claro - tolerância média e (3) amarelo escuro - apresentam os isolados de maior tolerância. No HeatMap é possível visualizar em X as doses utilizadas para cada metal e em Y ao lado direito, os isolados testados. Os isolados que possuem características próximas de tolerância, tendem a se agrupar e com isso conseguimos identificar os isolados semelhantes através das cores. Nas caixas vermelhas estão destacados os isolados mais tolerantes aos diferentes metais testados.

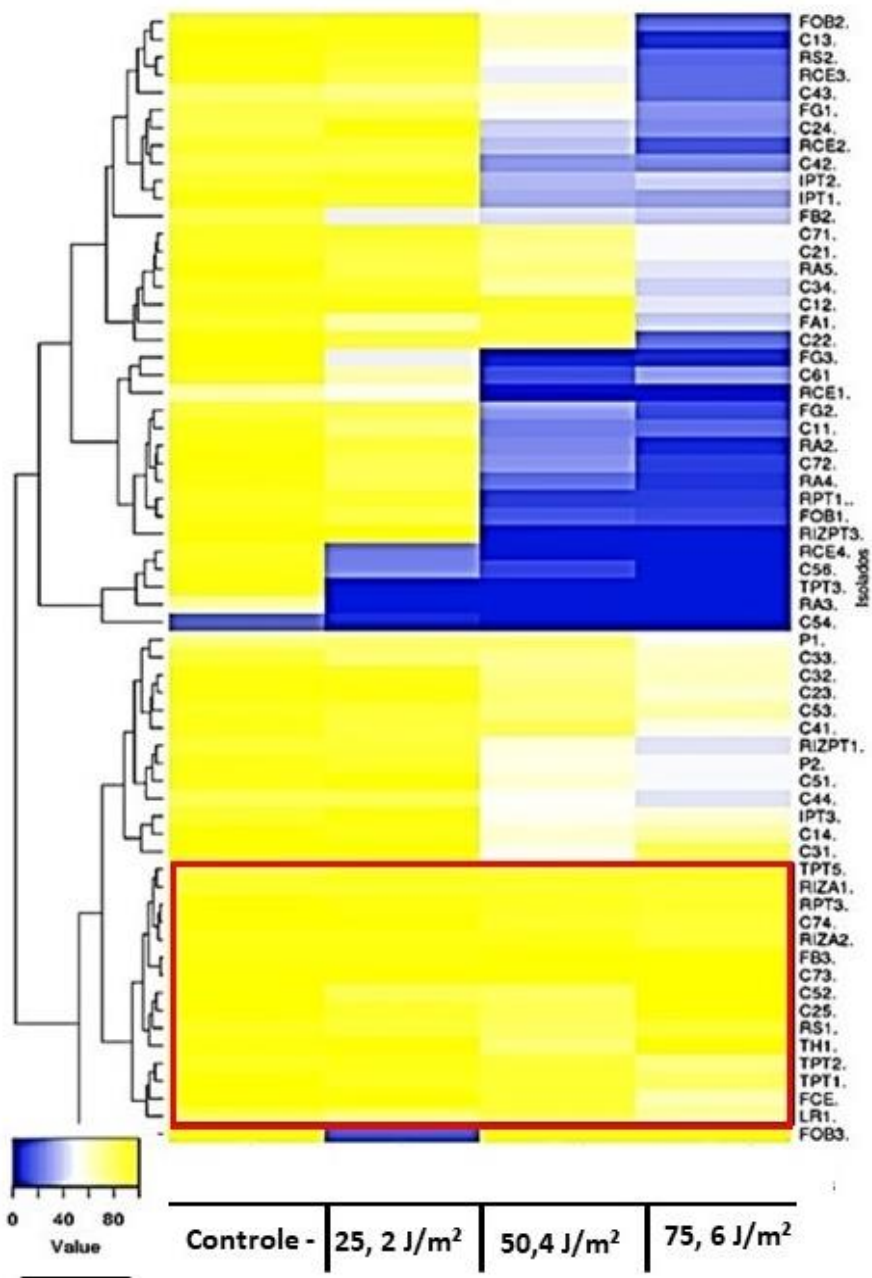
## 4.2. Tolerância a Luz UVC

O ensaio de tolerância bacteriana a luz UVC, demonstra que cada isolado possui um grau de tolerância diferente à radiação. A FIG. (9) ilustra duas bactérias distintas, *Escherichia coli* e o C11 tratados com 25,2 J/m<sup>2</sup> (AII e BII); 50,4 J/m<sup>2</sup> (AIII e BIII) e (75,6) J/m<sup>2</sup> (AIV e BIV) em relação à placas controle (AI e BI). A análise das imagens demonstra que o aumento da dose de exposição a UVC, diminui consideravelmente o crescimento bacteriano.



**FIGURA (9):** Análise de tolerância a UVC. As placas representam os resultados de dois isolados *Escherichia coli* (A) e C11 (B), expostos à luz UVC. Isolados controle sem exposição a UVC (AI e BI), 25,2 J/m<sup>2</sup> (AII e BII); 50,4 J/m<sup>2</sup> (AIII e BIII) e (D) 75,6 J/m<sup>2</sup> (AIV e BIV).

Pela análise dos resultados de tolerância dos diferentes a luz UVC também construímos um mapa de calor (HeatMap), que nos permite visualizar os dados de forma global, além de agrupá-los conforme a tolerância à UVC nas diferentes doses de exposição, FIG. (10). Os isolados destacados em vermelho apresentaram um crescimento  $\geq 60\%$  quando expostos a dose de 75,6 J/m<sup>2</sup>. Os isolados destacados são, TPT5; RIZA1; RPT3; C74; RIZA2; FB3; C73; C52; C25, RS1; TH1; TPT2; TPT1; FCE e LR1. Quando comparamos os perfis de tolerância dos isolados aos metais e luz UVC, podemos observar que as bactérias TPT2 e LR1 apresentaram também, tolerância a todos os ensaios de tolerância aos metais pesados e ao arsênio.



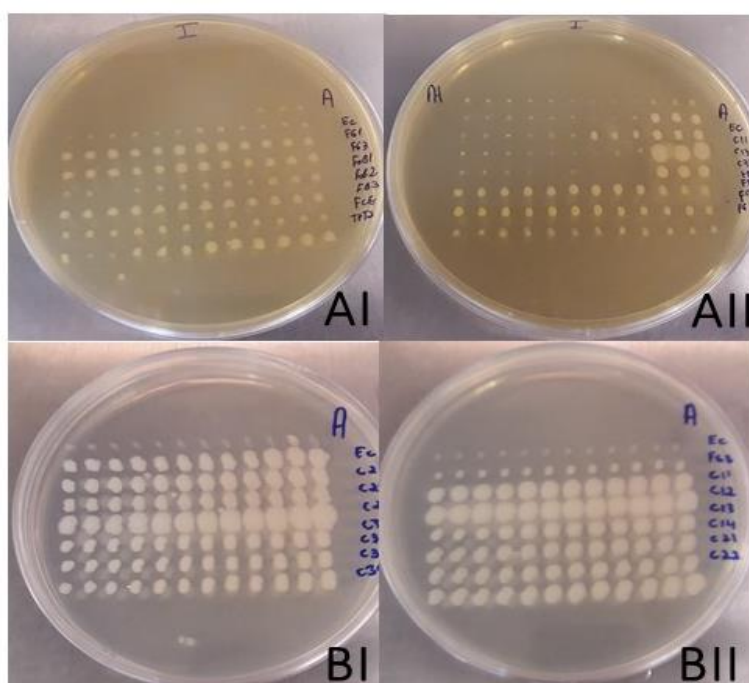
**Figura (10):** Análise de tolerância a diversas doses de luz UVC. Os dados foram gerados com o uso do Best informatics Software. Esse HeatMap possui uma escala de porcentagem de crescimento bacteriano de 0 a 100, quando mais próximo da faixa azul, menor a tolerância do isolado e quanto mais amarelo maior tolerante é a bactéria. Em X estão representadas as doses que os isolados foram submetidos. Controle, 25,2 J/m<sup>2</sup>, 50,4 J/m<sup>2</sup> e 75,6 J/m<sup>2</sup>, Em Y do lado direito, os isolados que foram investigados. Em vermelho estão destacados os isolados tolerantes a todas as doses de luz UVC.

### 4.3. Ensaio de tolerância a agentes oxidantes

Os ensaios de tolerância a agentes oxidantes foram realizados pela exposição dos isolados ao peróxido de hidrogênio e bromato de potássio, drogas que induzem mecanismos redox distintos nos organismos tratados.

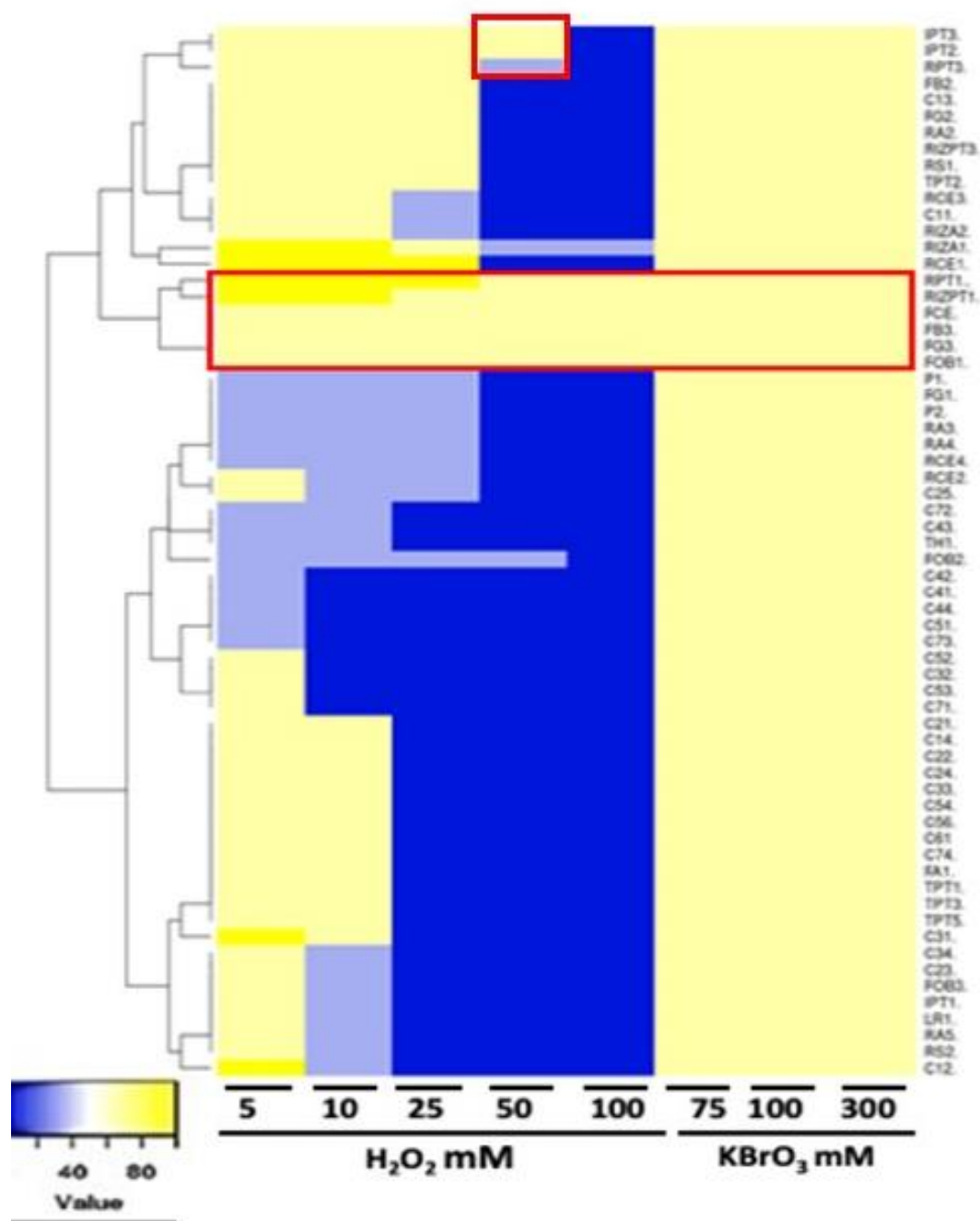
As placas exemplificadas na FIG (11) ilustram o ensaio de tolerância ao peróxido de hidrogênio, onde a cada três poços representam o controle e a dose utilizada (como descrito nos materiais e métodos). Nas placas AI e AII é possível visualizar os isolados que apresentam maior tolerância, como o isolado FB3, e os isolados que apresentam menor tolerância, como o isolado C11. As três primeiras colunas demonstram o controle do experimento onde o isolado não foi exposto ao peróxido de hidrogênio.

Nas placas BI e BII representamos o ensaio de tolerância ao bromato de potássio, as placas demonstram que todos os isolados cresceram em todas as doses utilizadas, mantendo o mesmo tamanho de halo mesmo quando submetidos a concentrações diferentes de bromato de potássio.



**FIGURA (11):** As placas acima representam o ensaio de tolerância ao peróxido de hidrogênio (AI e AII) e Bromato de Potássio (BI e BII).  $H_2O_2$  - 25mM, 50mM e 100mM e  $KBrO_3$  - 75mM, 100mM e 300mM. As bactérias foram submetidas ao peróxido de hidrogênio e ao bromato de potássio por 30 min e plaqueadas em meio LB sólido, após o período de incubação o resultado é tabelado através da medição do tamanho da colônia com a utilização do paquímetro.

A partir dos resultados de tolerância dos diferentes isolados aos agentes oxidantes, construímos um mapa de calor que está apresentado na FIG. (12). Grande parte dos isolados foram tolerantes ao peróxido de hidrogênio para concentração de 5mM, esta tolerância decaiu com o aumento da dose da droga, sendo os isolados RPT1; RIZPT1; FCE; FB3; FG3 e FOB1 tolerantes a 100mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em relação ao bromato de potássio, todos os isolados cresceram na presença da droga, nas doses de 75mM, 150mM e 300mM. É interessante destacar que isolados RPT1, RIZPT1, FCE, FB3, FG3 e FOB1 que apresentaram maior tolerância ao peróxido de hidrogênio foram coletados de amostras de plantas. Nenhum isolado coletado de solo de Canga foi tolerante às doses maiores que 25mM de peróxido de hidrogênio. Além disso, os isolados FCE e RIZPT1 apresentaram também, tolerância a todos os metais pesados testados.



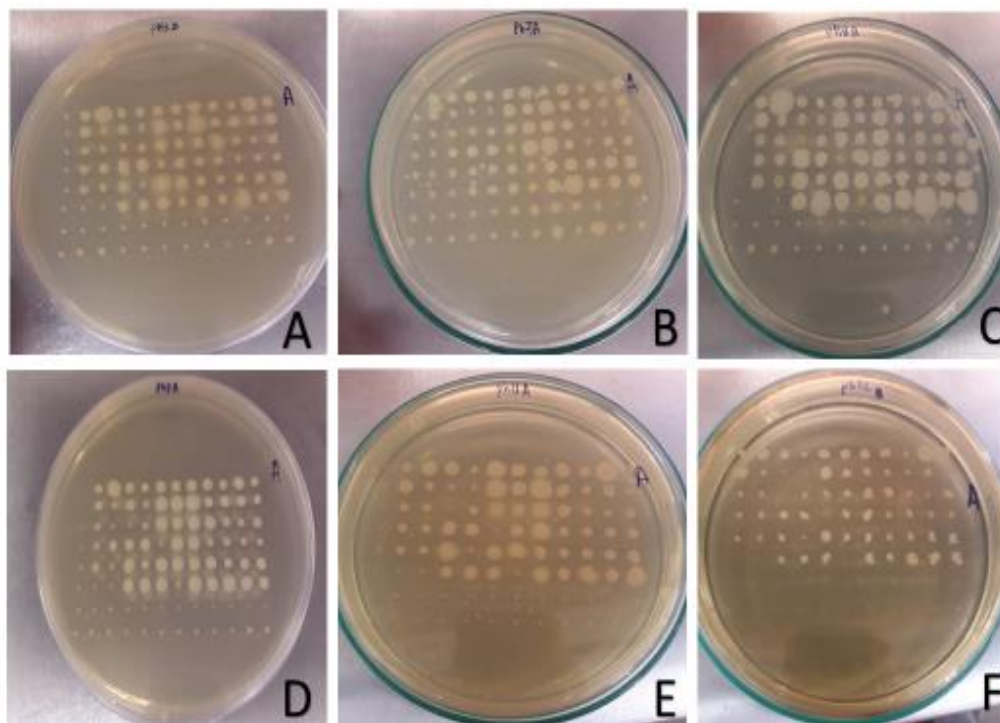
**FIGURA (12):** Análise de tolerância a diferentes doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5mM, 10mM, 25mM, 50mM e 100mM) e KBrO<sub>3</sub> (75 mM, 150mM e 300mM). Os dados foram gerados com o uso do Best informatics Software. Os níveis de tolerância são expressos em cores em escala de azul a amarelo, sendo (0) Azul escuro - significa que não houve crescimento bacteriano, (1) azul claro - pequena tolerância, (2) amarelo claro - tolerância média e (3) amarelo escuro - apresentam os isolados de maior tolerância. Abaixo, em X, estão as doses utilizadas para cada substância e ao lado direito, em Y, os isolados testados. Em vermelho estão os isolados tolerantes a todas as doses testadas.



#### 4.4. Tolerância ao pH

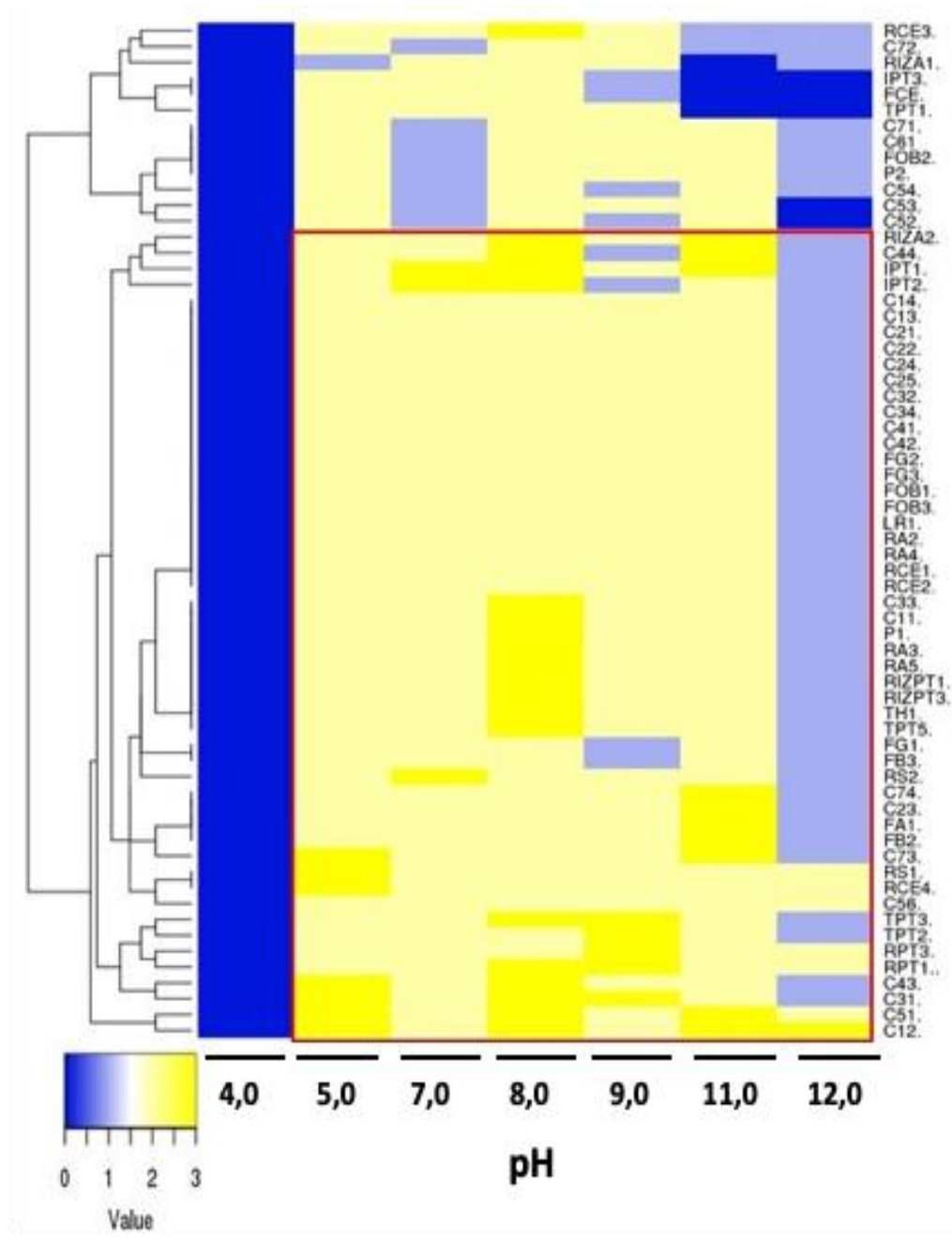
Prosseguindo com as avaliações de tolerância, verificamos a capacidade de crescimento das bactérias em diferentes pHs: 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 12,0. Conhecer as faixas de crescimento dos isolados em diferentes pHs é bastante interessante, pois nos permite prever a capacidade de crescimento que cada isolado possui em diferentes taxas de pH, podendo ser aplicado em processos específicos, como na biorremediação, por exemplo.

Somente no pH 4 apresentaram crescimento bacteriano, pois devido a acidez do meio de cultura, o meio LB líquido não solidifica, impossibilitando a realização do experimento. Na FIG. (13) estão apresentados os resultados do crescimento bacteriano ao pH 5 (A), Ph 7 (B) utilizada como controle do meio de cultura, pH 8 (C), pH 9 (D), pH 11 (E) e pH 12 (F).



**FIGURA (13):** Análise de tolerância a diversas faixas de pH. Bactérias cultivadas em pH 5 (A), Ph 7 (B), pH 8 (C), pH 9 (D), pH 11 (E) e pH 12 (F). As bactérias foram inoculadas com o multinoculador em meio de cultura LB sólido e incubadas em B.O.D. à 28°C por 24 hs.

A partir dos resultados de tolerância dos diferentes isolados aos pHs testados, construímos um mapa de calor que está apresentado na FIG. (14). Podemos observar que muitos isolados são tolerantes a uma larga faixa de pH (destacados pela caixa vermelha na figura), os isolados em pH 12,0, são menos tolerantes.



**FIGURA (14)** Análise de crescimento bacteriano em meios de cultivo nos pHs: 5,0; 7,0; 8,0; 9,0; 11,0 e 12,0. Os dados foram gerados com o uso do Best informatics Software. Os níveis de tolerância foram expressos em cores em escala de azul a amarelo, sendo (0) Azul escuro – significa que não houve crescimento bacteriano, (1) azul claro – pequena tolerância, (2) amarelo claro – tolerância média e (3) amarelo escuro – apresentam os isolados de maior tolerância. Abaixo, em X, estão as faixas de pH utilizadas para cada isolado e do lado direito, em Y, os isolados. Em vermelho estão os isolados mais tolerantes as faixas de pH utilizadas.

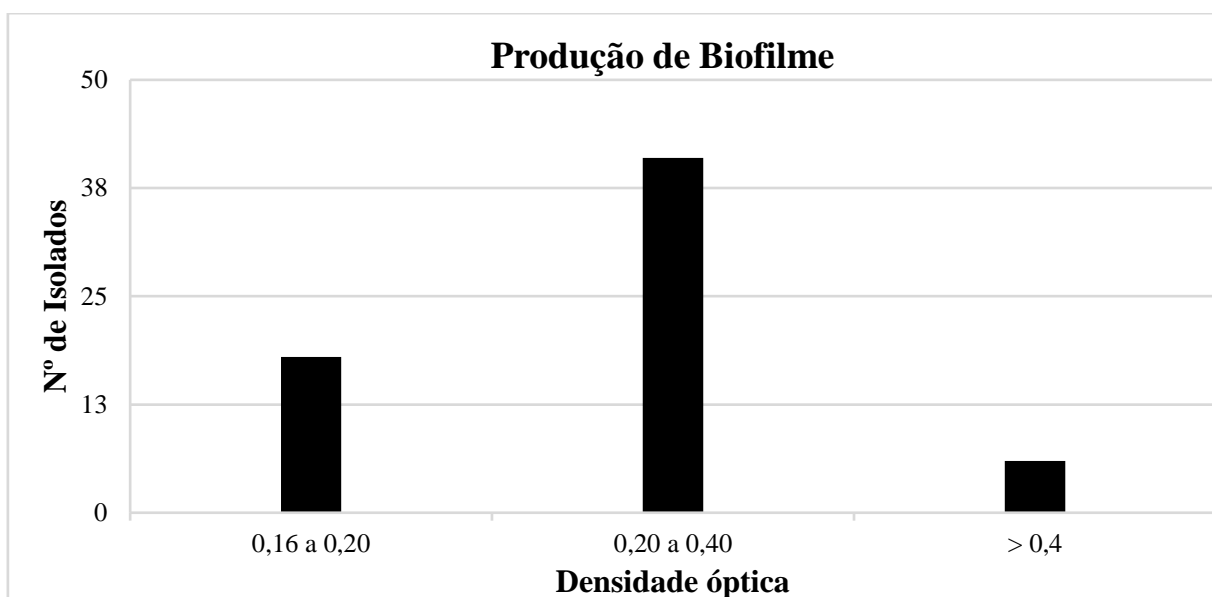


#### 4.5. Produção de Biofilme

Todos os 64 isolados submetidos ao ensaio de produção de biofilme apresentaram resultado positivo, que foi verificado através da relação entre a densidade óptica de 550nm e OD de 600nm. Os valores de absorbância obtidos variaram de 0,15 a 1,56. Valores de até 0,16 de absorbância foram considerados como baixa produção de biofilme, valores entre 0,20 a 0,40, produção moderada e valores acima de 0,40 como alta produção de biofilme, como mostrado no GRÁFICO (1). Dos isolados testados neste trabalho, dos 64, 18 apresentaram alta produção de biofilme, 41 média produção e 8 baixa produção de biofilme.

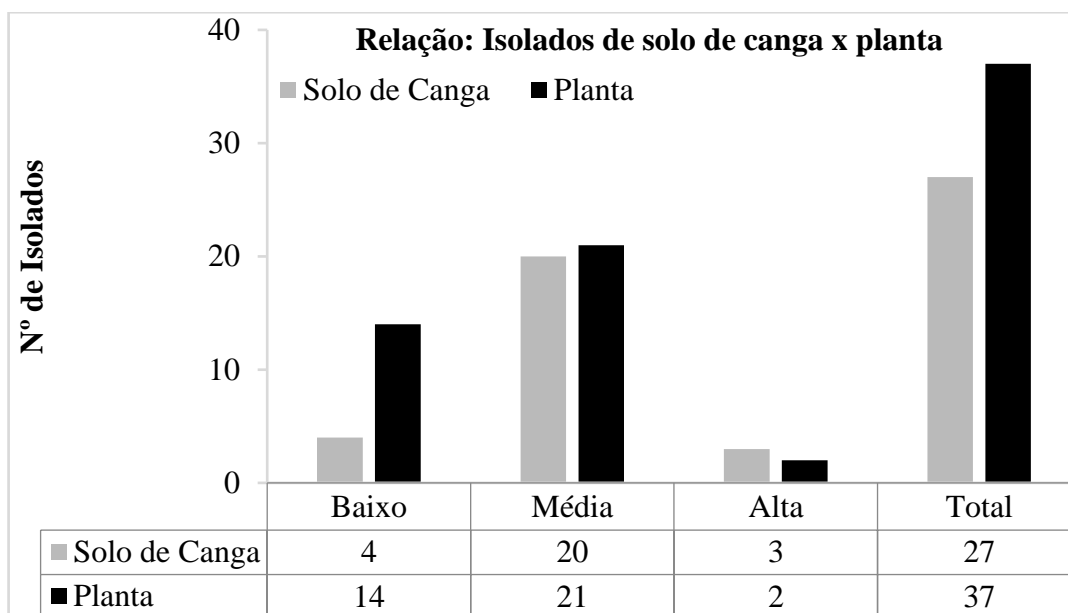
Em relação às bactérias formadoras de biofilme, a partir da análise do GRÁFICO (2), foi possível verificar que a produção foi maior em isolados coletados de plantas do que em isolados que foram coletados de amostras de solo de canga.

**GRÁFICO (1):** Produção de biofilme dos isolados



**Legenda:** O gráfico demonstra a produção de biofilme pelos isolados. Os valores entre 0,16 a 0,20 indicam baixa produção de biofilme, valores de 0,20 a 0,40 produção moderada e a partir de 0,40, alta produção de biofilme. O controle utilizado apresentou 0,40 indicando média produção de biofilme. Dos 64 isolados, 18 apresentaram alta produção de biofilme, 41 média produção e 8 baixa produção de biofilme.

**GRÁFICO (2):** Produção de biofilme dos isolados coletados de solo de canga e os isolados de plantas.

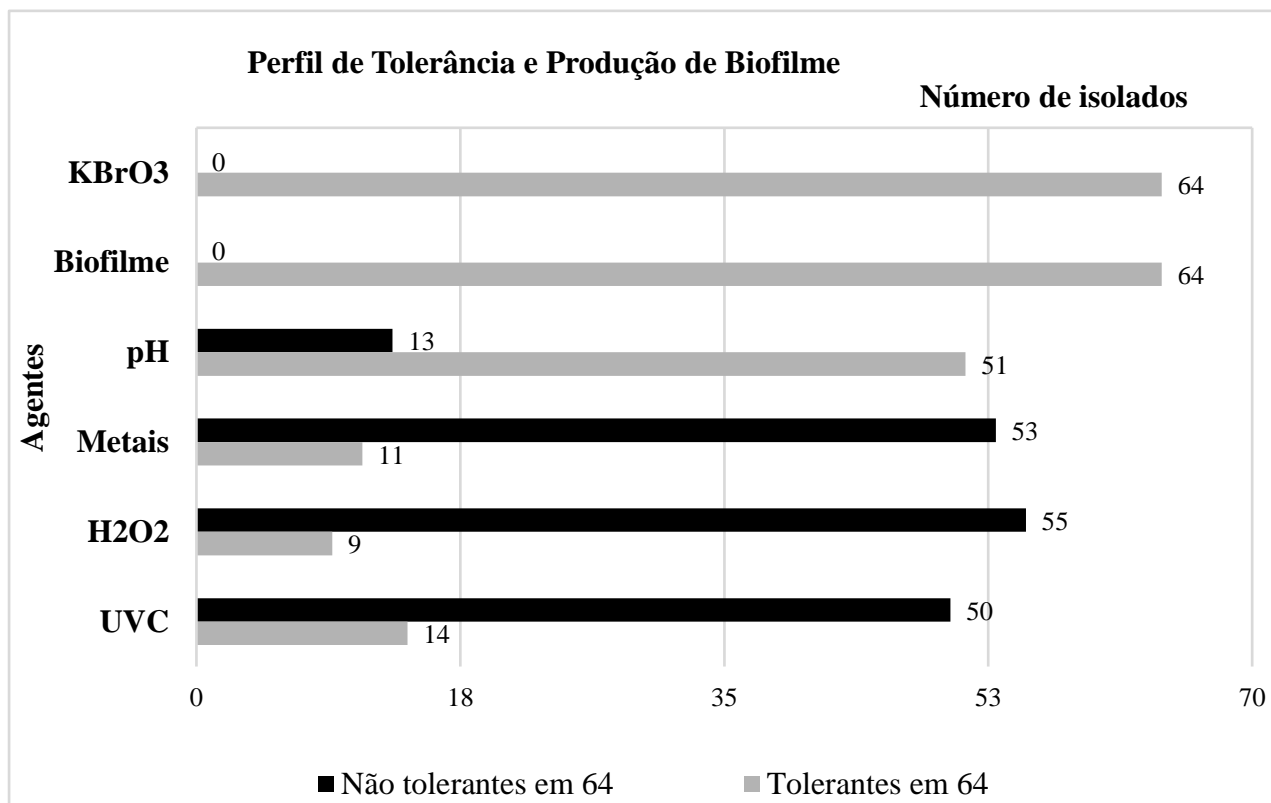


**Legenda:** Comparação entre a produção de biofilme por isolados coletados de solo de canga e de plantas. Podemos verificar que dos 64 isolados, apesar da quantidade maior de isolados ser oriunda de plantas, quando comparamos a produção de biofilme em relação as faixas alta, média e baixa, os isolados coletados de plantas apresentaram a maior produção.

#### 4.6 Análise global dos resultados de tolerância

Ao término dos ensaios de tolerância, os resultados foram analisados conjuntamente e comparados. Inicialmente, comparamos o perfil de tolerância de todos os isolados em relação aos agentes testados. O GRÁFICO (3) indica o perfil de tolerância dos isolados frente aos agentes utilizados e podemos verificar que em relação ao agente oxidante bromato de potássio todos os isolados possuem tolerância e também todos são produtores de biofilme. Além disso, quanto à exposição a luz UVC, metais, pH e peróxido de hidrogênio, o número de isolados tolerantes é parecido estando na faixa de de 9 a 14 isolados em um total de 64 isolados testados.

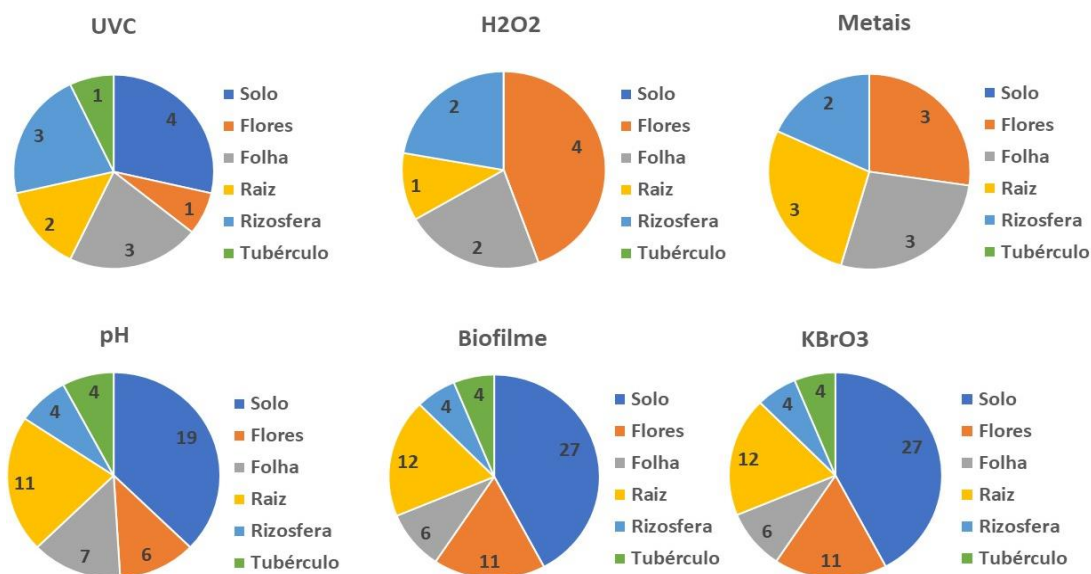
**GRÁFICO (3):** Perfil global de tolerância dos 64 isolados utilizados nos ensaios.



**Legenda:** Perfil de tolerância geral dos isolados frente a exposição aos agentes KBrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH, metais e a capacidade de produção de biofilme.

Em seguida, o perfil de tolerância, das bactérias que se mostraram tolerantes, foi analisado levando-se em conta a origem destes microrganismos. Pela análise do GRÁFICO (4) é possível visualizar que a resistência entre os isolados pode estar relacionado à sua origem e ao agentes tóxicos que foram utilizados, produzindo valores de tolerâncias diferenciados. Os isolados que foram coletados de amostras de solo de canga apresentaram maior tolerância aos agentes, com exceção ao peróxido de hidrogênio, onde os isolados mais tolerantes foram originados de flores. Em relação à tolerância aos metais, podemos observar uma não prevalência da origem dos isolados, que foram prospectados de solo, flores, raiz e folha.

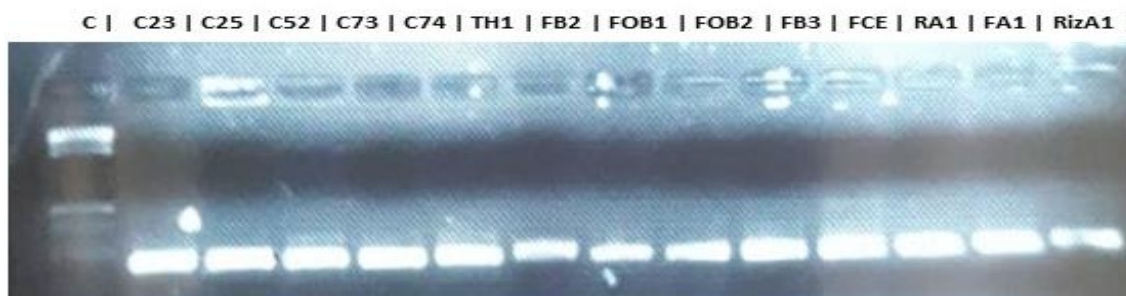
**GRÁFICO (4):** Comparação dos isolados mais tolerantes em relação à origem:



**Legenda:** Origem dos isolados tolerantes a  $\text{KBrO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH, Metais e que apresentaram produção de biofilme.

#### 4.7 Resultados extração de DNA e PCR

As amostras extraídas foram analisadas em relação a qualidade do DNA e a amplificação, conforme a imagem do gel de agarose da FIG. (15). Observa-se no gel de agarose, bandas bem definidas para todas as amostras e com o peso molecular esperado (~1400 bp) prontas para a realização do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório CREBIO para a realização do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S.



**FIGURA (15):** Gel de agarose do produto de PCR, demonstrando a amplificação do gene 16S rDNA dos isolados C23, C25, C52, C73, C74, TH1, FB2, FOB1, FOB2, FB3, FCE, RA1, FA1, RIZA1.

#### 4.8 Identificação dos isolados

Para a realização do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S, foram selecionados 24 isolados. Os isolados selecionados para a realização do sequenciamento do gene ribossomal 16S apresentaram características distintas. Em relação a tolerância a luz UVC os isolados mais tolerantes a maior dose de radiação foram, FB2, RIZA1, C74, FOB3, C25, RPT3, TPT5, RS1, TH1. Podemos verificar que tanto os isolados coletados de plantas e os coletados de amostras de solo de canga, apresentaram tolerância a dose 75,6 J/m<sup>2</sup>/s de luz UVC. Em relação a tolerância ao peróxido de hidrogênio os isolados FB3, RIZA, FG3, FOB1, FOB3, RPT1, FCE apresentaram tolerância ao peróxido de hidrogênio na concentração de (100mM), em relação aos isolados coletados de solo de canga. Quanto a tolerância aos metais pesados, os isolados C74, FA1, FB2, FB3, FOB1, FCE, LR1, RA3, RA4, RIZPT1, RIZA1 apresentaram tolerância a todos os metais. O crescimento bacteriano nas faixas de pH: 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 12,0 ocorreu nos isolados C23, C25, C74, FA1, FB2, FB3, FOB1, FOB3, LR1, TH1, RA3, RA4, RPT1, RPT3, RIZPT1, RS1 e TPT5 e todos os isolados se mostraram tolerantes ao agente oxidante bromato de potássio. Todos os isolados apresentaram também a produção de biofilme. Devido a essas características diferenciadas, os isolados foram os selecionados para a realização do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S.

A identificação dos isolados através do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S é apresentada conforme a TABELA (6). Não foi possível identificar os isolados, TH1, FOB1, FA1, RIZA2, RIZPT1, RPT1, LR1, RA3 e IPT3 devido a ausência de similaridade adequada entre a sequência FASTA e o banco de dados, havendo a necessidade de repetição das análises. Os demais isolados foram identificados com base no gênero. Apesar do pequeno número de nucleotídeos das sequências, os valores de porcentagem de identidade das amostras são altos, tornando os valores de e-values satisfatórios.

**TABELA (6):** Resultados do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S.

ID LAB	ID 16S	C	P% ID	E- value	Accession	TSS	CP	Gênero/ Espécie
C23	MD 25	100%	96.08%	3,00E-91	<a href="#">NR_119362.1</a>	204	1432	<i>Pantoea sp.</i>
C25	MD 26	100%	100%	2,00E-10	<a href="#">NR_115526.1</a>	33	1426	<i>Bacillus sp.</i>
C52	MD 27	100%	99.09%	5,00E-108	<a href="#">NR_157637.1</a>	220	1484	<i>Lysinibacillus sp.</i>
C73	MD 28	100%	99.25%	2,00E-132	<a href="#">NR_115526.1</a>	267	1486	<i>Bacillus sp.</i>
C74	MD 29	100%	99.35%	6,00E-73	<a href="#">NR_113346.1</a>	155	1460	<i>Acinetobacter sp.</i>
FB2	MD 31	82%	79.87%	1,00E-32	<a href="#">NR_119278.1</a>	186	1452	<i>Klebsiella sp.</i>
FoB3	MD 33	71%	98.09%	5,00E-123	<a href="#">NR_119362.1</a>	365	1497	<i>Pantoea sp.</i>
FB3	MD 34	100%	96.64%	2,00E-65	<a href="#">NR_112774.1</a>	149	1503	<i>Sporolactobacillus sp.</i>
FCE	MD 35	100%	98.44%	2,00E-125	<a href="#">NR_119362.1</a>	257	1495	<i>Pantoea sp.</i>
RA4	MD 36	99%	96.09%	1,00E-115	<a href="#">NR_134685.1</a>	257	1527	<i>Acinetobacter sp.</i>
Riza1	MD 38	5%	94.74%	8.3	<a href="#">NR_122085.1</a>	348	1475	<i>Deffluviitoga sp.</i>
TPT5	MD41	99%	96.55%	0.0	<a href="#">MH_752487.1</a>	524	1062	Banco geral: <i>Pantoea sp.</i>
TPT5	MD 41	4%	90.91%	3.7	<a href="#">NR_158039.1</a>	524	1410	Banco 16s: <i>Vibrio psp.</i>
RPT1	MD 45	41%	79.55%	0.004	NR_043089.1	106	1363	<i>Methanosarcinaceae sp.</i>
RS1	MD 48	99%	99.06%	2,00E-160	<a href="#">NR_115526.1</a>	321	1486	<i>Bacillus sp.</i>

**Legenda:** Caracterização taxonômica dos isolados, conforme o gênero, sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S, foi possível realizar a identificação taxonômica de 15 isolados, sendo 8 isolados de gêneros diferentes. Acesso em 30 de março de 2020. P%: percentual de identidade. C: cobertura, TSS: tamanho da sequência da amostra sequenciada, CP: comprimento do alinhamento.

Através da identificação taxonomia do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S das bactérias podemos verificar a diversidade microbiológica das amostras da região e então explorar ainda mais a região do Quadrilátero Ferrífero, realizando posteriormente o sequenciamento do genoma dos isolados, a fim de caracterizar os mecanismos utilizados por esses microrganismos em relação a capacidade de tolerar agentes tóxicos. Os isolados identificados como *Bacillus sp.*, foram encontrados em amostras de solo de C25, C73 e na amostra de raiz RS1. Os isolados C25 e C73 apresentaram respectivamente valores de cobertura e percentual de identidade de 100%, apresentando tolerância a dose de 75,6 J/m<sup>2</sup>/s de luz UVC, pH, bromato de potássio e apresentando também a capacidade de produção de biofilme. O isolado C73 com um valor de cobertura de 100 % e percentual de identidade de 99,3%, apresentando tolerância aos mesmos agentes genotóxicos que o isolado C25.

Os isolados identificados como C74 com percentual de cobertura de 100% e percentual de identidade de 99,06% e o isolado RA4 com percentual de cobertura de 99% e 96,09 de identidade, foram identificados devido a similiaridade das sequências FASTA, como pertencentes ao gênero *Acinetobacter sp.* Apresentaram tolerância a dose 75,6 J/m<sup>2</sup>/s de luz uvc, aos metais, ao bromato de potássio e são produtores de biofilme. Porém os isolados não foram tolerantes a concentração de (100mM) de peróxido de hidrogênio.

O gênero *Pantoea sp.* foi encontrado no isolado C23 com 100% de percentual de cobertura e 96,8% de identidade, ele se apresentou tolerante a todas as faixas de ph testadas, além da tolerância ao bromato de potássio e também é produtor de biofilme, o isolado FCE apresentou 100% de percentual de cobertura e 98,44% de perfil de identidade esse isolado foi tolerante a maior dose de peróxido de hidrogênio (100mM), aos metais pesados, bromato de potássio e é produtor de biofilme, devido a alta similiaridade desses isolados quando verificados no sistema BLAST, é interessante prosseguir com os experimentos, afim de conhecer as espécies e todas as possibilidades de tolerância que as mesmas possam ter. O isolado FOB3 foi tolerante a todos os agentes testados, tornando se assim um isolado interessante, porém o percentual de cobertura foi de 71% e o perfil de identidade foi de 98,09 %, havendo assim a necessidade de repetir o ensaio como um todo com essa bactéria, antes de prosseguir com análises mais complexas como sequenciamento genômico.

O isolado TPT5 foi tolerante à luz UVC em sua maior dose de 75,6 J/m<sup>2</sup>/s, resistente também a todas as variações de pH e concentração de 300mM de bromato de potássio. Porém foram realizadas duas verificações na plataforma do NCBI/BLAST. A sequência FASTA do isolado TPT5 foi investigada no banco de dados do gene parcial ribossomal 16S e no banco de dados geral da plataforma. Pelo banco de dados 16S foi identificada como bactéria denominada *Vibrio sp.*, com 4% de percentual de cobertura e 90,91% de perfil de identificação. Já, a pesquisa da sequência através do banco geral, foi identificada com um alto percentual de cobertura de 99% e perfil de identidade de 99,55%, sendo pertencente ao gênero *Pantoea sp.* Sendo assim, a repetição do ensaio e do sequenciamento 16S se faz necessária, visto que esse isolado se apresentou como o isolado mais tolerante aos agentes utilizados em relação a outras bactérias.

O isolado RizA1, classificado pelo gênero *Deftluviitoga sp.*, apresentou percentual de cobertura de 5% e 94% de perfil de identidade gerando assim a necessidade de repetição do ensaio e sequenciamento. O isolado RPT1, foi identificado pertencente ao gênero *Methanosarcinaceae sp.* também é importante realizar a repetição dos ensaio de extração e

sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S. O isolado FB3 foi classificado pertencente ao gênero *Sporolactobacillus sp*, com valor de percentual de cobertura de 100% e 96,04% de perfil de identidade, demonstrando alta similiaridade com esse gênero. O isolado coletado de solo de canga C52 foi identificado como *Lysinibacillus sp*, apresentando os valores de cobertura de 100% e o percentual de identidade de 99.09%, obtendo assim uma identificação confiável.



## 5. DISCUSSÃO

Dos 64 isolados selecionados para o desenvolvimento deste projeto, 11 apresentaram maior tolerância a todos os metais utilizados, 51 isolados ao maior número de faixas de pH, 14 isolados apresentaram crescimento bacteriano maior que 60% quando expostos à dose de 75,6 J/m<sup>2</sup> de UVC e 9 isolados apresentaram tolerância ao peróxido de hidrogênio quando expostas a concentração de 100mM. Todas as bactérias apresentaram tolerância ao bromato de potássio na concentração de (300mM), além de serem todas produtoras de biofilme.

Diante dos resultados é possível estimar que essas bactérias possuem mecanismos de tolerância aos agentes compostos utilizados, fazendo com que elas consigam sobreviver mesmo estando em situações adversas. A região do quadrilátero ferrífero é uma região muito antiga, porém pouco estudada, e por isso explorar os microrganismos presentes no local para a ampliação de novos conhecimentos, em busca de tecnologia sustentável através da biotecnologia é uma área de estudo bastante interessante e promissora.

Sabe-se que a indústria da mineração gera uma gama de subprodutos. Dentre os vários subprodutos está a pirita que acidifica a água acelerando assim o processo de solubilização de metais. Os microrganismos que conseguem sobreviver em um ambiente ácido e com a presença de metais pesados, apresentam potencial para serem utilizados como agentes em processos de biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados (CASTRO-SILVA, MARCUS ADONAI *et al.*, 2003). A resistência bacteriana a metais pesados em ambiente de mineração é muito comum entre os microrganismos. Sabe-se que as bactérias dos gêneros *Acidiphilium* e *Acidocella* são capazes de resistir a níveis acima de 1M de vários metais como Cd, Zn, Ni e Cu e que a resistência das bactérias deste gênero é mediada por plasmídeos (GHOSH, S. *et al.*, 1997; MAHAPATRA, N.R.; BANERJEE, P.C., 1996).

Pesquisas científicas sobre diversidade associada ao solo contaminado com metais pesados (cobre, chumbo, zinco, cádmio e bário) identificaram a presença de bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Oxalobacter* e do filo *Gammaproteobacteria*, estas bactérias possuem alta similaridade genética com bactérias encontradas em outros ambientes contaminados, indicando assim, uma seleção por parte do meio ambiente em relação a esses microrganismos presentes em cada região (PALMOROTH *et al.*, 2007). Entre os principais mecanismos de tolerância aos metais destacam-se o sequestro extracelular (biossorção) e intracelular (bioacumulação) (BRUIN *et al.*, 2000). A biossorção é um processo físico - químico de ligação de um poluente à superfície celular, que acontece independentemente de metabolismo. A

bioacumulação acontece como um processo ativo no qual os poluentes acumulam-se no interior da célula. (CHOJNACKA, 2010). A biossorção é um processo passivo, porém de alta complexidade que abrange uma vasta variedade de interações dos metais com as estruturas funcionais da célula (GAAD, 2009). O processo de bioacumulação é um processo onde os íons metálicos são transportados e acumulados no citoplasma da célula bacteriana. Esse processo é comum em bactérias com sistemas de detoxicação intracelular como as metaloproteínas (KEASLING & HUPPF, 1996). O potencial redox e o pH podem promover transformações nos metais pesados do solo, dependente das condições de oxi-redução e também bioticamente através de microrganismos que possuem a ação de enzima catalase (VERBEL & RESTREPO, 2002).

Grande parte dos isolados testados neste projeto são tolerantes quando cultivados na faixa de pH entre 5 – 12. Essa característica é importante visto que os isolados conseguem se multiplicar em diversas faixas de pH, pois para cada processo de biorremediação, o pH do substrato é variado e essa característica dos isolados amplia a possibilidade de utilização dos mesmos numa faixa extensa de pH. Sendo possível trabalhar com substratos ácidos, neutros e alcalinos.

As alterações climáticas oriundas da degradação da camada de ozônio e o aumento da emissão de gases causadores do efeito estufa, acarretam o aumento dos níveis de radiação solar incidente na superfície da Terra. Essas alterações podem afetar as interações entre bactérias e plantas. Sendo assim, a tolerância de bactérias à radiação UV já vem sendo explorada na literatura. Oliveira e col. verificaram através de pesquisas a tolerância de dois gêneros de bactérias sendo, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* verificaram que as bactérias do gênero *Bacillus sp.* são mais tolerante à radiação UVC do que as do gênero *Pseudomonas sp.* As espécies do gênero *Bacillus sp.* são aeróbias, Gram positivas e produzem estruturas de resistência chamados endósporos. Devido aos esporos produzidos por *Bacillus sp.* essas bactérias são capazes de sobreviverem em diversos ambientes em condições inóspitas, colonizando o solo, a rizosfera e plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Os isolados tolerantes à luz UVC selecionados para o sequenciamento 16S foram, C25, C52, C732, C74, FB3, FOB3, TH1, RPT3, RIZPT1, RS1, RIZA1 e TPT5. Esses isolados apresentaram tolerância a maior dose de luz UVC testada sendo de 75,6 J/m<sup>2</sup>.

O uso da biorremediação em áreas contaminadas com cobre é uma alternativa viável para a recuperação dessas regiões, porém se faz necessário avaliar a utilização dos microrganismos, identificando o nível de tolerância, a eficiência pelos microrganismos, além do custo do processo (ANDREAZZA *et al.*, 2010A; 2011A). Pesquisa realizada em 2001 verificou que bactérias do gênero *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. são capazes de realizar a sorção do cobre e que quanto maior o tempo de exposição entre o metal e os microrganismos, maior será a sorção do cobre. (VOSS & THOMAS, 2001). Os ensaios de tolerância aos metais pesados realizados demonstram que das 64 bactérias isoladas, 32 são tolerantes ao cobre até a concentração de 5mM. Através do sequenciamento 16S foi possível identificar 3 bactérias do gênero *Bacillus* sp., sendo o isolado C25 com alta similaridade, apresentando 100% de cobertura e 100% de percentual de identidade, RS1 com 99% de cobertura e 99,06% de percentual de identidade. Os isolados RS1 e C25 apresentaram tolerância até a concentração (2,5mM) de cobre e o isolado C73 com 100% de cobertura e 99% de percentual de identidade, apresentou tolerância até a concentração (5mM) de cobre. Os isolados (C25, C52 e C73) apresentaram tolerância a dose 75,6 J/m<sup>2</sup>/s de Luz UVC. Porém se faz necessário realizar outros ensaios para a identificação da espécie, além de ensaios de biorremediação “*in situ*.” A redução do cobre no ambiente é dependente de várias características destacando-se o pH, temperatura, concentração do metal, além da quantidade de inóculo resistente (SHAKOORI *et al.*, 2000; CAMARGO *et al.*, 2007; ANDREAZZA *et al.*, 2010).

Uma pesquisa realizada sobre biorremediação de áreas contaminadas com cobre constatou que a bactéria *Bacillus* sp, conseguiu reduzir a concentração de cobre no solo, em pH 5 (VOSS, M. & THOMAS, R.W.S.P., 2001). Outros resultados também demonstraram a capacidade de remoção ou imobilização do cobre por bactérias como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. (ANDREAZZA *et al.*, 2010). Mesmo com os perfis de identificações muito próximos é necessário verificar se são isolados de famílias diferentes ou não. Os isolados C25, C73, não foram tolerantes ao peróxido de hidrogênio. Pelas características desses isolados serem bem parecidas é importante a realização de outros ensaios, como provas bioquímicas, prova de catalase e até mesmo o sequenciamento do genoma. Os isolados C25, C73 coletados de amostras de solo não foram os mais tolerantes aos metais pesados e nem ao peróxido de hidrogênio. Sendo primordial a investigação sobre a tolerância a luz UVC que ambos possuem. A hipótese em relação a luz UVC é que esses isolados podem estar sob a forma de endósporos e por isso conseguem sobreviver em ambientes com alta incidência de radiação, porém não conseguem o mesmo resultado em relação aos metais pesados e ao peróxido de hidrogênio, que

podem ser desempenhados por mecanismos diferentes.

O isolado RS1 que também é do gênero *Bacillus sp.* possui percentual de cobertura de 99% e um percentual de identidade de 99,06% demonstrando alta similiaridade ao gênero *Bacillus sp.* Esse isolado (RS1) coletado de amostra de raiz apresentou tolerância a luz UVC, ao peróxido de hidrogênio, além de também ser produtor de biofilme, porém o isolado RS1 não apresentou tolerância significativa em relação aos metais pesados. Sendo, essencial a investigação em relação aos mecanismos de tolerâncias que as bactérias coletadas da região possuem e também quais as limitações que os alguns isolados possuem por não apresentarem tolerância aos metais testados.

As bactérias do gênero *Bacillus sp.* vem sendo utilizadas em processos de biocontrole, pois elas compreendem um grupo heterogêneos com várias características, são Gram positivas, formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, além de serem termotolerantes, resistentes à luz UVC, solventes orgânicos, também de possuir resistência à dessecação e produzir antibióticos peptídicos. Todos esses atributos fazem com que esse gênero seja utilizado no controle biológico de diversas doenças em plantas, como ferrugem do feijão e ação contra fitopatógenos (MELO, 1998). O sistema de efluxo bacteriano é mediado por cromossomos ou plasmídeos, porém a tolerância bacteriana para o cádmio ocorre predominantemente através de bombas de efluxo (BRUINS *et al.*, 2000). Pesquisas já relataram que várias bactérias a tolerância ao Cádmio tais como *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (SMITH, NOVICK, 1972; LADDAGA, SILVER, 1985; COHEN *et al.*, 1991).

Entre os 64 isolados, temos bactérias coletadas de tubérculo, rizosfera, de raiz e de solo de canga que possuem tolerância aos metais pesados testados. Sabe-se que existem uma simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN) e os leguminosos devido a entrada de nitrogênio no sistema solo-planta, essa característica pode acelerar o processo de recuperação de áreas contaminadas com metais pesados (MAHIEU *et al.*, 2011). Um estudo relatou que dentro dos nódulos a planta cria um ambiente com baixa concentração de nitrogênio, porém as bactérias possuem a nitrogenase bacteriana a converter o ar atmosférico em amônia e as plantas fornecem as bactérias as fontes de carbono (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001).

Identificamos a bactéria do gênero *Acinetobacter sp.* na amostra (C74) isolada de solo de canga, com percentual de cobertura de 100 % e percentual de identidade de 99,35%. O isolado (RA4) coletado de raiz, apresentou percentual de cobertura de 100% e percentual de identidade de 99,35%. Essa bactéria é aeróbica e ocorre naturalmente no solo e na água. Dentro

deste gênero a espécie *Acinetobacter baumannii* é muito conhecida por sua resistência a diversos antibióticos sendo uma preocupação médica, visto que debilita o paciente que não responde ao tratamento, afeta principalmente o sistema respiratório e são as mais resistentes dentre as bactérias Gram negativas (TORTORA, 2012). Esses isolados apresentaram tolerância a concentrações de 5mM de cobre, 1mM de cádmio, 5mM de chumbo, 5mM de alumínio e em relação ao mangânes o isolado RA4 apresentou tolerância a 5mM de mangânês e o isolado C74 a 10mM, em relação ao ferro os dois isolados foram tolerantes até a concentração 5mM de ferro, até a concentração de 5mM de arsenato e a 1mM de arsenito. O isolado C74 também apresentou tolerância a dose de 75,6 J/m<sup>2</sup>/s de luz UVC. Outro estudo realizado obteve resultados positivos em relação a tolerância ao cobre e verificaram que as bactérias do gênero *Acinetobacter sp* são resistentes até a concentração 7mM de cobre (SILVA, B.P.I., 2011). Na literatura a espécie *Acinetobacter johnsonii*, foi isolada de moedas da Alemanha e Portugal e apresentou tolerância ao cobre até 3mM (SANTO *et al.*, 2010). Os sistemas de resistência têm evoluído, assumindo formas cromossômicas que podem incluir a homeostasia de íons metálicos, através de transposons e genes de tolerância organizados sobre a forma de operons, descobertos em plasmídeos codificados e que estão relacionados com a precipitação intracelular e extracelular, além de ligações entre a célula das bactérias e sequestro intracelular. No processo de biorremediação é muito utilizado a ligação de cátions na superfície das células das bactérias em resíduos industriais e efluentes contaminados por metais pesados. (BROWN *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2011; HOODA *et al.*, 2008). Conforme experimentos realizados a bactéria *Acinetobacter sp.* possui a presença de bombas de efluxo, que tem a capacidade de expulsar compostos indesejados através da utilização da energia próton motiva (MARCHETTI, D. P., 2010).

Através da técnica de sequenciamento 16S identificamos 3 isolados do gênero *Pantoea sp.*, com alta similiaridade sendo os isolados TPT5 apresentando percentual de cobertura de 99% e 96,5% de percentual de identidade, FCE com 100% de percentual de cobertura e 98% de percentual de identidade, e o isolado C23 que apresentou 100% de percentual de cobertura e 96% de percentual de identidade. As bactérias do gênero *Pantoea sp.* podem ser encontradas no solo, alimentos, insetos, seres humanos e plantas endofíticas. São bactérias gram-negativas, da família *Erwiniaceae*. Existem poucos estudos sobre as bactérias deste gênero, sendo importante a ampliação do conhecimento através de pesquisas em relação aos processos de biorremediação e do potencial biotecnológico dessa bactéria (ACIOLY, L. M. L., 2004). As bactérias do gênero *Pantoea sp.* apresentam mobilidade e pigmentação de bege a amarela. São

bactérias endofíticas. Podem auxiliar a planta em relação a contribuição na promoção de crescimento através da produção ácido indol-acético (AIA), solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (MAAYER *et al.*, 2012). Existe diversos benefícios entre bactérias endofíticas e plantas. Podem ser utilizadas na biorremediação de poluentes de solos contaminados com metais pesados. As plantas que são colonizadas por essas bactérias são tolerantes a metais e tem sido experimentado com êxito para a remoção de metais. Bactérias endofíticas em processo de simbiose, colonizam plantas hospedeiras sem causar danos. Os endofíticos metálicos estão presentes em plantas, agindo na proteção e crescimento das plantas. Os endofíticos metálicos já são conhecidos como promotores de crescimento, através de mecanismos de fixação de nitrogênio, solubilização de minerais, produção fitormônios, sideróforos e transformação de nutrientes (RAJKUMAR *et al.*, 2009). Todas essas características estão presentes na maioria das bactérias do gênero *Pantoea sp.* A espécie *Pantoea agglomerans* é utilizada na fabricação de pão de centeio, devido à fermentação e produção de ácido láctico. Essa bactéria produz também ácido fólico (MATSUZAWA *et al.*, 2012).

Na Europa, *Pantoea agglomerans* é utilizada como agente de controle biológico de doenças em macieiras e pereiras (NUNES *et al.*, 2001). Essa espécie apresenta várias utilizações devido a presença de lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas paredes das células de *P. agglomerans* IG1, e denominados, IP-PA1 (Potencializador Imuno de *Pantoea agglomerans*) que demonstram ativação moderada de macrófagos (NISHIZAWA *et al.*, 1992; MATSUZAWA *et al.*, 2012). O LPS oriundos da fermentação de *P. agglomerans* IG1 estão sendo utilizadas em diversas áreas como panificação, saúde, indústrias de medicamentos, cosméticos, além da área pecuária (SOMA *et al.*, 2008; MATSUZAWA *et al.*, 2012). Diante de tantas utilizações das bactérias do gênero *Pantoea sp.* é imprescindível mais estudos sobre esse gênero a fim de expandir sua utilização biotecnológica.

Através do sequenciamento 16S o isolado FB2, foi identificado como *Klebsiella sp.* pertencente a família *Enterobacteriaceae*. Porém o percentual de identidade e a cobertura da sequência estão muito abaixo de 90%, e por essa razão o ensaio será repetido. As bactérias deste gênero estão presentes na natureza, sendo encontradas em solo, água, alimentos, além do trato digestivo de humanos e animais (KONEMAN *et al.*, 2010). O isolado FB2 demonstrou tolerância a todos os metais pesados utilizados e ao arsênio, a todas as faixas de pH testadas, além de apresentar a capacidade de produção de biofilme e ser tolerante ao agente oxidante, bromato de potássio.

O isolado FB3 foi identificado taxonomicamente pertencente ao gênero

*Sporolactobacillus sp.* uma vez que o percentual de cobertura de 100% e percentual de identidade de 96.64% , o mesmo apresentou tolerância a todos os agentes testados e a todos os metais utilizados sendo  $MnSO_4$ ;  $FeCl_3$ ;  $Pb(NO_3)_2$ ;  $AlCl_3$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  até a concentração de 5mM; para arsenito de Sódio ( $NaAsO_2$ ) até 1mM; e para arsenato de sódio ( $Na_3AsO_4$ ) até a concentração de 3mM, a tolerância ao cloreto de cádmio ( $CdCl_2$ ) foi até a concentração de 500 $\mu$ M. O isolado também apresentou tolerância a altas doses de luz UVC, ao peróxido de hidrogênio na concentração de (100mM), ao bromato de potássio na concentração de (300mM) e demonstrou alta produção de biofilme.

O isolado RizA1 apresentou 94,74% de percentual de identidade e similiaridade para a bactéria *Deffluviitoga sp.*, porém somente 4% de cobertura. Desta maneira ocorre a necessidade de repetição do ensaio e do sequenciamento. A amostra TPT5 apresentou quando sua sequência foi procurada no banco de dados geral de nucleotídeos do NCBI, similiaridade para bactérias do gênero *Pantoea sp.*, com 99% de cobertura e 96,55% de percentual de identidade, demonstrando assim alta semelhança com as bactérias do gênero *Pantoea sp.*, porém quando a sequência é procurada no banco de dados 16S, que é o banco que estamos utilizando para identificação dos isolados, visto que o sequenciamento realizado foi através do gene parcial ribossomal 16S, a sequência apresentou somente uma bactéria sendo do gênero *Vibrio sp.*, com isto apesar da sequência ter sido procurada no banco geral de nucleotídeos, devido ao alto percentual de identidade de 99,55% e 99% de cobertura para *Pantoea sp.*, o isolado foi classificado, pertencente ao gênero *Pantoea sp.* O isolado RPT1 foi identificado pelo BLAST apresentando similiaridade com as bactérias da família *Methanosarcinaceae*, porém com valores de 79,55% de percentual de identidade e 41% de cobertura. Valores abaixo de 90%, indicam baixa confiança e precisão dos resultados, sendo portanto necessário a realização de repetição de todo o experimento, novo sequenciamento, testes bioquímicos ou enzimáticos, a fim de confirmar o gênero do isolado e suas características.

O isolado C52 foi identificado taxonomicamente pertencente ao gênero *Lysinibacillus sp.*, apresentou os valores de cobertura de 100% e o percentual de identidade de 99.09%. As bactérias do gênero *Lysinibacillus sp.* são Gram Positivas, formadoras de endósporos esféricos, tolerantes a altas temperaturas e também a luz ultravioleta. Corroborando com o resultados dos ensaios de tolerância bacteriana a luz ultravioleta realizados, que demonstraram que o isolado C52 é tolerante a dose de 75,6 J/m<sup>2</sup>/s de luz UVC. Sendo desta maneira importante a realização da análise do genoma da bactéria a fim de identificar além do gênero, também a espécie do isolado e conhecer todas as suas características e as possíveis aplicações biotecnológicas deste

isolado, visto que estudos realizados na Índia constataram características favoráveis em relação a reciclagem do polietileno (SHAHNAWAZ, M., SANGALE, M.K. & ADE, A.B., 2016).

A bioquímica microbiana não consiste na degradação do átomo contaminante, mas sim na mudança de estado de oxidação do metal pesado, permitindo assim a sua detoxificação. Os microrganismos transformam as espécies tóxicas em forma de precipitados ou em substâncias voláteis. Com isso a contaminação torna-se menor e o metal mais disponível. A remediação do solo contaminado com cátions metálicos emprega técnicas de escavação e o depósito de componentes em aterros sanitários, essas técnicas tradicionais além de não serem capazes de biorremediar o local, são de alto custo (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante dos mais versáteis que existe, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através do processo de catálise, o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) com reatividade inferior apenas ao flúor. O peróxido de hidrogênio pode agir também como um agente redutor. A oxidação química vem sendo muito utilizada através do uso do peróxido de hidrogênio no tratamento de solos contaminados com resíduos de petróleo, solventes, pesticidas, madeiras. (SCHUMB, *et al.*, 1955; EVERSE, *et al.*, 1991). O peróxido de hidrogênio tem a capacidade de oxidar os contaminantes em produtos mineralizados tais como:  $\text{CO}_2$ , sais e fragmentos orgânicos biodegradáveis, é um produto mais barato e mais rápido. Recentemente, estão em evidências processos eficazes no tratamento de efluentes denominados processos oxidativos avançados (FREIRE, R. S., *et al.*, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 1998; KLEISER *et al.*, 2000), esses processos oxidativos baseiam-se na geração do radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) que com seu alto poder oxidante tem a capacidade de promover a degradação de diversos poluentes, em menor tempo. (LEGRINI *et al.*, 1993; BENITEZ *et al.*, 2000).

Em relação a tolerância ao peróxido de hidrogênio, os ensaios realizados demonstraram isolados tolerantes até a concentração de 100mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo RPT1, RIZPT1, FCE, FB3, FG3 e FOB1, todos isolados de amostras de plantas. Nenhum isolado de solo de canga apresentou tolerância a doses altas de peróxido de hidrogênio. A tolerância a dose de 100mM de peróxido de hidrogênio em bactérias foi demonstrada em uma pesquisa de 2016, onde a bactéria *G. Diazotrophicus* estirpe PAL5T foi testada em plantas de arroz (*Oryza sativa*) e apresentou tolerância ao peróxido de hidrogênio através da expressão da proteína peroxirredoxina, que possui a capacidade de detoxificar  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SEAVER & IMLAY, 2001); (FERREIRA, J. DE P., 2016). Em relação ao bromato de potássio, todos os isolados cresceram na presença da droga, nas doses de 75mM, 150mM e 300mM.



Todos os isolados analisados foram produtores de biofilme, em diferentes taxas de produção. Os isolados que apresentaram as maiores produções foram aqueles coletados de plantas. A hipótese é que as plantas possuem maior quantidade de nutrientes e umidade necessária, além de uma matriz espessa, onde as bactérias endofíticas possam se fixar e formar o biofilme.

A biorremediação utilizando o biofilme ou (perifiton), é capaz de diminuir as concentrações de poluentes. Devido a grande área superficial do biofilme ele conseguem remover grande quantidade de contaminantes que estão dissolvidos na água (HILL *et al.*, 2000). Estudos indicam que o biofilme pode auxiliar na eficiência da remoção natural do Ferro (Fe) e Chumbo (Pb) no tratamento de água. (LETOVCSKY *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2014). O biofilme tem a capacidade de fornecer soluções relacionadas aos processos de eutrofização, poluição da água e por sua capacidade de remoção de nitratos e fosfatos (ROESELERS *et al.*, 2008; CRISPIM *et al.*, 2009). Foram realizados estudos em Taiwan que demonstraram que o biofilme presente nos rios e em substratos, além de absorver nutrientes, conseguem biodegradar pesticidas como a atrazina e o diclofope metilo (TIEN *et al.* 2011). Os três mecanismos de acumulação dos metais, cromo, chumbo, ferro e outros metais, ocorre principalmente por adsorção em substancia poliméricas extracelulares, adsorção superficial nas células e captação intracelular. Esses processos ocorrem com maior eficiência na fase madura de desenvolvimento do biofilme (HOLDING *et al.*, 2003; WU *et. al.*, 2014). A capacidade do biofilme na absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo envolve processos desde a utilização para o seu próprio crescimento, transformação do fósforo solúvel biologicamente disponível para outros mecanismos. Agindo desta maneira o biofilme atua também na diminuição da concentração de compostos causadores da eutrofização auxiliando assim no tratamento de águas residuais (WU *et al.*, 2001).

Diante dos resultados promissores obtidos é interessante identificar taxonomicamente as outras bactérias utilizadas no projeto, a fim de comprovar a alta diversidade microbiológica da região. Desta forma podemos encontrar outros gêneros bacterianos com tolerância a esses agente testados e também a outros agentes ou funções. Os isolados FB3 (*Sporolactobacillus sp*) e RIZPT1 foram os isolados tolerantes a todos os agentes genotóxicos utilizados. Caraterísticas como essas são importantes e devem ser investigadas, através de ensaios genômicos, a fim de encontrar os genes responsáveis pela tolerância e assim conseguir encontrar também outros mecanismos que podem ser utilizados na biotecnologia. A bactéria FOB1, também é um isolado promissor, visto que foi tolerante quase a todos os agentes, somente não tolerou a luz UVC. A

amostra FOB3 se destacou por ser tolerante a quase todos os agente também, exceto para os metais pesados. As amostras RA3 e RA4 apresentaram apenas tolerância a luz UVC e ao peróxido de hidrogênio. Talvez seja interessante verificar através de outros ensaios bioquímicos e moleculares o que acarreta a a alta tolerância dos isolados RA3 e RA4 ao agente oxidante peróxido de hidrôgenio. O isolado RIZPT1 é também tolerante a todos os agentes, porém não pode ser identificado através do sequenciamento do gene 16S ribossomal. Devido a sua habilidade de tolerância, refazer o sequenciamento do gene 16S ou realizar até o sequenciamento do genoma possa ser útil nos diversos ramos da biotecnologia.

O isolado C52 coletado de amostra de solo de canga foi identificado do gênero *Lysinibacillus sp.* Esse gênero bacteriano já vem sendo estudado e descobriram na Índia que a linhagem VASB14 / WL de *Lysinibacillus fusiformis* favoreceu a degradação do plástico (polietileno) (SHAHNAWAZ, M., SANGALE, M.K. & ADE, A.B., 2016). Essa característica é de grande valor, devido as questões ambientais e ao acúmulo de plásticos no meio ambiente, instigando assim maiores estudos com esse isolado através do sequenciamento completo do genoma. A família *Methanosarcinaceae* de bactérias é conhecida pela flexibilidade perante aos substratos que utilizam para a produção de energia e sobrevivência. São capazes de tolerar aminas metiladas, metanol, acetato. Sendo, portanto, importante na área biotecnológica, pois pode ser utilizada em processos de biorremediação. (ROSENBERG E.; DELONG E.F.; LORY S.; STACKEBRANDT E.; THOMPSON F., 2014).

Para a identificação dos mecanismos utilizados pelas bactérias relacionados a tolerância aos metais pesados e arsênio, se faz necessário diversas análises moleculares e também microscopia óptica, microanálise através de Raio X, ressonância magnética e técnicas de cromatografia (CAMPOS TAKAKI *et al.*, 1983; GREENFIELD *et al.*, 1987; OHTOMO *et al.*, 2004).

## 6. CONCLUSÕES

Podemos concluir a partir dos resultados obtidos que as bactérias coletadas em amostras de plantas e de solo de canga da região do Quadrilátero Ferrífero possuem um promissor potencial biotecnológico, uma vez que apresentaram elevada tolerância aos agentes tóxicos utilizados nesse projeto, metais (Fe, Pb, Ni, Cu, As), pH, UVC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e KBRO<sub>3</sub>, além de apresentaram capacidade de produção biofilme . Análises específicas para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de tolerância dos isolados, além de testes moleculares como o sequenciamento completo do genoma são necessários para o completo entendimento e aplicabilidade destes microrganismos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de detecção de danos e reparo de DNA com os isolados mais tolerantes que foram identificados através do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S;
- Realizar experimento de biorremediação “*in situ*” e “*in vitro*”.
- Sequenciar o genoma dos isolados mais tolerantes;

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIOLY, L., M., L. *Pantoea sp.* isolada de efluente industrial: identificação, caracterização, susceptibilidade e aplicação na remoção de metais pesados. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.** 2014.

AFANAS'E.V.I. "New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer". **Aging and Disease, 5, 52.** 2014.

AHLUWALIA, S.S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource technology, 98(12): 2243-2257.**2007.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.215(3):403-410.**1990.

ANDERSON, R.K.; THOMPSON, M.; CULBARD, E.; **Analyst 111, 1143.** 1986.

ANDRADE, L. N.; LEITE, M. G. P. L.; BACELLAR, L. A. P. Composição mineralógica e geoquímica dos solos do parque estadual do Itacolomi - Ouro Preto. **Quaternary.** 2012.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; OKEKE, B.C.; CAMARGO, F.A.O. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption. **Brazilian journal of microbiology, 42, 1: 66-74.** 2011.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; WOLF, L.; LEE, M.K.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C. Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of the Total Environment, 408, 7: 1501-1507.** 2010.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: Gerenciamento da Toxicidade, Ed. Atheneu: São Paulo, cap. 8.** 2003.

AZIM, M.E. Photosynthetic periphyton and surfaces. **In: Encyclopedia of Inland Waters.** 2009.

BAKER, A.J.M.; MCGRATH, S.P.; SODOLI, C.M.D.; REEVES, R.D. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling 11: 41-49**.1994.

BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile índigo dye by ligninolytic fungi. *J Biotechnol.* **Aug 23;89(2-3):141-5**.2001.

BENITEZ, F. J.; BELTRAN-HEREDIA, J.; ACERO, J. L.; RUBIO, F. J.; **Chemosphere 2000, 41, 1271**.2000.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, v. 40 (2).1984.

BIRCH, L.; BARCHOFEN, R. Complexing agents from microorganisms. **Experientia 46 (7), 827-834**.1990.

BISINOTI, M.C.; YABE, M.J.S.; GIMENEZ, S.M.N. Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina-PR. **Revista Analytica, v. n. 08, p. 22-27**. 2004.

BLAKE, R.; TROUNCE, I. A. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta, 1840, 1404**. 2014.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology, v. 4, n. 4, p. 343-350**. 2001.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola de Minas, v. 57, n.1, p. 45-51**. 2004.

BRASIL.MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Conselho nacional do meio ambiente, resolução (CONAMA)**. 28 de Dezembro de 2009.

BRASIL.MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 460/2009. Altera a Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e dá outras providências. **Conselho nacional do meio ambiente resolução (CONAMA)**. 30 de dezembro de 2013.

BROWN. J. R. *et al.* Applied microbial systematic. **Springer**. p. **99-102**. 2000.

BRITO, N. N. *et al.* Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: fórum de estudos contábeis, 4, Rio Claro. **Anais. Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas**. 2004.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. **45**, p. **198–207**. 2000.

BURGUERA, M. & BURGUERA, J.L.J. Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry for arsenic speciation using Fleitmann reaction. **J. Anal. At. Spectrom.** **8:229-233**. 1993.

CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; JACCQUES, R.J.S.; ROESCH, L. F. W.; FRANKENBERGER, W.T. Uso de microrganismos para a remediação de metais. **Tópicos Especias em Ciência do Solo**, **5: 467-496**. 2007.

CAMPOS TAKAKI, G.M.; BEAKES, G.W.; DIETRICH, S.M. Electron microscopy X-ray microprobe and cytochemical study of isolated cell walls of mucoralean fungi. **Transaction of British Mycological Society** **80**. 1983.

CANESCHI, W. L. *et al.* Brazilian ironstone plant communities as reservoirs of culturable bacteria with diverse biotechnological potential. **Frontiers in Microbiology**, v. **9**, p. **1-17**. 2018.

CANESCHI, Washington Luiz. Bioprospecção de bactérias de regiões de canga do Quadrilátero Ferrífero: estratégia de busca de alvos com potencial biotecnológico. 2018. 106 f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto**. 2018.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". **Food and Chemical Toxicology**, **51**, **15**. 2013.

CASSIOLATO, M. E.; MEDA, A. R.; PAVAN, M. A.; MIYAZAWA, M.; OLIVEIRA, J. C. Evaluation of oat extracts on the efficiency of lime in soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, **v.43**, **n.5**, **p.533-536**. 2000.

CASTRO, S.; MARCUS, A., *et al.* Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Braz. J. Microbiol., São Paulo**, **v. 34**, **supl. 1**, **p. 45-47**. 2003.

CHMIELEWSKY, R. A., N.; FRANK, J., F. Formação e controle de biofilme em instalações de processamento de alimentos abrangentes. **Avaliações em Ciência dos Alimentos e Segurança Alimentar 2**: **22-32**. 2003.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation-the prospects for practical applications. **Environment International**, **v. 36**, **p. 299–307**. 2010.

COHEN, I.; BITON, R.; YESHAGAHU, N. The effect of zinc and cadmium ions on Escherchia coli, B. Microbios. **Cambridge**, **v. 68**, **157-168**. 1991.

COLIN, B. **Química Ambiental**, 2º Edição, Editora Bookman, Página 432-433.2005.

COSTA, R.D.V.F.D. Mapeamento geoquímico e estabelecimento de valores de referência (background) de sedimentos fluviais do Quadrilátero Ferrífero. 185 f. Tese (Doutorado em Evolução Crustal e Recursos Naturais) – Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2015.

COSTA, S.P. Diversidade filogenética e funcional do microbioma, com ênfase nos genes envolvidos no metabolismo do arsênio, de sedimento impactado por mineração. **Tese de doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais**. 2014.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, **v. 284**, **p. 1318-1322**. 1999.



COSTERTON, J.W. Visão geral de biofilmes microbianos. **Journal of Industrial Microbiology** **15**: 137-140.1995.

CRISPIM, M.; VIEIRA, A.; COELHO, S.; MEDEIROS, A. Nutrient uptake efficiency by macrophyte and biofilm: practical strategies for small -scalefish farming. **Acta Limmologica Brasiliensia** **21(4)**, 387-391. 2009.

DARBON, N.; LAVAGNE, F.; QUILLON, J.P. Les phosphates et le cadmium: le sol, la plante, l'homme. **APAO, Paris**.1992.

DARBRE, P.D. *et al.* Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture. **Journal of inorganic biochemistry**, 2013.

DA SILVA, NETO JOSÉ F.; NEGRETTO, C.C; NETTO, L.E.S. Analysis of the Organic Hydroperoxide Response of *Chromobacterium violaceum* Reveals That OhrR Is a Cys-Based Redox Sensor Regulated by Thioredoxin. **PLoS ONE** **7(10)**: e47090. 2012.

DE MAAYER, P.; CHAN, W, Y.; BLOM, J.; VENTER, S.N.; DUFFY, B.; SMITS, T.H.M.; COUTINHO, T.A. The large universal Pantoea plasmid LPP-1 plays a major rolem in biological and ecological diversification. **BMC genomics, London, v.13, p. 625**. 2012.

DE JESUS, E.B. Bactéria redutora de sulfato: bioprocessos e medidas de controle. **In: I Congresso Brasileiro de Prospecção Tecnológica, Salvador. Cadernos de Prospecção. v. 4. p. 1-11**. 2011.

DELLAMATRICE, P.M. Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana. **Tese de Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba**. 2005.

DIANA, J. E.; PUI, C. F.; SON, R. Enumeration of Salmonella spp., Salmonella Typhi and Salmonella Typhimurium in fruit juices. **International Food Research Journal**, **19(1)**, 51. 2012.

DI TOPPI, SANITÁ, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, **v.41, p.105-130**. 1999.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. **15**, p. **167-193**.2002.

DUNNE, W. M. J.R. “Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?”. **Clinical microbiology reviews vol. 15,2 - 155-66**. 2002.

DURAN, N., MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit Rev Microbiol 27: 201–222**.2001

ESCALANTE, T.; SZUMIK, C.; MORRONE, J.J. Areas of endemism of Mexican mammals: re-analysis applying the optimality criterion. **Biological Journal of the Linnean Society 98: 468–478**. 2009.

EVANS, K. A. Em Industrial Inorganic Chemicals: Production and *Uses*; Thompson, R., ed.; **The Royal Society of Chemistry; Cambridge, cap. 11, p. 277-349**.1995.

EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B. **Peroxidases in Chemistry and Biology, CRC Press: New York**. 1991.

FELESTRINO, E.B.; SANTIAGO, I.F.; FREITAS, L.D.; ROSA, L.H.; RIBEIRO, S.P.; MOREIRA, L.M. Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. **Front Microbiol 8, 172**. 2017.

FERREIRA, JOELMA M., ; SILVA, F. L. H; ALSINA, O. L. S; OLIVEIRA, L. S. C; CAVALCANTE, E. B; GOMES, W. C. Estudo do equilibrio e cinetica da biossorção do Pb<sup>2+</sup> por *Saccharomyces cerevisiae*. **Quim. Nova, Vol. 30, No. 5**. 2007.

FERREIRA, J. DE P. Análise proteômica comparativa em *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 em resposta a presença de peróxido de hidrogênio e efeitos do estresse na colonização de plantas de arroz. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ**. 2016.

FERREIRA, P. C.; PIAI, K. DE ALMEIDA; TAKAYANAGUI, A. M. M.; SEGURA, M. S. I. Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* vol.16, n.1, pp.151-157. ISSN 1518-8345. 2008.

FREIRE, R. S.; PEREGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; ZAMORA, P. P. **Quim. Nova**, **23**, **504**. 2000.

FRIBERG, L.; PISCATOR, M.; NORDBERG, G.F.; KJELLSTRÖM, T. Cadmium in the environment. **2nd edition, CRC Press, Ohio**.1974.

GADD, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycol Res**, v. **111**, n. **Pt 1**, p. **3-49**, **97. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology**, v. **156**, n. **Pt 3**, p. **609-43**. 2007.

GADD, G.M. Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*, *Volume 100, Issue 1-3, December 1992, Pages 197–203*. 1992.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, v. **8**, n. **34**. 2005.

GHOSH, S.; MAHAPATRA, N.R.; BANERJEE, P.C. Metal resistance in *Acidocella* strains and plasmid-mediated transfer of this characteristic to *Acidiphilium multivorum* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63(11):4523-4527**. 1997.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry** **30**, **1389-1414**. 1998.

GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R.; HARLEY, R. M. Espinhaço range region eastern Brazil. In: Davis SD et al. (eds). **Centres of plant diversity: A guide and strategy for their conservation, Wwf/iucn, Cambridge**, vol **3**. pp. **397–404**. 1997.

GOMES, N.C.M.; MENDONÇA, H., L.C.S.; SAVVAIDIS, I. Metal bioremediation by microorganisms. **Revista de Microbiologia** **29**: **85-92**. 1998.

GOYER, R.A.; AMDUR, M.O.; DULL, J.; KLAASSEN, C.D. Toxic effects of metals lead. **Casareh and Doull's toxicology the basic science of poisons. 4<sup>a</sup> ed. New York: Pergamon Press; Pp. 639–646.** 1991.

GREENFIELD, N. J.; HUSSAIN, M.; LENARD, J. Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance study. **Biochimica et Biophysica Acta 926, 205-214.**1987.

GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology. **John Willey & Sons Incorporation, Publishers.** 1994.

GUTIERREZ, C.; DEVEDJIAN, J.C. Indução osmótica da expressão do gene *osmC* em *Escherichia coli* K12. **J Mol Biol 220: 959–973.**1991.

HALLENBICK, W. H. Human health effects of exposure to cadmium. **Experientia 40 (2), 136-140.** 1984.

HAROLD, A.; TAYLOR, J.R. Manganese minerals. **In: Industrial Minerals and Rocks, 6th Edition, D. D. Carr (Senior Editor), Society of Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc. Littleton, Colorado, 1196p., p. 655-660.** 1994.

HATJE, V., PEDREIRA, R.M.A.; DE REZENDE, C.E. *et al.* The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Sci Rep 7, 10706, p. 1–13.** 2017.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med. 107:401-4.** 1986.

HERNÁNDEZ, R.B.; FARINA, M.; ESPÓSITO, B.P.; SOUZA, P.N. C.; BARBOSA, F. J.R.; SUÑOL, C. Mechanisms of manganese-induced neurotoxicity in primary neuronal cultures: the role of manganese speciation and cell type. **Toxicol Sci. Dec;124(2):414-23.** 2011.

HILL, R. W.; RYON, M.G.; SMITH, J.G.; MARSHALL, S.; BOSTON, H.L.; STEWART, A.J. The Role of Periphyton in Mediating the Effects of Pollution in a Stream Ecosystem. **Environmental Management. 45:563–576.** 2010.

HOLDING, K.; GILL, R.; CARTER, J. A. Relação entre Metais Ligados ao Perifíton Epilítico (Biofilme) e Metais Ligados a Sedimentos em Sistemas de Água Doce. **Geoquímica e Saúde Ambiental 25, 87–93.** 2003.

HOODA, P.S. *et al.* Chemical bioavailability in terrestrial environments. **Developments in soil science**. 1ed. Elsevier, v. 32. p. 169-657.2008.

HOWARD, A. G.; HUNT, L. E.; **Anal. Chem.** 65, 2995.1993.

HU, CHAOHUA; ZHANG, LEI; HAMILTON, DAVID; ZHOU, WENBING; YANG, TEWU ; ZHU, DUANWEI. Physiological responses induced by copper bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* (Mart.). **Hydrobiologia**. 579. 211-218.2007.

INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS. **Parque estadual do Itacolomi**.

JACOBI, C.M; DO CARMO, F.F; VINCENT, R.C; STEHMANN, J.R. Plant communities on ironstone outcrops: A diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodivers. Conserv.** 2007.

KEASLING, J.D.; HUPF, G.A. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 743–746. 1996.

KHAN, M. S. *et al.* Biomanagement of metal contaminated soils. **Environmental pollution** 20. Springer, p.1-95. 2011.

KING, L.D.; ALVAREZ, V.H.; FONTES, L.E.T.; FONTES, M.P.F. Soil heavy metals. O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. **Viçosa, SBCS**, p.823-836. 1996.

KLASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. **New York, NY: McGraw-Hill Education**.2013.

KLEISER, G.; FRIMMEL, F. H.; **Sci. Total Environ.** 256, 1. 2000.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260. 1995.

KONEMAN, E.; WINN, W.J.; ALLEN, S.; JANDA, E.; PROCOP, G.; CHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido. **Ed. 6°, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**. 2010.

KRUMBEIN, W. E. Biotransfer in monuments-socio-biological study. **Durability Building Materials**, n. 5, p. 359-382. 1988.

LADDAGA, R. A.; SILVER, S. Cadmium uptake in Escherichia coli K-12. **Journal of Bacteriology, Washington**, v. 162, p.1100-1105.1985.

LAMBETH, J.D.; NEISH, A.S. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. **Annu Rev Pathol** 9: 119–145.2014.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M.; **Chem. Rev.** 93, 671.1993.

LEPREVOST, A. Química Analítica dos minerais. **Livros técnicos e Científicos Editora Ltda., Rio de Janeiro. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.** p. 393. 1975.

LIAO, C.Y.; RIKKE, B.A.; JOHNSON, T.E.; GELFOND, J.A.L.; DIAZ, V.; NELSON, J.F. Fat maintenance is a predictor of the murine lifespan response to dietary restriction. **Aging Cell** 10, 629–639.2011.

LIMA, BITTENCOURT C.I.; ASTOLFI, FILHO S.; CHARTONE, SOUZA E., SANTOS, F.R.; NASCIMENTO, A.M.A. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiol** 7: 58. 2007.

LIÈVREMONT, D.; BERTIN, P.N.; LETT, M.C. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. **Biochimie** 91: 1229-1237. 2009.

LOPES, F.A.; MIOTELLI, H.; SCHNEIDER, I.A.H.; MENEZES, J.C.S.S. Produção de coagulante cloreto férrico a partir de óxido de ferro gerado no processo de ustulação da pirita presente em rejeitos de mineração de carvão. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade do Oeste de Santa Catarina. **XXVI Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa Poços de Caldas-MG. 2015.**

LOPES, L. R. Influência de fatores biológicos na mobilidade de Arsênio presente em solos da cidade de Ouro Preto – estudos “in vitro”. 2014. 204 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.** 2014.

LOPES, E. M. identificação e caracterização de metagenomas e isolados bacterianos visando a biorremediação de solos de áreas de mineração. **Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.**2016.

LOU, J.; LIN, Y. Assessing the feasibility of wastewater recycling and treatment, efficiency of wastewater treatment units. **Environmental monitoring and assessment, 137(1-3): 471-479. 2008.**

LOWE, B. M. **Educ. Chem.15.**1992.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARCK, D.P. **Microbiologia de Brock. 12 ed.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAGDER, S. Reactive Oxygen Species: Toxic Molecules or Spark of Life? **Critical Care, 10, 208-216.** 2006.

MAHAPATRA, N.R.; BANERJEE, P.C. Extreme tolerance to cadmium and high resistance to copper, nickel and zinc in different *Acidiphilium* strains. **Lett. Appl. Microbiol., 23:393-397.** 1996.

MALAVOLTA, E. Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados – mitos, mistificação e fatos. **Produquímica, São Paulo p.153.** 1994.

MARCHETTI, D.P. Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter spp.* **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia.** 2010.

MARIANO, J.B. Impactos ambientais do refino de petróleo. **Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Estratégico) – COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro.** 2001.

MARKERT, B. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, v. 21, p. 77-82.** 2007.

MARQUES, M. DO V. *Biologia Molecular e Genética Bacteriana*. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**. 2012.

MARSH, G.M.; STONE, R.A.; ESMEN, N.A.; GULA, M.J.; GAUSE, C.K.; PETERSEN, N.J.; MEANEY, F.J.; RODNEY, S.; PRYBYLSKI, D. A case-control study of lung cancer mortality in four rural Arizona smelters towns. **Arch. Environ. Health**, v. 53, n. 1, p. 15-27. 1989.

MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. **Cosmetics Cosmetics & Toiletries (edição em português), São Paulo** 15:42-53. 2003.

MATOS, L.P.; COSTA, P.F.; MOREIRA, M., GOMES; P, DE QUEIROZ SILVA, S., GURGEL, L, TEIXEIRA, M.C. Remoção simultânea de sulfato e arsênico usando cultura mista não tradicional e SRB imobilizada e fontes alternativas de carbono de baixo custo. **Revista de Engenharia Química, Volume 334**. 2018.

MATSUZAWA, T.; MORI, K.; KADOWAKI, T.; SHIMADA, M.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; INAGAWA, H.; SOMA, G.I.; TAKEGAWA, K. Genome Sequence of *Pantoea agglomerans* Strain IG1, **Journal of Bacteriology, Washigton**, v. 194, n. 5, p. 1258-1259. 2012.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. **Controle Biológico. Editora Embrapa: Jaguariúna SP**, v. 1. p. 17-30. 1998.

MENDONÇA, V.L.M. Proteção Solar X Fator de Proteção. **Revista Racine, São Paulo** 5:14.1996.

MENEZES, N.L.; GIULIETTI, A.M. Campos rupestres. Paraíso botânico na Serra do Cipó. **Ciência Hoje** 5:39-44. 1986.

MEYBECK, A. Objective methods for the the evaluation of sunscreens. **Cosmetics & Toiletries, Oak Park** 98:51-60 1983.

MEYER-REIL, L.A. Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists. **Marine Ecology Progress, ser 112**, p. 303-311. 1994.

MONGKOLSUK, S.; PRAITUAN, W.; LOPRASERT, S.; FUANGTHONG, M.; CHAMNONGPOL, S. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. **J Bacteriol** 180: 2636–2643.1998.



MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 625 p .2002.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Panam Salud. Publica**;15 (2):119–29. 2004.

MOREIRA, M. Identificação de consórcio bacteriano com potencial biotecnológico para biorremediação de arsênio e sulfato. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto**. 2013.

NASCIMENTO, LAURA PEREIRA DO; REIS, DEYSE ALMEIDA; ROESER, HUBERT MATHIAS PETER; SANTIAGO, ANIBAL DA FONSECA. Avaliação geoquímica de metais em sistemas fluviais afetados por atividades antrópicas no Quadrilátero Ferrífero. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, 23(4), 767-778. 2018.

NATIONAL C. F. B. I. PubChem Database. Potassium bromate, CID=23673461. 2019.

NEDER, R N. Microbiologia; **manual de laboratório**. 1992.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology** 51, 730-750. 1999.

NISHIYAMA, A. T.; MANDAJI, G.; ALVES, K. B.; BARBOSA, L. A.; FERNANDES, R. C.; OLIVEIRA, T. C. Reutilização do Cloreto Férrico. **Trabalho de Conclusão de Curso (Técnico em Química). Escola Técnica “Lauro Gomes”, São Bernardo**. 2012.

NISHIZAWA, T.; INAGAWA, H.; OSHIMA, H.; OKUTOMI, T.; TSUKIOKA, D.; IGUCHI, M.; SOMA, G.; MIZUNO, D. Homeostasis as regulated by activated macrophage. I. Lipopolysaccharide (LPS) from wheat flour: isolation, purification and some biological activities. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Tokyo**, v.40, n. 2, p.479 – 483.1992.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F.; **Quim. Nova**. 21, 69. 1998.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; VINAS, I. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. **International Journal Food Microbiology**, v. 70, p. 53-71.2001.

OHTOMO, R.; SEKIGUCHI, Y.; MIMURA, T.; SAITO, M.; EZAWA, T. Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. **Analytical Biochemistry** **328**, 139-146. 2004.

OLIVEIRA, I.P.; OLIVEIRA, L.C. Metais pesados. **Revista Eletrônica Faculdade de Iporá: 59-86**.2011.

OLIVEIRA, N. J. F.; ANDREOTE, F. D.; ÁVILA, L.A.; MELLO, I. S. Resistência de representantes dos gêneros *Pseudomonas* sp e *Bacillus* sp mediante exposição à radiação ultravioleta C. **Embrapa Meio Ambiente. Apresentação de Trabalho/Congresso**. 2008.

OLSEN, E.J., KRACHER, A., DAVIS, A.M., STEELE, I.M., HUTCHEON, I.D., BUNCH, T.E., 1999. **The phosphates of IIIAB iron meteorites. Meteorit. Planet. Sci.** **34**, 285–300, 1999.

OREMLAND, J.F; STOLZ R.S. **Arsenic, microbes and contaminated aquifers Trends Microbiol.**, **13**, pp. 45-49. 2005.

OREN, A.; ROSENBERG E.; DELONG, E.F; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. The Family *Methanosarcinaceae*. **Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg**. 2014.

O'TOOLE G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **Journal of visualized experiments: JoVE**, (47), 2437. 2011.

PÁEZ-ESPINO, D.; TAMAMES, J. D. L. V.; CÁNOVAS, D. Microbial responses to environmental arsenic. **Biometals** **22:117–130**. 92. 2009.

PALMROTH. M.R.; KOSKINEN, P.E.; KAKSONEN, A.H.; MÜNSTER, U.; PICHTEL, J.; PUHAKKA, J.A. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. **Biodegradation**. **2007;18(6):769-782**. 2007.

PAOLIELLO, M.M.B.; CAPITANI, E.M.; CUNHA, F.G.; MATSUO, T.; CARVALHO, M.F.; SAKUMA A. *et al.* Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environ Res.** **88: 120-8**. 2002.

PATNAIK, P. **Handbook of Inorganic Chemical Compounds**. New York: McGraw-Hill. 2003.

PEREIRA, R. **Fatores que determinam o crescimento bacteriano**. 2001.

PERON, M.V. Listagem preliminar da flora fanerogâmica dos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Ouro Preto/Mariana, MG. **Rodriguesia** **67**: 63-69, 1989.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmetal and Experimental Botany** **35** (4), 525-545. 1995.

PRICE, D.; WORSFOLD, P. J.; MANTOURA, R. F. C.; **Trends Anal. Chem** **11**, 379.1992.

POREMBSKI, S., *et al.* Vegetation of rock outcrops in Guinea: granite inselbergs sandstone table mountains and ferricretes-remarks on species numbers and endemism. **Flora**, v. **189**, p.315-326. 1994.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; COLMENERO, J. D. D.; MACIAS, M.; BRAVO, M. J.; MORATA, P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. **Clin. Vaccine Immunol.**, **15**(2), 293-296. 2008.

QUEIROZ, P. S.; BARBOZA, N.R.; CORDEIRO, M. M.; LEÃO, V. A.; GUERRA-SÁ, R. RICH. Growth medium promotes an increased on Mn (II) removal and manganese oxide production by *Serratia marcescens* strains isolates from wastewater. **Biochemical Engineering Journal** **140**,148–156.2018.

RAJKUMAR, M., AE, N.; FREITAS, H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. **Chemosphere**, v.77, p.153-160. 2009.

RANGARAJAN, M.; ZATS, J. Effect of formulation on the topical delivery of  $\alpha$ - tocopherol. **J. Cosmet. Sci.** **54**: 161-174. 2003.

RASBAND, W.S. ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

REIS, K. C. dos. Seleção de bactérias resistentes a Fe<sup>3+</sup> com potencial aplicação em biorremediação. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras**. 2013.

RIZZINI, C.T. Tratado de fitogeografia do Brasil. **São Paulo: EDUSP. 123 p. 1979.**

ROESELERS, G.; LOOSDRECHT, M. C. V.; MUYZER, G. “Phototrophic biofilms and their potential applications”. **Journal of Applied Phycology, Vol. 20 No. 3, pp. 227-235.** 2008.

ROMAN, T.R.N., LIMA, E.G., AZOUBEL, R., BATIGÁLIA, F. Toxicidade do Cádmio no Homem. **HB Científica 9 (1)**, 43-48. 2002.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 151-70.** 1991.

ROY, M.; GIRI, A. K.; DUTTA, S.; MUKHERJEE, P. Integrated phytobial remediation for sustainable management of arsenic in soil and water. **Environment International, v. 75, p. 180-198,** 2015.

SAMPAIO, JOÃO ALVES; ANDRADE, MÔNICA CALIXTO DE; DUTRA, ACHILLES JUNQUEIRA B.; PENNA, MÁRCIO TORRES M. Manganês. **CETEM – Rio de Janeiro, dezembro.** 2008.

SANTO, C. E.; MORAIS, P.V.; GRASS, G. Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology.76(5):1341–8.** 2010.

SANTOS, G.C.G.D. Comportamento de B, Zn, Mn, e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico. **Tese de Doutorado. Curso de Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo.** 2005.

SASHA BABICKI, DAVID ARNDT, ANA MARCU, YONGJIE LIANG, JASON R. GRANT, ADAM MACIEJEWSKI E DAVID S. WISHART. Heatmapper: mapeamento de calor habilitado para web para todos. **Nucleic Acids Res.** 2016.

SCHUMB, W. C.; SATTERFIELD, C. N.; WENTWORTH, R. L.; Hydrogen Peroxide, **Reinhold: New York**, 1955.

SEAVER, L. C.; IMLAY, J. A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. **183**, n. **24**, p. **7173-7181**. 2001.

SHAKOORI, A.R; MAKHDOOM, M. E HAQ, R.U- Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **53**, **3**: **348-351**.2000.

SILVA, J.C.M. propriedades químicas da arsenopirita, adsorção de agentes lixiviantes e seu mecanismo de oxidação a partir de cálculos dft in **Chemistry Department. UFMG**. p. **148**. 2016.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S.; **Trends Biotechnol.** **22**, **142**. 2004.

SLYEMI, D.; BONNEFOY, V. How prokaryotes deal with arsenic. **Environmental Microbiology**. **Rep 4**: **571–86**. 2012.

SMITH, K., NOVICK, R. P. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology, Washington**, v.**112**, **761-772**. 1972.

SOMA, G.I.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; YOSHIOKA, N.; TANIGUCHI, Y.; KOHCHI, C. Preventative and therapeutic potential of lipopolysaccharide derived from edible Gram-negative bacteria to various diseases. **Current Drug Therapy**, v. **3**, n.**1**, p.**26 –32**.2008.

SONG, L., MARSH, T.L. VOICE, T.C.; LONG, D.T. Loss of seasonal variability in a lake resulting from copper sulfate algaecide treatment. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, vol. **36**, n. **9-11**, p. **430-435**.2011.

SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W. M. **Química Ambiental**. 2.ed. São Paulo: **Pearson Prentice Hall**. 2009.

STUMMEYER, J.; HARAIZIN, B.; WIPPERMANN, T.; FRESENIUS, J. **Anal. Chem.**, **354**, **344**.1996.

- SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage". **Antioxidants & Redox Signaling**, **14**, 2491. 2010.
- TIEN, C.J.; CHUANG, T. L.; CHEN, C.S. The role of naturally occurring river biofilms on degradation of diazinon. **Clean-Soil, Air, Water** **39**, 931 e 938. 2011.
- TORTORA, G. J.; BERDELL, R.; FUNKE, CHRISTINE, L. C. **Microbiologia**, 10<sup>a</sup> edição, **Artmed**, 2012.
- TSAI, S.L., SINGH, S., CHEN, W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. **Curr Opin Biotechnol** **20**:659-67.2009.
- VERBEL, J. O.; RESTREPO, B. J. El lado gris de la minería del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia, **Universidad de cartagena facultad de ciencias químicas y farmacéuticas grupo de química ambiental y computaciona. Colombia**, 123 p. 2002.
- VOSS, M. ; THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, **31**, 6: 947-951. 2001.
- WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of Inorganic Biochemistry** **79**, 241-244. 2000.
- WAILING, C. Fenton's reagent revisited. **Acc. Chem. Res.** **8**: 125–131.1975.
- WANG, C.L.; MICHELS, P.C.; DAWSON, S.C.; KITISAKKUL, S.; BAROSS, J.A.; KEASLING, J.D.; CLARK, D.S. Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic Culture. **Applied and Environmental Microbiology** **63** (10), 4075-4078. 1997.
- WIRTANEN, G.; MATTILA SANDHOLM, T. Removal of foodborne biofilms - comparison between surface and suspension tests: **Part 1. LWT - Food Science and Technology**, **25**(1), 50-54. 1992.
- WU, Y.; XIA, L.; YU, Z.; SHABBIR, S.; KERRET, P.G. In situ bioremediation of surface waters by periphytons. **Bioresource Technology**, **151**. 367–372. 2014.

YAKUBU, M. BELLO. "Biological approach to oil spills remediation in the soil." **African Journal of Biotechnology** 6, no. 24 - 2735-2739. 2007.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v.36, p.409-430. 2009.

