

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Efeito da contaminação por
arsênio sobre a comunidade
de bactérias cultiváveis do
solo**

Lorrana Cachuite Mendes Rocha

Ouro Preto





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



LORRANA CACHUITE MENDES ROCHA

**EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR ARSÊNIO SOBRE A COMUNIDADE DE
BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO SOLO**

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: Prof^a. Dr^a. Camila Carrião Machado Garcia.

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro M. Moreira.

OURO PRETO – MG
2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R672e Rocha, Lorrana Cachuite Mendes .
Efeito da contaminação por arsênio sobre a comunidade de bactérias cultiváveis do solo. [manuscrito] / Lorrana Cachuite Mendes Rocha. - 2021.
80 f.: il.: color., 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. Arsênio. 2. Prospecção. 3. Solos - Poluição. 4. Quadrilátero Ferrífero. I. Garcia, Camila Carrião Machado. II. Moreira, Leandro Márcio. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 602

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorrana Cachuite Mendes Rocha

Efeito da contaminação por arsênio sobre a comunidade de bactérias cultiváveis do solo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 14 de Abril de 2021

Membros da banca

Profa. Dra. Camila Carrião Machado Garcia – Orientadora (UFOP)

Profa. Dra. Natália Rocha Barboza – Examinadora (UNA)

Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva – Examinadora (UFOP)

Camila Carrião Machado Garcia, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 03/09/2021



Documento assinado eletronicamente por **Camila Carrião Machado Garcia, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/09/2021, às 13:27, 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, informando o código verificador **0217380** e o código CRC **2C19823C**.

AGRADECIMENTOS

Não teria como não começar agradecendo à minha família. Mesmo sem compreender a escolha desta carreira, sempre me apoiaram nesta decisão. Sem o apoio emocional e financeiro de meus pais, Wilson e Cynara, seria muito difícil passar por tudo isto. Meu obrigada também ao suporte de minhas irmãs, Larissa e Luísa.

Minha gratidão à minha orientadora, Dr.^a Camila Carrião, pelo conhecimento transmitido, pela orientação em toda minha vida científica e pela compreensão durante os momentos de bloqueio. Agradeço também ao meu co-orientador, Dr. Leandro Moreira pelos ensinamentos e conselhos.

Obrigada a todas e todos os colegas do Laboratório de Genômica e Reparo de DNA, pela ajuda no desenrolar deste trabalho, e pela companhia que deixou todo esse caminho mais fácil. Em especial, às parceiras de projeto Janine Alves e Iasmin Domingos e também as queridas Ana Karla Silva, Dr.^a Angélica Sánchez, Ma. Maria Rosilene Damasceno e Ma. Sibebe Silva.

Agradeço à todos os laboratórios parceiros que permitiram o uso de sua infraestrutura para a execução deste estudo, em especial ao LBTM, ao LEP, no ICEB e ao LBCM e ao LMU-MAM, no NUPEB. Meus agradecimentos também ao DEBIO por autorizar o uso do Horto Botânico e da casa de vegetação.

Não podia deixar de expressar minha enorme gratidão à meu namorado, Gustavo Machado, pelas noites viradas na bancada e nos estudos e por estar sempre ao meu lado para me acalmar e motivar a seguir em frente. Tenho que estender o agradecimento às minhas grandes amigas, Flávia Arêdes e Fracieli Pianzola, por todo o suporte emocional e técnico. Sem vocês três à conclusão deste trabalho e a vida acadêmica teria sido bem mais árdua. Meu obrigada também à todos os outros amigos e amigas que permaneceram e entraram em minha vida nestes últimos anos e tornaram a jornada mais leve.

Por fim, agradeço ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida e a CAPES, que permitiram que eu pudesse continuar à minha formação e contribuísse um pouco com a pesquisa neste país.

“Quatro cidades e nós

*Um tanto Quadrilátero Ferrífero
Um tanto prognóstico e altivo
Eu um tanto extremo, você um tanto partido.
Você um tanto Santo e tanto Bárbaro,
Eu um tanto Itabirito.*

*Nós dois, um tanto belos pelo horizonte,
Naquela tarde a metade pôr-do-sol
Sobre montanhas e pedras
Meio dureza do ferro, meio brilho do ouro...
E nós completamente paixão.”*

Wudson Carvalho,

Artista local

RESUMO

O Arsênio é um semi-metal amplamente difundido na crosta terrestre associado a outros compostos minerais. Atividades antrópicas, como mineração e agricultura, e naturais como o intemperismo de rochas elevam a quantidade de As no ambiente. Os compostos derivados de As são considerados altamente tóxicos, estando associados ao desenvolvimento de uma série de patologias em resposta à intoxicação aguda e crônica, como doenças de pele e gastrointestinais, e diversos tipos de câncer. Sendo assim, estudar processos que possam nos auxiliar no tratamento de solos e águas contaminadas é de grande importância. Bactérias têm se mostrado microrganismos bastante interessantes para esses processos. Neste trabalho, procuramos avaliar o efeito da contaminação por arsênio sobre a comunidade bacteriana dos solos através de métodos dependentes de cultivo. Inicialmente, bactérias foram isoladas a partir de solo contaminado artificialmente com 55 µg/Kg de Arsenato de Sódio, solo naturalmente contaminado proveniente do quadrilátero ferrífero e solo controle entre 0 e 115 dias após a contaminação. Foram isolados 466 microrganismos e estes selecionados de acordo com suas tolerâncias às doses de 10-15 mM de Arsenato de Sódio e 1-3 mM de Arsenito de Sódio. Os 29 isolados mais tolerantes foram submetidos a crescimento em presença de Manganês (20-70 mM), Ferro (6-15 mM), diferentes valores de pH (4-12) e doses mais elevadas de arsenito (4-15 mM) e arsenato (25-400 mM). Os 10 isolados mais resistentes quanto à tolerância aos metais e principalmente arsenito e arsenato foram novamente selecionados e caracterizados quanto à formação de biofilme, curva de crescimento, tolerância ao peróxido de hidrogênio (10-200 mM) e características morfológicas e de parede celular. Nossos resultados apontam para um conjunto de bactérias com alta resistência a As, prospectadas principalmente do solo tratado com As, e que podem ser utilizadas em atividades de remediação de ambientes contaminados com o semi-metal.

Palavras-chave: Arsênio, bactérias tolerantes, bioprospecção, solo contaminado, Quadrilátero Ferrífero.

ABSTRACT

Arsenic is a semi-metal widespread in the earth's crust associated with other mineral compounds. Human activities, such as mining and agriculture, and natural activities such as the weathering of rocks increase the amount of As in the environment. The compounds derived from As are highly toxic and are associated with the development of a series of pathologies in response to acute and chronic intoxication, such as skin and gastrointestinal diseases, and several types of cancer. Therefore, studying processes that can help us to treat contaminated soil and water is of great importance. Bacteria are very interesting microorganisms for these processes. In this work, we seek to evaluate the effect of arsenic contamination on the soil bacterial community through cultivation-dependent methods. Initially, bacteria prospecting from artificially contaminated soil with 55 µg/Kg of sodium arsenate, naturally contaminated soil from the Iron Quadrangle, and control soil between 0 and 115 days after contamination. It was isolated 466 microorganisms and then those selected according to their tolerances to doses of 10-15 mM sodium arsenate and 1-3 mM sodium arsenite. The 29 most tolerant isolates were grown in the presence of manganese (20-70 mM), iron (6-15 mM), different pH values (4-12), and higher doses of arsenite (4-15 mM) and arsenate (25-400 mM). The 10 most resistant isolates in terms of metals tolerance, mainly arsenite and arsenate, were again selected and characterized in terms of biofilm formation, growth curve, tolerance to hydrogen peroxide (10-200 mM), and morphological characteristics and cell wall. Our results point to a set of bacteria with high resistance to As, mainly prospecting from the soil treated with As, and can be used in remediation activities of environments contaminated with this semi-metal.

Keywords: Arsenic, tolerant bacteria, bioprospection, contaminated soil, Iron Quadrangle.

LISTA DE ABREVIACOES

Al: Alumnio

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As: Arsênio

As₂O₃ : Trióxido de Arsênio

As³⁺ : Arsenito

As⁵⁺ : Arsenato

ATSDR: do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* - Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças dos Estados Unidos

Au: Ouro

DMA-III: Dimetil-arsenito

DNA: cido Desoxirribonucleico

Eh: Potencial Redox

ERs: Espécies Reativas

EUA: Estados Unidos da América

FDA: do inglês *Food and Drug Administration* - Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos

Fe: Ferro

FEAM: Fundao Estadual do Meio Ambiente de Minas Gerais

GLM: Modelo Linear Generalizado

IBRAM: Instituto Brasileiro de Minerao

LB: Luria-Bertani, meio de cultura bacteriológico não-seletivo

MG: Minas Gerais

MMA: Mono Metil-arsenito

Mn: Manganês

N: Nitrogênio

OBS: Observao

OD: do inglês *Optical Density* - Densidade ptica

P: Fósforo

PCA: do inglês *Principal Component Analysis* – Análise de Componentes Principais

PGPB: do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria* – Bactérias promotoras de crescimento vegetal

pH: Potencial de Hidrogênio

PIB: Produto Interno Bruto

PO_4^{3-} : Íon fosfato

QF: Quadrilátero Ferrífero

QI: Quociente de inteligência

TMAO: Óxido de Trimetil-arsina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biogeoquímico do arsênio.	18
Figura 2: Mapa ilustrativo do Quadrilátero Ferrífero na região central do estado de Minas Gerais, Brasil.	22
Figura 3: Mecanismos de resistência bacteriana ao arsênio. Adaptado de: Caneschi, W. L.	26
Figura 4: Metodologia do isolamento bacteriano	30
Figura 5: Perfil de identificação dos isolados prospectados dos solos controle, canga e contaminado por arsênio.	33
Figura 6: Representação esquemática da placa de 96 poços usada como matriz para os ensaios de crescimento em diferentes pH's, de tolerância à Manganês, de tolerância à ferro, ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2) e tolerância à Arsenito (etapa 2).	36
Figura 7: representação esquemática da placa de 96 poços usada no ensaio de tolerância à peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).	40
Figura 8: representação esquemática da placa de 96 poços de fundo chato usada no ensaio de produção de biofilme.	42
Figura 9: Diâmetro médio de colônias dos microrganismos isolados de solos controle, tratado com As ⁵⁺ e canga expostos a Arsenato (As ⁵⁺) 10mM, 13mM e 15 mM e Arsenito (As ³⁺) 1mM, 2mM e 3 mM, após 24h da exposição	47
Figura 10: Porcentagem de microrganismos isolados de solos controle, tratado com As ⁵⁺ e canga tolerantes aos tratamentos com Arsenato (As ⁵⁺) 10mM, 13mM e 15 mM e Arsenito (As ³⁺) 1mM, 2mM e 3mM, após 24h da exposição	48
Figura 11: Perfil de crescimento dos 29 isolados selecionados a diferentes pHs após 24h de incubação.	50
Figura 12: Perfil de crescimento dos isolados dos 29 isolados selecionados frente à diferentes concentrações de arsênio e metais após 48h de incubação.	52
Figura 13: Gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Manganês.	53
Figura 14: Placas de Petri com meio LB sólido acrescido de sulfato de manganês após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados	54
Figura 15: Gráfico de Análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Ferro.	55

Figura 16: Placas de Petri com meio LB sólido acrescido de cloreto de ferro após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados.	55
Figura 17: Gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2).	56
Figura 18: Placas de Petri com meio LB sólido acrescido de cloreto de arsenato após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados.	57
Figura 19: Gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Arsenito (etapa 2).	58
Figura 20: Placas de Petri com meio LB sólido acrescido de cloreto de arsenito após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados.	58
Figura 21: Exposição dos isolados selecionados (10) a peróxido de hidrogênio (10-200mM) por 2h.	59
Figura 22: Produção de biofilme calculado a partir da relação entre a absorvância do cristal violeta em 530nm e a OD em 600 nm padronizada para cada bactéria testada.	60
Figura 23: Curvas de crescimento dos isolados selecionados término das medidas em 72h	61
Figura 24: Imagens representativas da coloração de Gram de cada microrganismo analisado.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Data de coleta da coleta e dias de isolamento das bactérias após contaminação por arsênio.....	32
Tabela 2: Isolados microbianos por concentração da diluição seriada, dia de coleta e solo testado	45
Tabela 3: Número de isolados tolerantes aos tratamentos com Arsenato (As^{5+}) 10mM, 13mM e 15 mM e Arsenito (As^{3+}) 1mM, 2mM e 3mM, após 24h da exposição.	46
Tabela 4: pH dos solos controle, canga e tratado com arsênio ao longo de todo o protocolo experimental.	49
Tabela 5: Descrição dos códigos que correspondem aos 29 isolados nas análises de heatmap representadas nas figuras 11 - ensaio de crescimento em diferentes pH's) e figura 12 - ensaio de tolerância à arsênio (etapa 2) e metais.....	51
Tabela 6: Resultado da análise da caracterização morfológica e Gram dos 10 isolados selecionados e códigos.	63
Tabela 7: Resumo dos resultados dos 10 isolados selecionados para os principais experimentos.	64

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Arsênio: natural, onipresente e potencialmente tóxico	16
1.2. Arsênio e a saúde humana	18
1.3. Regiões naturalmente ricas em Arsênio e o Quadrilátero Ferrífero.....	21
1.4. Mecanismos bacterianos de tolerância e resistência à arsênio.....	24
1.5. Aplicações biotecnológicas de bactérias tolerantes/resistentes ao arsênio.....	27
2. Objetivo	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Determinação de grupos experimentais.....	30
3.2. Contaminação do solo.....	31
3.3. Isolamento.....	31
3.4. pH dos grupos Solo Controle, Canga e Arsênio.....	33
3.5. Preparo das placas matrizes para os ensaios de tolerância à arsênio.....	33
3.6. Ensaio de tolerância à Arsênio.....	34
3.6.1. Ensaio de tolerância à arsenato.....	34
3.6.2. Ensaio de tolerância à arsenito.....	35
3.7. Preparo da placa matriz para os ensaios de crescimento em diferentes pH's, de tolerância à manganês, de tolerância à ferro, ensaio de tolerância arsenato (fase 2) e ensaio de tolerância à arsenito (fase 2)	35
3.8. Ensaio de crescimento em diferentes pH's.....	36
3.9. Ensaio de tolerância à Manganês	37
3.10. Ensaio de tolerância à Ferro	37
3.11. Ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2)	38
3.12. Ensaio de tolerância à Arsenito (etapa 2)	38
3.13. Ensaio de tolerância à Peróxido de Hidrogênio	39
3.14. Caracterização dos isolados mais tolerantes	41
3.14.1. Ensaio de produção de Biofilme	41
3.14.2. Curva de crescimento bacteriana	42

3.14.3. Coloração de Gram	42
3.15. Análises estatísticas e heatmaps	43
4. Resultados	44
4.1. Isolamento	44
4.2. Ensaio de tolerância à arsênio	46
4.3. pH dos solos	48
4.4. Ensaio de crescimento em diferentes pH's	49
4.5. Ensaio de tolerância à arsênio (etapa 2) e metais	51
4.5. 1. Ensaio de tolerância à Manganês	53
4.5.2. Ensaio de tolerância à Ferro	54
4.5.3. Ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2)	56
4.5.4. Ensaio de tolerância à Arsenito (etapa 2)	57
4.6. Ensaio de tolerância à Peróxido de Hidrogênio	59
4.7. Caracterização dos isolados mais tolerantes	60
4.7.1. Ensaio de produção de Biofilme	60
4.7.2. Curva de crescimento bacteriana	60
4.7.3. Coloração de Gram	61
5. Discussão	64
6. Conclusão	70
7. Referências bibliográficas	72
8. ANEXOS	80
9. 8.1.SISGEN.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arsênio: natural, onipresente e potencialmente tóxico

O arsênio (As) é um semi-metal de número atômico 33, massa atômica 74,92 e pertencente à família 5A da tabela periódica. É encontrado em toda a crosta terrestre, compondo mais de 200 minerais em associação com outros elementos, como a arsenopirita (MANDAL; SUZUKI, 2002; O'SHEA; JANKOWSKI; SAMMUT, 2007; PEROBELLI; BERNARDINO; FIGUEIREDO, 2004). O As ocorre naturalmente em vários estados de oxidação (3^- , 0, 3^+ e 5^+) e formando compostos orgânicos e inorgânicos. O tipo mais abundante em um local dependerá principalmente de fatores como o potencial de hidrogênio (pH) e potencial redox (Eh) (MASSCHELEYN, DELAUNE, & PATRICK 1991).

Em condições redutoras prevalecem as espécies químicas de As^{+3} e nas condições oxidantes prevalecem as de As^{+5} (CHEN & COSTA, 2021). Esse é o motivo pelo qual o arsenato é a espécie química de As mais presente nos ambientes aeróbios (XIA *et al.*, 2017). Ainda, sob condições oxidantes, as formas inorgânicas de arsênio podem ser metiladas nas espécies ácido monometilarsênio (MMA), ácido dimetilarsênio (DMA) ou óxido de trimetilarsina pelos microrganismos (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; NICOLLI *et al.*, 2012).

O grau de contaminação de arsênio de águas subterrâneas e superficiais reflete a concentração presente no solo (CHEN & COSTA, 2021). Grandes concentrações de arsênio são comumente encontradas em reservas de minérios de cobre, chumbo, ferro e ouro (OREMLAND; STOLZ, 2003). Ele é liberado das rochas e minerais através do intemperismo natural das mesmas, atividade vulcânica e fontes termais (NORDSTROM, 2002). A liberação de arsênio do minério de ferro é o principal meio de contaminação da água subterrânea por este metaloide (CHEN & COSTA, 2021) e sob condições redutoras, arsênio pode ser liberado do sedimento para a coluna d'água (BHATTACHARYA *et al.*, 2002). Além disso, a liberação ainda pode ser aumentada e acelerada por atividades antrópicas como a mineração e o uso de pesticidas (NORDSTROM, 2002).

De acordo com a lista de substâncias prioritárias da ATSDR dos EUA, das substâncias de ocorrência natural que representam risco significativo para a saúde humana, o arsênio ocupa a primeira posição. A toxicidade do arsênio varia de acordo com a espécie química presente. Ela se dá na seguinte ordem: As^{3+} inorgânico > As^{5+} inorgânico > As^{3+} orgânico > As^{5+} inorgânico (USEPA, 2000). A toxicidade do arsenito é 60 vezes maior que a do arsenato (RATNAIKE, 2003).

Os mecanismos bioquímicos que explicam a toxicidade das diferentes espécies de As têm especificidades entre os organismos. Mas há também mecanismos em comum. Uma vez dentro do organismo, o As pode inativar mais de 200 enzimas, sendo afetadas principalmente aquelas envolvidas com o metabolismo energético e com as vias de replicação e reparo de DNA (RATNAIKE, 2003). O arsenato inorgânico (As^{5+}), entra nas células através de transportadores de fosfato (PO_4^{3-}). Em altas concentrações, o arsenato inibe o carreamento de fosfato (CUTTER; CUTTER, 2006). Ele também compete com o fosfato pelo sítio ativo de algumas enzimas fosforilativas, como aquelas do metabolismo da glicose, presentes em todos os seres vivos (TEIXEIRA, 2005).

Já o arsenito inorgânico, quando dentro da célula, estimula a produção de espécies reativas (ERs) (APOSHIAN; APOSHIAN, 2006). As ERs podem reagir com proteínas, lipídeos de membrana e outras biomoléculas, até o próprio DNA (COBO; CASTIREIRA, 1997) prejudicando o funcionamento das mesmas e podendo levar a mutações. Já na forma de trióxido de arsênio (As_2O_3) reage com grupos sulfidril de algumas proteínas e enzimas impedindo a atividade destas (TEIXEIRA, 2005). Dentre elas podemos destacar as enzimas antioxidantes da classe das glutatonas, que protegem as células dos danos causados pelas ERs e a piruvato desidrogenase, que converte piruvato em Acetil-CoA (APOSHIAN; APOSHIAN, 2006; MILLER *et al.*, 2002).

Apesar de o As ser tóxico para a maioria dos organismos, vários microrganismos podem não só tolerar a toxicidade, como também metabolizá-lo. Na respiração anaeróbica, vários procariotos podem usar o arsenato comoceptor de elétrons, reduzindo-o à arsenito e no crescimento quimiolitotrófico, outros procariotos podem oxidar o arsenito à arsenato acoplado à redução de oxigênio ou nitrato (OREMLAND; STOLZ, 2003). Além disso, inúmeros vias de biotransformação de arsênio já foram propostas para uma variedade de micro-organismos. Essas reações, em sua maioria de oxi-redução, têm um papel de grande importância no destino e

toxicidade do arsênio no ambiente (RAHMAN; HASSLER, 2014). Esse assunto será abordado com mais detalhes posteriormente nesse trabalho. O ciclo biogeoquímico do arsênio está detalhado na Figura 1.

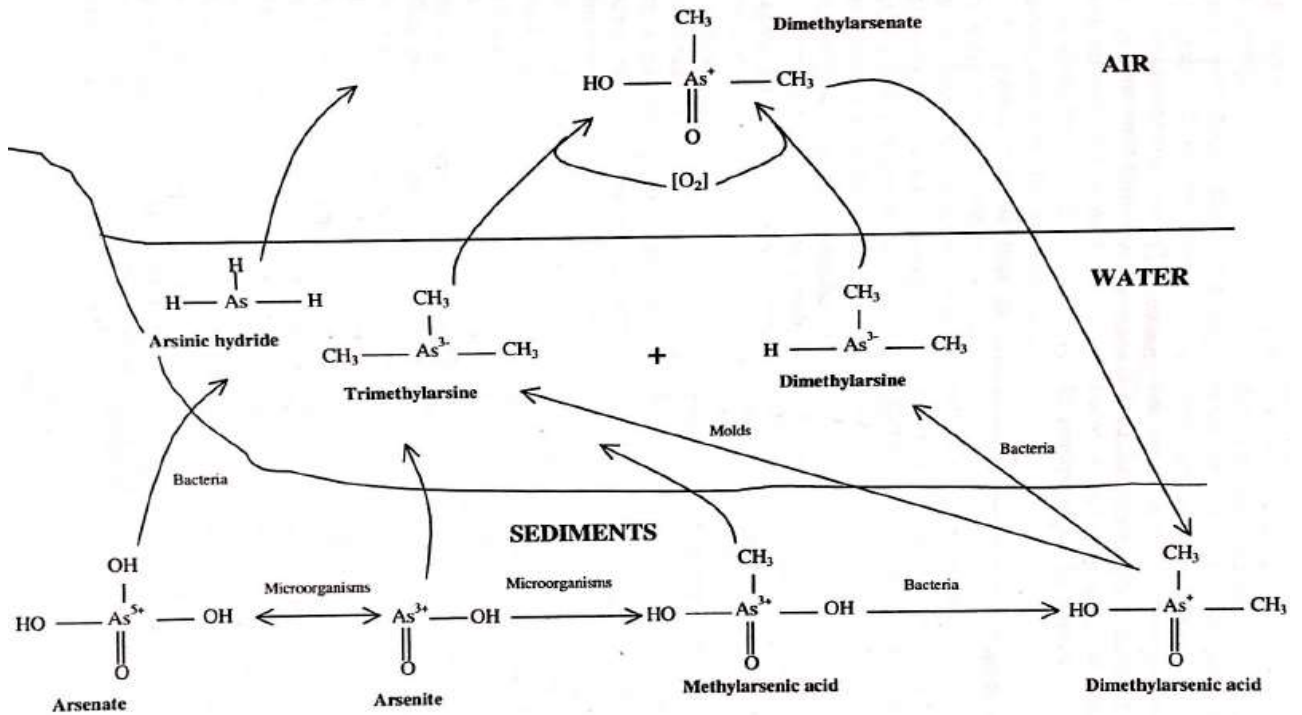


Figura 1: ciclo biogeoquímico do arsênio. Adaptado de: JJEMBA, P. K. *Environmental microbiology*.2004.

1.2. Arsênio e a saúde humana

As principais maneiras de ingestão de As são através da ingestão de água e alimentos contaminados (USEPA, 2000). Desde 1993, a Organização mundial de Saúde (WHO, 2001) considera que a concentração máxima de As total em águas utilizadas para consumo humano seja de 10µg/L. Em solos manipulados por pessoas, a concentração não deve ultrapassar 40mg/kg (WHO, 2001). A ingestão aguda de doses de 100 - 300 mg de As inorgânico é considerada letal (SCHOOLMEESTER & WHITE, 1980).

Em humanos, a ingestão de alimento e água contaminada por As pode levar a manifestações sintomáticas agudas ou crônicas. A intoxicação aguda é aquela que se dá de alguns minutos à algumas horas pós ingestão de grandes concentrações de As e

geralmente é acidental, como na ingestão de pesticidas (RATNAIKE, 2003). Os principais sintomas são desconforto e hemorragias gastrointestinais, dor de garganta e tosse, irritação nos pulmões e falta de ar, dormência e formigamento nas extremidades, fadiga, dores de cabeça e inchaço e vermelhidão na pele (MAZUMBER *et al*, 1999, MAZUMBER *et al*, 2000, USEPA 2000, NCR 2001, ATSDR 2007, WHO 2018)

Já a intoxicação crônica, é aquela causada por um longo de exposição mesmo à pequenas concentrações de As. Os sintomas de exposição crônica por arsênio se desenvolvem de 2 - 6 anos de exposição ou até mais tempo (RAHMAN *et al*, 2001). O que determinará esse tempo é a concentração de As na água, a quantidade diária ingerida e do estado nutricional e de saúde dos indivíduos (RAHMAN *et al*, 2001). Os principais sintomas da intoxicação crônica por arsênio são: problemas de pele, como a hiperpigmentação e hiperqueratose, anemias graves, más formações congênicas e abortos espontâneos, mortalidade infantil e problemas reprodutivos, aumento do risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus, hipertensão, doenças cardiovasculares e pulmonares, aterosclerose, comprometimento cognitivo e em casos mais graves, problemas neurológicos (USEPA, 2000; ATSDR, 2007; CHEN *et al*, 2009; HONG *et al*, 2014; WHO, 2018; HU *et al*, 2020)

Além disso, a exposição crônica ao arsênio está relacionada também ao desenvolvimento de vários tipos de câncer. O As inorgânico foi um dos primeiros compostos a ser reconhecido como carcinógeno em humanos (ROSEN, 1971). Em estudo epidemiológico da Agência Internacional para Pesquisa de Câncer (IARC) revelou risco elevado de desenvolvimento de câncer de bexiga, rins, pele, pulmão, fígado e cólon tanto em homens quanto mulheres (IARC, 2012). E estudos como o de Chiu reforçam ainda mais a relação entre a exposição ao arsênio e o câncer. A pesquisa realizada numa região naturalmente rica em arsênio, em Taiwan, Chiu e colaboradores mostraram que os índices de morte por câncer de pulmão na região caíram gradativamente após instalação de um sistema de tratamento de água, fazendo com as pessoas parassem de consumir a água de poços artesianos contaminados por As (CHIU, 2004).

Apesar de a água contaminada por arsênio ser considerada uma importante fonte de ingestão, estudos recentes têm chamado atenção para a ingestão de arsênio através de alimentos. Mondal e colaboradores apontam que a ingestão de arsênio através de

alimentos é maior do que pelo consumo de água, em Bihar, na Índia (MONDAL *et al.*, 2021) uma das regiões com maiores concentrações de arsênio natural no mundo. Em fevereiro deste ano, a FDA liberou um relatório onde apontou níveis alarmantes de arsênio inorgânico e metais pesados em comida destinada a bebês das principais marcas comercializadas nos EUA. Foram encontradas concentrações de As inorgânico até 60 vezes maior do que o nível considerado seguro pela OMS na água potável, em produtos na prateleira (FDA, 2021).

Não há níveis de exposição de As considerados seguros para bebês e crianças. Uma revisão sistemática realizada por Barranco e colaboradores (2013), associou a exposição precoce ao arsênio a efeitos significativos no desenvolvimento neurológico de crianças. A exposição constante a cerca de 5µg/L de arsênio pode levar a queda no QI, no domínio motor e verbal das crianças, e prejudica a memória e o aprendizado destas (BARRANCO *et al.*, 2013; SIGNES-PASTOR *et al.*, 2019). Estima-se que, a cada aumento de 50% na concentração de As há aproximadamente uma queda de 0,4 pontos no QI das crianças (BARRANCO *et al.*, 2013).

No Brasil, poucos estudos foram feitos para avaliar o risco de ingestão de arsênio através da alimentação. Mas, alguns estudos recentes merecem a atenção, como o de Ng e colaboradores, próximo de uma mina de ouro no município de Paracatu, MG. Este trabalho avaliou o risco para a saúde da exposição ao As bioacessível provindo de várias fontes. A bioacessibilidade determina o potencial real de risco de determinado composto sobre o organismo. Os alimentos apresentaram as maiores concentrações de As bioacessível, tendo arroz e feijão as maiores dosagens encontradas. Estas doses estão associadas com um risco maior que 80% de desenvolver câncer (NG *et al.*, 2019). Dentro todos os grãos consumidos no mundo, o arroz é o que apresenta maiores teores de acúmulo de arsênio inorgânico em seus tecidos, grande parte por causa da sua forma de cultivo em solos irrigados. (MONDAL *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2014).

Além disso, os consumos de pescados também têm sido uma fonte preocupante de ingestão de arsênio. Tanto na região litorânea, quanto peixes de rios que receberam grande aporte de rejeito de minério nos últimos anos têm mostrado acúmulo de metais pesados e arsênio em seus tecidos. Uma nota técnica da ANVISA, de junho de 2019, não aponta níveis preocupantes de As nos tecidos de crustáceos e peixes no rio doce e litoral atingidos pela lama da barragem de Fundão, mas níveis consideráveis de chumbo

e mercúrio foram detectados. Estudos toxicológicos nesse sentido devem ser feitos com frequência por interferência da sazonalidade, como aponta a própria ANVISA (nota técnica ANVISA, 2019).

A vida aquática do rio Paraopeba também foi afetada após o rompimento da barragem do Córrego da Mina do Feijão, Brumadinho em 2015. Um ano após o desastre, foram encontrados níveis significantes de arsênio em peixes e macrófitas do rio durante a estação seca e chumbo durante a estação chuvosa (PARENTE *et al.*, 2021). Já no litoral baiano, arsênio foi o elemento potencialmente tóxico mais encontrado e em maiores concentrações na maioria das espécies de peixes amostradas, seguidos de mercúrio, cádmio e chumbo (DA SILVA *et al.*, 2021). Estes dados são de importância para a saúde pública devido a toxicidade destes compostos e da capacidade de bioacumulação e biomagnificação dos mesmos.

1.3. Regiões naturalmente ricas em Arsênio e o Quadrilátero Ferrífero

Algumas regiões do planeta são naturalmente ricas em arsênio. Cerca de 140 milhões de pessoas, distribuídas em 50 países, estão expostas a concentrações maiores que 10 µg/L de arsênio, provenientes principalmente da água subterrânea usada no abastecimento (WHO, 2018). O arsênio já foi reportado como problema de saúde pública em países como Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungria, Índia, México, Nepal, Taiwan e EUA (AHMAD & HAQUE, 2021). No Brasil, as regiões naturalmente contaminadas por arsênio são também importantes reservas de minérios de interesse econômico como, Al, Au, Fe e Mn (TEIXEIRA *et al.*, 2020). Neste trabalho, daremos mais atenção a uma região em particular, o Quadrilátero Ferrífero (figura 2), em Minas Gerais, sudeste do país.

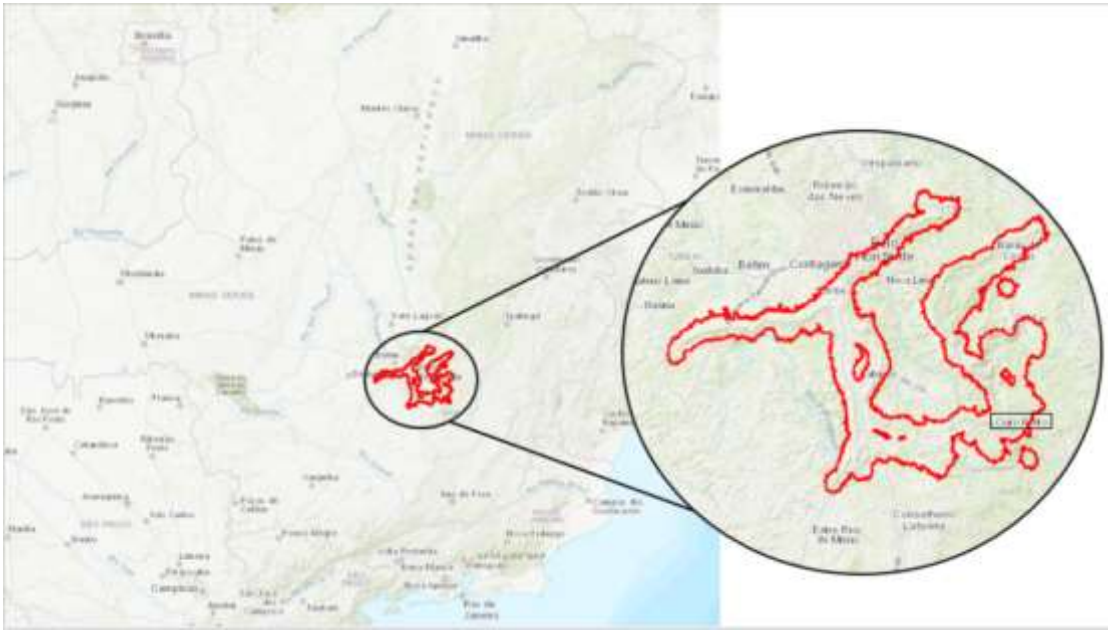


Figura 2: mapa ilustrativo do Quadrilátero Ferrífero na região central do estado de Minas Gerais, Brasil. Na imagem é possível observar o formato quadrangular formado pela cadeia de montanhas da região. ADAPTADO DE INSTITUTO PRÍSTINO: ATLAS DIGITAL GEOAMBIENTAL . Sistema WebGis de livre acesso ao banco de dados ambiental. Disponível em: < <https://institutopristino.org.br/atlas/> > .

Com seu peculiar formato quadrangular, o QF com seus cerca de 7200 km², engloba a atual capital do estado, Belo Horizonte e as históricas e antigas capitais, Ouro Preto e Mariana (JACOBI, 2007). O QF é a continuação sul da Serra do Espinhaço e sua formação geológica é muito antiga. Seu embasamento e a primeira camada de três de rochas metassedimentares supracrustais que o compõe (supergrupo Rio das Velhas) datam do arqueano (cerca de 2,7Ga). Já as outras duas camadas mais superficiais, o supergrupo Minas e o grupo Itacolomy datam do proterozoico (ROESER, 2010).

As atividades mineradoras começaram na região de Ouro Preto no início do século XVII, com a corrida do Ouro. É a segunda maior reserva de minério de ferro do mundo, a atividade mineradora tem se destacado como principal atividade econômica da região desde o início de sua ocupação. A extração de minério desta região representa 1,4% de todo o PIB do Brasil e emprega quase 200 mil trabalhadores diretamente (IBRAM, 2018).

De acordo com o último Inventário Anual de Áreas contaminadas da FEAM, em MG, metais e semi-metais são a segunda classe de contaminantes mais prevalentes no solo (28%). O arsênio é o segundo composto inorgânico acima dos limites da legislação

mais recorrente, ficando atrás apenas do chumbo (16%). As principais fontes desses contaminantes são da lixiviação de resíduos industriais descartados ou armazenados de forma incorreta e do desprendimento destes da matriz do solo e de rochas (FEAM, 2019) pelo intemperismo natural ou acelerado por atividades antrópicas. Estima-se que, no intervalo de tempo de 1962 até 1975, foram liberadas em torno de 100 toneladas de As_2O_3 mensais, no município de Nova Lima como subproduto da produção de ouro (DESCHAMPS *et al.*, 2002)

Pensando nos riscos que o arsênio pode impor à saúde humana e pela composição natural das rochas do QF, vários estudos foram executados a fim de detectar os níveis de As ao qual a população está exposta. Em medições feitas nas águas subterrâneas em antigas minas entre Ouro Preto e Mariana, as concentrações de arsênio total chegaram a 2980 μ g/L e de arsenito em 89 μ g/L (BORBA; FIGUEIREDO; CAVALCANTI, 2004). Já, Gonçalves e colaboradores (2007) encontraram concentrações de 9 – 224 μ g/L de arsenato em fontes públicas, utilizadas por moradores e turistas para dessedentação, na cidade de Ouro Preto. Abreu e colaboradores (2014) encontraram teores de 53 - 960 mg/kg de arsênio total amostrados no solo dos municípios de Nova Lima, Santa Bárbara e Mariana. A concentração média estimada de arsênio em solos ao redor do mundo é de cerca de 5mg/kg (DESCHAMPS *et al.*, 2002)

Poucos estudos toxicológicos envolvendo arsênio e metais pesados em humanos foram realizados na região, mas corroboram com altos níveis encontrados no ambiente. Matschullat e colaboradores (2000) amostraram urina de crianças em idade escolar nos municípios de Nova Lima e Santa Bárbara. Foram encontradas concentrações entre 2,2 – 106 μ g/L de arsênio total, sendo que 22% das amostras apresentaram concentrações superiores a 40 μ g/L.

Mais recentemente, um estudo publicado em 2018, avaliou o impacto aparente dos rejeitos da barragem de Fundão sobre a saúde da população do município de Barra Longa. A lama da barragem atingiu a cidade após o rompimento da barragem em novembro de 2015. O estudo feito pelo Instituto de Saúde e Sustentabilidade em parceria com o Greenpeace avaliou além de questionários sobre a percepção das pessoas sobre a própria saúde após o desastre, fez exames toxicológicos em 11 voluntários. Dentre estes, 5 apresentaram níveis de arsênio no limite superior da normalidade e outros 3 tiveram aumento nos níveis de arsênio no sangue (VORMITTAG, 2018).

Em 2007, o ministério do meio ambiente classificou o QF como área de extrema importância para a conservação e uso sustentável da biodiversidade e encontra-se extremamente ameaçada pela crescente urbanização e atividade mineradora (CANESCHI *et al.*, 2018). Sobre seus topos de montanhas, associadas a uma formação de solo ferruginoso, conhecido por canga, formou-se os campos rupestres ferruginosos. Além dos altos níveis de arsênio e metais pesados, as condições edafoclimáticas do QF fornecem um cenário de alta pressão seletiva sobre a vegetação e outros organismos que ali evoluíram e persistem. Juntamente com o longo tempo de isolamento geográfico e heterogeneidade dos solos associados a cangas são responsáveis pela alta biodiversidade e número de endemismos (GIULIETTI & PIRANI, 1988; JACOBI & CARMO, 2008).

Os solos nas áreas de canga são ricos em minérios de ferro e manganês, ao mesmo tempo em que são muito pobres em nutrientes essenciais, como o fósforo (P <3,9 mg/kg), são ácidos e rasos. (CARMO & JACOBI, 2016). Além dos problemas nutricionais, plantas sobre esse solo ainda têm que lidar com outros fatores de estresse como fortes ventos, temperaturas que chegam próximas à 70°C, altos níveis de radiação UV e seca devido à distribuição sazonal de chuvas (SILVEIRA *et al.*, 2016). A maioria das plantas estabelece uma relação próxima com bactérias e fungos em sua rizosfera e estas relações têm uma influência direta sobre os ciclos biogeoquímicos no entorno das raízes (RENELLA *et al.*, 2007).

1.4. Mecanismos bacterianos de tolerância e resistência à arsênio

A contaminação por metal pesado pode levar a mudanças significativas na população microbiana do solo uma vez que, há uma maior demanda de energia sobre o estresse induzido por metais e também o uso de carbono é reduzido (XU *et al.*, 2019). Por outro lado, estes também têm um papel importante na mobilização de metais e metaloides no ambiente, exsudando enzimas ou outras substâncias, interferindo na solubilidade dos metais (JJEMBA, 2004^a). Os microrganismos podem ser susceptíveis, tolerantes ou resistentes aos metais pesados. Tolerância é a capacidade de um organismos conviver com a toxicidade de um elemento com base em seu metabolismo intrínseco (GADD, 1992). Já resistência é a habilidade de dado organismo sobreviver a determinada perturbação usando de mecanismos de detoxificação induzidos diretamente pelo distúrbio em questão (GADD, 1992).

A produção de uma matriz polimérica extracelular é um exemplo de mecanismo de tolerância bacteriana à exposição ao arsênio e outros elementos potencialmente tóxicos. Polímeros extracelulares de origem bacteriana podem aumentar ou diminuir a mobilidade de metais e metaloides nos solos contaminados (CHEN *et al*, 1995). Quando várias bactérias próximas secretam essa matriz, ocorre a formação de biofilmes bacterianos, que funcionam quase como um organismo único e permite a aderência destas umas às outras e a um substrato. Dentro do biofilme, há a distribuição de nutrientes, secreções bacterianas e este ainda pode proteger as células internas de outros microrganismos competidores e substâncias tóxicas no entorno como antibióticos (JJEMBA, 2004^b) e o próprio arsênio.

Os principais mecanismos de resistência microbianos à metaloides e metais pesados já descritos na literatura são:

- Adsorção do metal na parede celular, por proteínas ou em polissacarídeos extracelulares impedindo a entrada deste na célula (SOCOTT E PALMER, 1990);
- Exclusão, em que o microrganismo em questão pode induzir modificações químicas alternadas em porinas na membrana para diminuir a captura de determinado metal ou metaloide (ROUCH *et al.*, 1995);
- Bombas de efluxo, que aumentam a capacidade da bactéria em expulsar o metal pesado internalizado (SATO & KAOBOYASHI, 1998);
- Volatilização, em que o microrganismo induz a transformação do metal em um produto volátil (BRUINS *et al*, 2000);
- Compartimentalização, que permite um bioacúmulo do metal dentro célula, mas evitando que este comprometa funções vitais (BRUINS *et al*, 2000);

- Sequestro, que permite o bioacúmulo do metal através da formação de produtos insolúveis que vão precipitar no interior da célula (BIANCHI *et al.*, 1981; COOK *et al.* 1998).

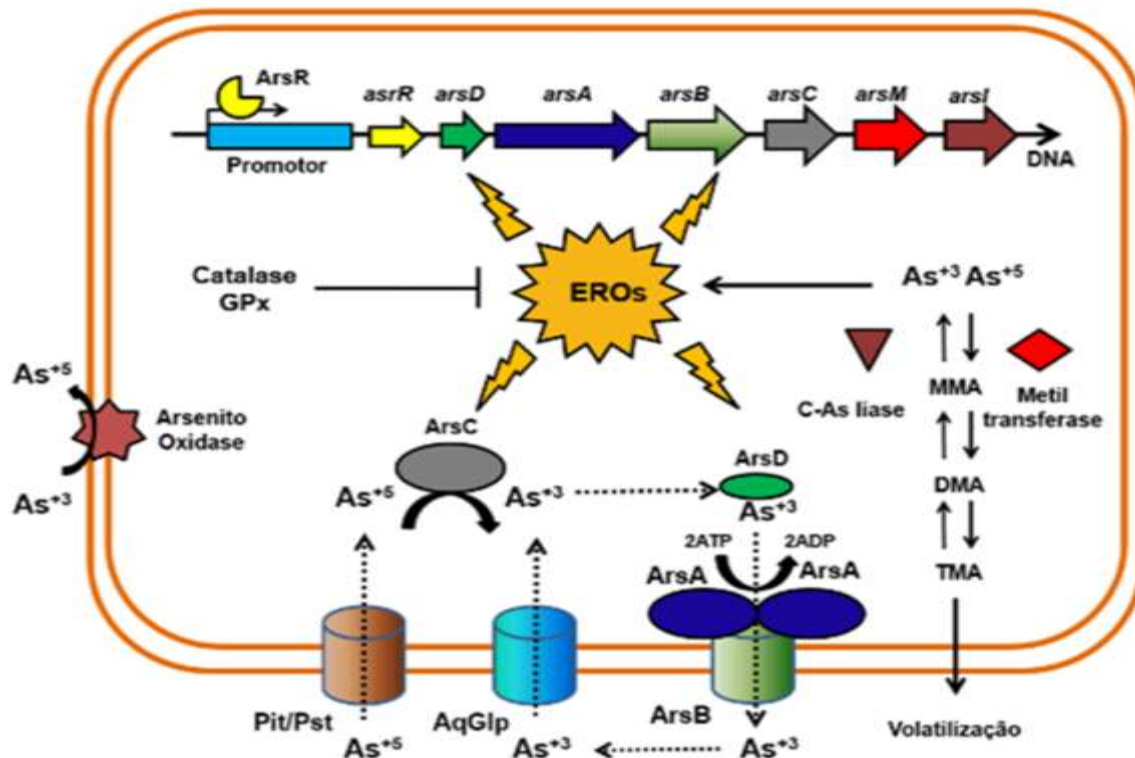


Figura 3: mecanismos de resistência bacteriana ao arsênio. Cada cor dos genes no operon indica qual proteína é traduzida a partir dele. Adaptado de: Caneschi, W. L.

Algumas bactérias podem ter um operon inteiro dedicado a lidar com a toxicidade do arsênio, o operon Ars (SATO & KOBAYASHI, 1998). Este pode ser encontrado tanto ligado ao DNA cromossomal quanto em plasmídeos (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009). Os genes centrais codificam para o repressor transcricional ArsR, para a bomba de efluxo de arsenito ArsB e para a arsenato redutase ArsC (XU *et al.*, 1998). Mas, mais genes de resistência podem estar presentes, em outras bactérias, organizados no cluster arsRDABC, em que ArsA é uma ATPase que fornece energia para ArsB, ArsD é uma chaperona de arsênio para o bomba de efluxo ArsAB, transferindo as formas trivalentes do metalóide para a subunidade ArsA da bomba e aumentando a afinidade desta pelo arsenito (LIN *et al.*, 2007). O operon ainda pode contar com os genes ArsM e ArsI que codificam para as enzimas, metil transferase e C-Ars-liase, respectivamente. Ambas participam do processo de metilação do AS. O funcionamento do operon Ars e de outros mecanismos de resistência bacteriana ao arsênio estão esquematizados na figura 3.

Além destes mecanismos já descritos, bactérias e outros microrganismos podem ainda metilar o arsênio (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009). O mecanismo geral de metilação do As por bactérias começa com a redução do As⁵⁺ a As³⁺, mediada por glutatona e outros compostos com grupos tióis (KRAUTLER 1990; STUPPERICH 1993). Em seguida à redução, ocorre a adição de grupos metil, reações catalisadas por metil transferases e liases (C-As liase), gerando em série vários compostos metilados de As, na seguinte ordem: metil-arsenito (MMA), Dimetil-arsenito (DMA-III) e óxido de trimetil-arsina (TMAO) (DOMBROWSKI *et al.*, 2005). O TMAO é um composto volátil de arsênio e altamente tóxico.

1.5. Aplicações biotecnológicas de bactérias tolerantes/resistentes ao arsênio

Talvez a aplicação biotecnológica mais óbvia para a aplicação das bactérias tolerantes/resistentes ao arsênio seja em processos de biorremediação. Biorremediação é o uso de organismos vivos para eliminar, reduzir ou detoxificar contaminantes ambientes (JJEMBA, 2004^c). Ao contrário do que acontece com compostos orgânicos, arsênio e metais pesados não podem ser eliminados do ambiente. Nesse caso, a biorremediação se dá pela transformação dessas espécies químicas mais tóxicas em menos tóxicas (detoxificação) e/ou diminuindo a bioacessibilidade desses compostos (JJEMBA, 2004^a).

O potencial biorremediador de As de bactérias depende diretamente da capacidade desses organismos em lidar com a toxicidade desse composto. E isto está diretamente ligado aos mecanismos de resistência e tolerância destas (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009). Para atuar como biorremediador, as bactérias podem bioacumular arsênio em sua biomassa, internamente ou adsorvido na parede celular (SILVER & PHUNG, 1996). Elas ainda podem biolixiviar o metaloide do sítio em questão (VERMA; KUILA, 2019); biotransformar as espécies mais tóxicas de As em menos tóxicas (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009; UPADHYAY *et al.*, 2018; VERMA; KUILA, 2019); indisponibilizar o As ao biomineralizar esse elemento (KEIM, 2011; VERMA; KUILA, 2019).

O processo de biorremediação usando bactérias pode ter sua eficiência aumentada se o processo for planejado pensando nos mecanismos que regulam o crescimento e atividade dessas bactérias, no local em que devem atuar. Devem ser

levados em conta fatores bióticos e abióticos do local e também o potencial metabólico das bactérias diante de várias modificações ambientais (ALVAREZ *et al.*, 2017). As bactérias ainda podem ser modificadas a partir de engenharia genética para aumentar a eficiência do mecanismo de resistência/tolerância ao lidar com o As, aumentando também o sucesso da biorremediação (SAUGE-MERLE *et al.*, 2003).

Outra aplicação envolve utilizar dos mecanismos de resistência bacteriano para auxiliar na agricultura em solos contaminados por As, atuando como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB, do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*). PGPB são bactérias, encontrados associados às plantas ou à rizosfera e que de alguma forma beneficiam a planta, seja produzindo hormônios de crescimento vegetais, compostos antiparasitários e de defesa ou até ajudando a biodisponibilizar sais e nutrientes essenciais, antes imobilizados no solo e rizosfera (GROVER *et al.*, 2011; GLICK, 2012).

O As também pode ser bastante tóxico para vegetais. Já foi visto que células radiculares de plantas expostas ao As apresentaram aberrações em cromátides e trocas das cromátides irmãs (GRANT, 1982), aumento nas taxas de micronúcleos (WU *et al.*, 2010), redução de índices mitóticos (YI *et al.*, 2007) e alterações na expressão gênica (MYLONA *et al.*, 1998). Além disso, o arsênio afeta particularmente o desenvolvimento radicular das plantas e também pode levar à perda de produtividade, inclusive em espécies de grande interesse econômico (BARBOSA, 2003).

Bactérias resistentes ao arsênio podem atuar como PGPB através de processos detoxificação, diminuindo a toxicidade da espécie de As presente; através de biotransformação ou liberação de exsudatos ou matriz polimérica extracelular que assim, pode imobilizar o As na rizosfera, evitando a captura pelas plantas ou ainda, apenas ajudando a planta a se manter saudável pelo auxílio na biodisponibilização e captura de nutrientes essenciais como P, Fe e N (UPADHYAY *et al.*, 2018). Estudos como o de Mallick e colaboradores com bactérias isoladas de mangue altamente resistentes à arsênio, mostraram que quando plantado na presença dessas bactérias, os níveis de arsênio no arroz diminuíram e o crescimento da planta foi maior (MALLICK *et al.*, 2018).

Estudos *in vitro* nesse sentido já foram, inclusive, executados com bactérias endofíticas isoladas de plantas endêmicas e nativas dos campos rupestres ferruginosos

do QF. Felestrino e colaboradores demonstraram que sementes de tomate quando crescidas juntas de isolados bacterianos resistentes a arsênio em solo contaminado têm um melhor taxa de germinação e melhor desenvolvimento apical e radicular quando comparadas àquelas sementes em solo contaminado sem os isolados (FELESTRINO *et al.*, 2018).

Sendo assim, o estudo e a aplicação de microrganismos para o tratamento de ambientes contaminados por metais e metalóides são de grande importância e vem despertando interesse. Neste estudo procuramos bioprospectar bactérias de solos contaminados ou não com arsênio e avaliar características úteis para possíveis aplicações biotecnológicas dos isolados obtidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Bioprospectar e avaliar a tolerância à arsênio da comunidade bacteriana de solos artificialmente e naturalmente por arsênio através de métodos dependentes de cultivo.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar a tolerância à arsenato e arsenito das bactérias isoladas do solo controle, solo artificialmente contaminado e solo naturalmente contaminado por arsênio;
- Comparar a tolerância à arsenato e arsenito das bactérias isoladas em diferentes intervalos de tempo pós-contaminação do solo;
- Avaliar a tolerância a ferro e manganês das bactérias que se mostraram tolerantes ao arsênio;
- Determinar a faixa de pH em que os isolados mais tolerantes ao arsênio são capazes de crescer;
- Avaliar se a tolerância ao arsênio das bactérias com melhor desempenho nos ensaios anteriores é mediada pelo sistema antioxidante das células através de um ensaio de tolerância ao peróxido de hidrogênio.
- Caracterizar os isolados bacterianos com melhor desempenho nos ensaios anteriores quanto ao padrão de crescimento, capacidade de produção de biofilme e características morfológicas e de parede celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência das etapas experimentais está resumida na figura 4.

3.1. Determinação de grupos experimentais

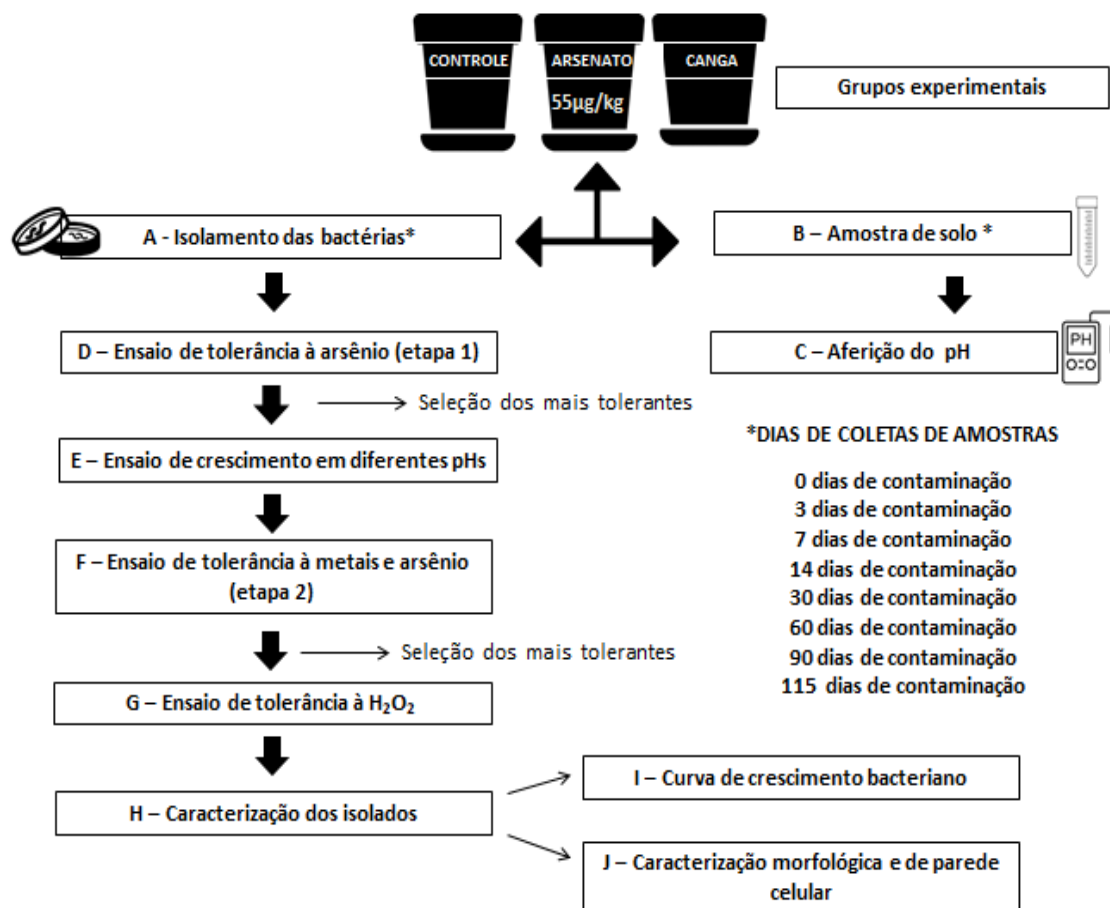


Figura 4: esquema das metodologias e etapas realizadas ao longo do desenvolvimento do projeto.

Foram determinados 3 grupos experimentais para o projeto:

- Solo controle, sem concentração adicional de arsênio. 10 kg de solo comercial, vendido em floriculturas para cultivo de hortas, foi acondicionado em vaso e mantido em casa de vegetação por 115 dias.
- Solo recém-contaminado por arsênio, representando um caso de contaminação aguda. Para isso, um solo comercial do mesmo tipo e lote do controle, foi contaminado com hidrogenoarsenato de sódio numa concentração de 55 µM/kg. Este foi mantido em casa de vegetação por 115 dias;
- Solo de canga*, representando um caso de contaminação crônica. Cerca de 10 kg de solo de uma área de canga couraçada do *Campus Morro do Cruzeiro* da

UFOP (S 20°23'37" e 43°30'34") foi acondicionado em vaso e mantido em casa de vegetação durante 115 dias;

* OBS: devido à dureza deste tipo de rocha, o local onde foi possível escavar para obter solo havia a presença de muitas raízes de gramíneas.

3.2. Contaminação do solo

O protocolo de contaminação do solo foi adaptado de Qing Xia *et al.*, (2016). 10 kg de solo comercial foram contaminados com o sal hidrogenoarsenato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / Sigma Aldrich) numa concentração de $55\mu\text{M/kg}$. Essa concentração é a máxima concentração de arsênio estipulada pela resolução CONAMA 420/2009 para solos de áreas residenciais. A contaminação aconteceu no espaço das edículas (sob-responsabilidade do DEQUI/ICEB/UFOP) entre os blocos II e III do ICEB. A área é destinada para armazenamento de resíduos químicos. Para garantir a proteção do solo local, uma lona plástica foi colocada sobre o piso cimentado da edícula e uma bandeja, também plástica, foi posta sobre essa lona para, em seguida, iniciar a contaminação do solo.

Para contaminar os 10 kg de solo comercial, 0,675 g de Hidrogenoarsenato de sódio foram diluídos em 400 mL de água destilada. Uma camada fina de solo foi espalhada sobre uma bandeja plástica e a solução com arsênio foi pulverizada, com auxílio de uma bomba spray manual, até o solo ficar umedecido. Enquanto o solo era pulverizado, também era revirado com uma pá plástica. A contaminação se seguiu da mesma forma até os 10 kg de solo terem sido contaminados/umedecidos com a solução de arsenato. As frações de solo tinham aproximadamente a mesma espessura e foram umedecidas com aproximadamente o mesmo volume de solução.

Em seguida à contaminação, os vasos foram acondicionados em casa de vegetação, no Horto Botânico, anexo ao ICEB, sob-responsabilidade do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente da UFOP. Durante 115 dias o solo foi regado para manutenção da microbiota ali presente. A rega do solo foi feita sempre com o mesmo volume de água por vaso, sendo necessário entre 200 mL e 300 mL de água de torneira para umedecer o solo a cerca de 60-70% de saturação. A rega foi feita a cada dois dias, em dias amenos (maior parte dos dias) e todos os dias, em dias mais quentes.

3.3. Isolamento

Para cada dia de coleta de amostra e isolamento bacteriano, que se deram imediatamente antes à contaminação e, em 3, 7, 14, 30, 60, 90 e 115 dias após a contaminação (tabela 1), foram recolhidos de cada grupo (controle, canga e contaminado com arsênio) alíquotas de solo em tubo de 15 mL para o isolamento bacteriano. Os tubos foram previamente autoclavados e devidamente identificados. Dessa amostra, para cada grupo, foram pesados 3 g de solo em tubos previamente esterilizados. Em seguida, foram adicionados 5 mL de água destilada autoclavada. Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos para desprender as células das partículas de solo. Após agitação, os tubos descansaram por 30 minutos para o solo decantar. Após descanso, foram aliqüotados 1 mL de cada tubo Falcon para tubos de 1,5 mL, identificado como extrato bruto dos isolados. Desse extrato bruto foram feitas diluições seriadas nas seguintes concentrações: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Por fim, de cada diluição foram aliqüotados 100 μ L para placas de petri com meio Luria-Bertani (LB) sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 5g/L e ágar bacteriológico 14g/ L) acrescido de fungicida Viper 700[®] na concentração de 200 μ L/L.

Tabela 1: Data de coleta do coleta e dias de isolamento das bactérias após contaminação por arsênio.

DATAS DE COLETAS DE AMOSTRAS:

Dia 0 de contaminação – 23/08/2019

Dia 3 de contaminação – 26/08/2019

Dia 7 de contaminação – 30/08/2019

Dia 14 de contaminação – 06/09/2019

Dia 30 de contaminação – 21/09/2019

Dia 60 de contaminação – 22/10/2019

Dia 90 de contaminação – 21/11/2019

Dia 115 de contaminação – 16/12/2019

Em seguida, as placas de petri foram incubadas em BOD à 28 °C por 24h. Após a incubação, as colônias foram selecionadas com auxílio de palitos de madeira autoclavados utilizando características macromorfológicas como método de seleção dos isolados. Cada colônia selecionada foi estriada em 1/4 de placa de petri com meio LB

sólido. A partir desse momento, cada isolado recebeu uma identificação de acordo com o dia de isolamento, grupo e diluição, como demonstrado na figura 4.

Após estriamento, os isolados foram novamente incubados à 28 °C por 24h em BOD. Passado este tempo, foi raspado uma alíquota de cada colônia isolada estriada e diluída em meio LB líquido (sem adição de ágar bacteriológico). Estas alíquotas foram mais uma vez incubadas à 28 °C por 24h em BOD e por fim, foram preservados em glicerol 15% e armazenados em freezer à -20 °.

CÓDIGOS DOS ISOLADOS:	Dias da contaminação podem ser:
Exemplo: 0 COA 1	0, 3, 7, 15, 30, 60, 90 e 115.
0 = dia de isolamento, no caso é o isolamento do dia de contaminação 0;	Grupos podem ser:
CO = grupo, no caso é um isolado do grupo controle;	CO = controle;
A = referente à concentração da diluição seriada, no caso a diluição é 10 ⁻¹ ;	CA = canga;
1 = número do isolado dessa série;	AS = contaminado com arsênio.
	Diluições podem ser:
	A= diluição 10 ⁻¹ ;
	B= diluição 10 ⁻² ;
	C= diluição 10 ⁻³ .

Figura 5: Perfil de identificação dos isolados prospectados dos solos controle, canga e contaminado por arsênio.

3.4. pH dos grupos Solo Controle, Canga e Arsênio

Durante 115 dias, em intervalos de tempo pós-contaminação do solo por arsênio (mesmos intervalos de tempo do isolamento) foram recolhidas amostra de solos dos 3 grupos (solo controle, solo canga e solo contaminado por arsênio) para aferição de pH destes ao longo do tempo. Para isto, 3 gramas de solo de cada grupo foram diluídas em 20mL de água ultra pura e agitado por cerca de 30 segundos em vórtex. Logo após agitação, o pH foi aferido através de pHgâmetro (AZ série 86505).

3.5. Preparo das placas matrizes para os ensaios de tolerância à arsênio

Todos os isolados bacterianos obtidos na etapa de isolamento foram utilizados neste ensaio. Para isso, eles foram divididos em 6 grupos, e uma placa matriz de 96 poços foi preparada para cada um dos grupos para dinamizar os experimentos. Foram adicionados nos poços das placas 100 µL de meio LB líquido. Em seguida, cada isolado obtido e preservado em glicerol 15% à -20 °C foi inoculado na placa de 96 poços, com auxílio de palitos de madeira previamente autoclavados, sendo um isolado por poço.

Um poço foi deixado apenas com LB, como controle negativo e um poço foi inoculado com *Escherichia coli*, utilizada como controle positivo de crescimento. As placas matrizes foram incubadas por 24h a 28 °C em BOD. Após a incubação, foi adicionado glicerol numa concentração final de 15% em cada um dos poços e então foram armazenadas também em freezer à -20 °C.

3.6. Ensaio de tolerância à Arsênio

Para verificar a tolerância dos isolados bacterianos frente ao arsênio, eles foram desafiados a crescer em meio de cultura sólido acrescido de dois sais diferentes deste elemento. Primeiramente, cada uma das placas matrizes (de 1 a 6) detalhadas acima foi repicada em uma nova placa de 96 poços contendo 100 µL de meio LB líquido, com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pontas estéril. Estas placas de trabalho foram incubadas por 24h à 28 °C em BOD. Também foram preparadas, logo antes de iniciar os experimentos, soluções-mãe em água destilada a 1 M dos sais hidrogenoarsenato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / Sigma Aldrich) para o ensaio de tolerância à arsenato e de meta-arsenito de Sódio (Na_2AsO_2 / Sigma Aldrich) para o ensaio de tolerância à arsenito. Ambas as soluções foram filtradas com filtro de seringa de 2 µm e acondicionadas em tubos estéreis.

A tolerância à arsenato e a tolerância à arsenito foram avaliadas pelas médias do diâmetro de crescimento da colônia de cada isolado bacteriano nas réplicas do experimento. São consideradas tolerantes aquelas bactérias cujas colônias tiveram crescimento a partir 3 mm no meio acrescido de alguma espécie química de arsênio e cujo diâmetro dessas colônias variou pouco entre as réplicas nas concentrações de arsenato e arsenito testadas, quando comparadas ao controle. A análise das imagens e medições dos diâmetros das colônias foram realizadas com o software *Image J* versão para *Windows*.

3.6.1. Ensaio de tolerância à arsenato (fase 1)

À partir da solução mãe de 1 M de arsenato de sódio, foram preparadas placas de petri de 150 mm x 15 mm com meio LB sólido pH 5,5 acrescidos de arsenato de sódio nas seguintes concentrações: 10 mM, 13 mM e 15 mM.. Uma placa de petri contendo apenas meio LB sólido foi usada como controle para comparação de crescimento na ausência e na presença de arsenato.

Após às 24h de incubação, com o auxílio do multi-inoculador de 96 pontas, cada uma das 6 placas de trabalho de 96 poços foram “carimbadas” em placas de petri 150 mm x 15 mm com o meio LB sólido acrescido de arsenato nas concentrações descritas acima e na placa controle. Em seguida, foram incubadas por 24h à 28 °C em BOD. Após as 24h, as placas foram tiradas da incubação e fotografadas para posterior avaliação do diâmetro das colônias. Todo o ensaio foi executado em triplicatas biológicas / independentes.

3.6.2. Ensaio de tolerância à arsenito (fase 1)

À partir da solução mãe 1 M de arsenito de sódio, foram preparadas placas de petri de 150 mm x 15 mm com meio LB sólido pH 6,5 acrescidos de arsenito de sódio nas seguintes concentrações: 1 mM, 2 mM e 3 mM. Uma placa de petri contendo apenas meio LB sólido foi usada como controle para comparação de crescimento na ausência e na presença de arsenito.

Após às 24h de incubação, com o auxílio do multi-inoculador de 96 pontas, cada uma das 6 placas de trabalho de 96 poços foram “carimbadas” em placas de petri 150 mm x 15 mm com o meio LB sólido acrescido de arsenito nas concentrações descritas acima e na placa controle. Em seguida, foram incubadas por 24h à 28 °C em BOD. Após as 24h, as placas foram tiradas da incubação e fotografadas para posterior avaliação do diâmetro das colônias. Todo o ensaio foi executado em triplicatas biológicas / independentes.

3.7. Preparo da placa matriz para os ensaios de crescimento em diferentes pH's, de tolerância à manganês, de tolerância à ferro, ensaio de tolerância à maiores concentrações de arsenato (fase 2) e de arsenito (fase 2).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de tolerância à arsenato e de tolerância à arsenito, 29 isolados foram selecionados (conforme descrito no item 3.6) para uma nova rodada de experimentos. Para isso, foi montada uma nova placa matriz. Foram adicionados nos poços da placa de 96 poços, 100 µL de meio LB líquido e os isolados selecionados foram inoculados nos poços com o auxílio de palitos de madeira autoclavados. Alguns poços foram deixados apenas com o meio LB líquido e usados como controle negativo. Um poço foi inoculado com *E. coli* como controle positivo de crescimento. Essa placa foi incubada por 24h à 28 °C em BOD e depois adicionado

glicerol numa concentração final de 15% em cada um dos poços. Esta foi armazenada também em freezer à -20 °C. A distribuição dos isolados na placa matriz está sumarizada na figura abaixo (figura 6):

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
7 ASA 5	7 CAA 7	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	3 CAA 6	3 COA 8	3 COA 7	0 ASA 5	0 CAC 1	0 COB 1	0 COA 2	A
90 CAB 4	90 COB 4	60 ASC 2	60 ASB 2	60 CAC 2	60 COC 2	30 ASC 12	30 CAA 6	30 COA 4	15 ASA 3	15 CAA 1	15 COB 11	B
0 ASA 5	0 CAC 1	0 COB 1	0 COA 2	LB	LB	LB	115 ASA 3	115 CAA 2	115 COB 5	115 COA 5	90 ASC 1	C
30 COA 4	15 ASA 3	15 CAA 1	15 COB 11	7 ASA 5	7 CAA 7	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	3 CAA 6	3 COA 8	3 COA 7	D
115 CAA 2	115 COB 5	115 COA 5	90 ASC 1	90 CAB 4	90 COB 4	60 ASC 2	60 ASB 2	60 CAC 2	60 COC 2	30 ASC 12	30 CAA 6	E
3 ASA 11	3 CAA 6	3 COA 8	3 COA 7	0 ASA 5	0 CAC 1	0 COB 1	0 COA 2	LB	LB	LB	115 ASA 3	F
60 CAC 2	60 COC 2	30 ASC 12	30 CAA 6	30 COA 4	15 ASA 3	15 CAA 1	15 COB 11	7 ASA 5	7 CAA 7	7 COB 4	3 ASB 4	G
<i>E. coli</i>	LB	LB	115 ASA 3	115 CAA 2	115 COB 5	115 COA 5	90 ASC 1	90 CAB 4	90 COB 4	60 ASC 2	60 ASB 2	H

Figura 6: representação esquemática da placa de 96 poços usada como matriz para os ensaios de crescimento em diferentes pH's, de tolerância à Manganês, de tolerância à ferro, ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2) e tolerância à Arsenito (etapa 2). Os quadros em verde representam poços com os 29 isolados bacterianos submetidos aos ensaios, sendo um isolado diferente por poço. Cada isolado aparece 3 vezes na placa (réplica técnica). Os quadros em lilás representam os poços contendo somente meio LB (Luria-Bertani) líquido, que foram utilizados como controle negativo do experimento. Já o quadro em amarelo representa o poço inoculado com *Escherichia coli*, usada como controle positivo do experimento.

3.8. Ensaio de crescimento em diferentes pH's

Para verificar em qual faixa de pH os isolados conseguem crescer, a placa matriz representada na figura 6 foi repicada em uma nova placa de 96 poços contendo 100µL de meio LB líquido, com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pontas estéril. Essa placa de trabalho foi incubadas por 24h à 28°C em BOD. Após às 24h de incubação, novamente com o multi-inoculador de 96 pontas, cada uma das 6 placas de trabalho de 96 poços foram “carimbadas” em placas de petri 150mm x 15mm contendo meio LB sólido ajustado para os seguintes pH's: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12. As placas de petri foram

incubadas à 28°C em BOD e foram avaliadas e fotografadas após 24h de crescimento. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas independentes. O resultado foi analisado através das médias do diâmetro de crescimento de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para *Windows*.

3.9. Ensaio de tolerância à Manganês

Para verificar a tolerância dos isolados bacterianos frente ao manganês, eles foram desafiados a crescer em meio de cultura LB sólido acrescido de manganês. Primeiramente, a placa matriz (Figura 6) foi repicada em uma nova placa de 96 poços contendo 100µL de meio LB líquido, com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pontas estéril. Essa placa de trabalho foi incubada por 24h à 28°C em BOD. Após o tempo de incubação dessa placa, novamente com o multi-inoculador de 96 pontas, ela foi “carimbada” em placas de petri 150mmx15mm com o meio cultura LB acrescido de Sulfato de Manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / Dinâmica) nas seguintes concentrações: 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM e 70mM. As placas de petri foram incubadas à 28°C em BOD e foram avaliadas e fotografadas após 24h e 48h de crescimento. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas / independentes. O resultado foi analisado através das médias do diâmetro de crescimento de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para *Windows*.

3.10. Ensaio de tolerância à Ferro

Para verificar a tolerância dos isolados bacterianos frente ao ferro, eles foram desafiados a crescer em meio de cultura LB sólido acrescido de ferro. Primeiramente, a placa matriz (Figura 6) foi repicada em uma nova placa de 96 poços contendo 100µL de meio LB líquido, com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pontas estéril. Essa placa de trabalho foi incubada por 24h à 28°C em BOD. Após o tempo de incubação dessa placa, novamente com o multi-inoculador de 96 pontas, ela foi “carimbada” em placas de petri 150mmx15mm com o meio cultura acrescido de Cloreto de Ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / Synth) nas seguintes concentrações: 4mM, 6mM, 8mM, 10mM, 12mM e 15mM. As placas de petri foram incubadas à 28°C em BOD e foram avaliadas e fotografadas após 24h e 48h de crescimento. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas independentes. O resultado foi analisado

através das médias do diâmetro de crescimento de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para Windows.

3.11. Ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2)

Uma vez verificada a tolerância dos isolados bacterianos frente ao arsenato, os 29 isolados selecionados foram submetidos a concentrações ainda maiores deste elemento a fim de determinar a partir de qual concentração o crescimento bacteriano é inibido. A placa matriz (Figura 6) foi repicada em uma nova placa de 96 poços contendo 100µL de meio LB líquido, com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pontas estéril. Essa placa de trabalho foi incubada por 24h à 28°C em BOD. Após o tempo de incubação dessa placa, novamente com o multi-inoculador de 96 pontas, ela foi “carimbada” em placas de petri 150mmx15mm com o meio cultura LB sólido pH 5,5 acrescido de Hidrogenoarsenato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / Sigma Aldrich) nas seguintes concentrações: 25mM, 50mM, 100mM, 200mM, 300mM e 400mM. As placas de petri foram incubadas à 28°C em BOD e foram avaliadas e fotografadas após 24h e 48h de crescimento. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas independentes. O resultado foi analisado através das médias do diâmetro de crescimento de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para Windows.

3.12. Ensaio de tolerância à Arsenito (etapa 2)

Uma vez verificada a tolerância dos isolados bacterianos frente ao arsenito, os 29 isolados selecionados foram submetidos a concentrações ainda maiores deste elemento a fim de determinar a partir de qual concentração o crescimento bacteriano é inibido. A placa matriz (Figura 6) foi repicada em uma nova placa de 96 poços contendo 100µL de meio LB líquido, com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pontas estéril. Essa placa de trabalho foi incubada por 24h à 28°C em BOD. Após o tempo de incubação dessa placa, novamente com o multi-inoculador de 96 pontas, ela foi “carimbada” em placas de petri 150mmx15mm com o meio cultura LB sólido pH 6,5 acrescido de (Meta)arsenito de Sódio (Na_2AsO_2 / Sigma Aldrich) nas seguintes concentrações: 4mM, 5mM, 10mM, 12mM e 15mM. As placas de petri foram incubadas à 28°C em BOD e foram avaliadas e fotografadas após 24h e 48h de

crescimento. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas / independentes. O resultado foi analisado através das médias do diâmetro de crescimento de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para Windows.

3.13. Ensaio de tolerância à Peróxido de Hidrogênio

Após a etapa 2 dos ensaios de tolerância à arsenato e arsenito, foi feita uma nova seleção de isolados. Os 10 isolados cujo crescimento foi menos afetado pelo aumento de concentração dos sais de arsênio (quando comparado ao controle) foram utilizados para uma nova rodada de experimentos. Para avaliar se esses isolados são tolerantes ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) inicialmente eles foram repicados em microtubos com 2000µl de LB líquido à 28°C por 48h. Passado este tempo, as amostras tiveram a OD^{600nm} medida em espectrofotômetro e em seguida padronizada em 0,02 Abs em 2mL de meio LB líquido. Então, os isolados foram centrifugados a 10 000 x g por 20 min. Pós-centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de cada tubo ressuspensionado em 2000µl de solução salina tamponada de fosfato (PBS - NaCl 1,40M; Na₂HPO₄ 73,90mM e NaH₂PO₄.H₂O 25,73mM em água ultrapura). As soluções de peróxido de hidrogênio foram preparadas em água destilada autoclavada nas concentrações 10mM, 25mM, 50mM, 75mM, 100mM, 125mM e 200 mM.

Como o peróxido de hidrogênio é uma espécie química instável e sua concentração decai com o tempo pós-abertura do frasco, logo antes do preparo, a sua absorvância foi medida em espectrofotômetro em 240nm para cálculo de sua molaridade ao substituir o valor de absorvância obtida na fórmula:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C(M)$$

A= absorvância obtida no espectrofotômetro após excitação em 240nm;

ϵ = constante para cada substância. A do peróxido de hidrogênio é 43,6;

b= área da cubeta usada para medir a absorvância da solução (d³);

C= é a concentração molar da substância.

Em placas de 96 poços foi adicionado 100µl de solução de peróxido por poço, sendo que cada linha (de A à H) correspondendo a uma concentração diferente de peróxido + controle (apenas água destilada). Em seguida, foi pipetado em cada poço 50 µl da solução de isolado bacteriano ressuspensionada em PBS. Cada coluna corresponde a

um isolado diferente mais controle positivo (*E. coli*) e controle negativo (poços sem inóculo bacteriano). O desenho esquemático da placa está sumarizado na figura 7. Em seguida a montagem da placa, esta foi incubada à 28°C em BOD por 30 minutos. Passado o tempo de incubação, com o auxílio do multi-inoculador de 96 poços, essa placa foi “carimbada” em placa de petri de 150mmx15mm e esta incubada à 28°C em BOD. As placas foram analisadas e fotografadas após 24h e 48h de crescimento. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas independentes. O resultado foi analisado através das médias do diâmetro de crescimento de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para Windows.

	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
0 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	A
10 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	4 ASA 11	B
25 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	5 ASA 11	C
50 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	D
75 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	E
100 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	F
125 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	G
200 mM	LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	H

Figura 7: representação esquemática da placa de 96 poços usada no ensaio de tolerância à peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Cada linha (de A à H) contém uma concentração diferente de H₂O₂ (em mM) mais o controle (apenas PBS) e cada coluna (1 À 12) representa os isolados submetidos ao teste mais os controles positivos e negativos. Os quadros em verde representam 10 isolados bacterianos testados. Os quadros em lilás representam os poços contendo somente PBS + meio LB (Luria-Bertani) líquido, que foram utilizados como controle negativo do experimento. Já os quadros em amarelo representam o poço inoculado com *Escherichia coli*, usada como controle positivo de crescimento do experimento.

3.14. Caracterização dos isolados mais tolerantes

3.14.1. Ensaio de produção de Biofilme

Este ensaio foi feito utilizando o protocolo descrito por O'Toole (2011) com adaptações. Os isolados foram cultivados em microtubos em 2mL de meio LB líquido por 24h à 28°C em BOD. Passado este tempo, a OD^{600nm} foi medida em espectrofotômetro e padronizada em 0,02 Abs. Numa placa de 96 poços de fundo chato, foram acrescentados 100µl de meio LB líquido por poço e em seguida foi adicionado aos poços, 50µL de isolado bacteriano com a OD^{600nm} padronizada, sendo um isolado por poço. O desenho esquemático da placa está sumarizado na figura 8. Em seguida, a placa foi incubada à 28°C por 48h em BOD. Passado este tempo, o meio LB contendo os isolados foi descartado e a placa lavada com água destilada corrente para remoção das células bacterianas. A placa foi posta para secagem em temperatura ambiente por aproximadamente 1h invertida sobre papéis absorventes. Após a secagem, foi adicionado 150µl 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 corrente e a mesma foi colocada em temperatura ambiente por aproximadamente 1h, invertida sobre papel absorvente para secagem da placa. Após a secagem, foi adicionado 150µl de etanol 95% em cada poço da placa e deixado em repouso por 45 min para a total dissolução do cristal violeta. A placa foi lida em leitor de placas (Perkin Elmer - Victor X3, número de série: 20301368) com detector de fotometria numa excitação de 530nm. O valor da absorbância obtido foi computado e tabelado. O resultado para verificar a produção de biofilme é o valor da relação entre a abs 530nm final sobre o valor da OD^{600nm} inicial. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo a média dos resultados utilizada como valor final. Este ensaio foi executado em triplicatas amostrais e duplicatas biológicas / independentes. O resultado foi analisado através das médias da razão Abs 530nm/ OD^{600nm} de cada isolado em cada réplica feita. A análise das imagens e medição do diâmetro das colônias foi feita através do software *Image J* versão para Windows.

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	A
LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	B
LB	E. coli	115 ASA 3	90 ASC 1	60 ASC 2	60 COC 2	30 ASC 12	15 ASA 3	7 ASA 5	7 COB 4	3 ASB 4	3 ASA 11	C

Figura 8: representação esquemática da placa de 96 poços de fundo chato usada no ensaio de produção de biofilme. Os quadros em verde representam 10 isolados bacterianos testados. Os quadros em lilás representam os poços contendo somente meio LB líquido, que foram utilizados como controle negativo do experimento. Já os quadros em amarelo representam os poços inoculados com *Escherichia coli*, usada como controle positivo de crescimento do experimento.

3.14.2. Curva de crescimento bacteriana

Para conhecer o perfil de crescimento dos 10 isolados mais tolerantes à arsênio, foram feitas curvas de crescimento bacteriano a partir da medição em espectrofotômetro da OD^{600nm} ao longo do tempo. Para isso, 100µL de cada um dos isolados foi repicado em 30mL de meio LB líquido e incubados sob agitação à 28°C por 24h. Foi utilizada *E. coli* como controle positivo de crescimento do experimento e um tubo contendo apenas meio LB líquido como controle negativo. Após 24h, os isolados tiveram a OD^{600nm} mensurada e esta foi padronizada em cerca de 0,01 Abs em 200mL de volume final com meio LB líquido. A OD^{600nm} foi novamente aferida para contabilizar o tempo 0 de crescimento e a partir de então, os isolados foram incubados sob agitação à 28°C. Os isolados tiveram suas OD^{600nm} avaliadas até se observar estagnação nos valores medidos em relação às medidas anteriores ou até uma leve queda nesses valores. Dessa forma, foram realizadas medições nos seguintes intervalos de tempo: 0h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h de crescimento. As curvas de crescimento bacteriano foram plotados em gráficos utilizando o software Microsoft office Excel 2010.

3.14.3. Caracterização morfológica e de parede celular

Para caracterizar os isolados quanto à morfologia das células bacterianas e estrutura da parede celular foi realizado o ensaio de coloração de Gram. Para isso, cada um dos 10 isolados bacterianos mais resistentes foi estriado em placas de petri 90 mmx15 mm e incubados à 28°C por 24h em BOD. Passado este tempo, foram feitos esfregaços com uma pequena quantidade de cada isolado em lâminas para microscopia

com auxílio de alça de platina estéril. Elas foram reservadas e deixadas secar ao natural por alguns minutos. Com o esfregão já seco, as lâminas foram cobertas com uma solução de cristal violeta e aquecidas em bico de Bunsen até o corante secar completamente para a fixação deste nas células bacterianas. Em seguida, as lâminas foram cobertas com água destilada durante 45 segundos. Passado este tempo, a água foi escorrida e as lâminas lavadas sob um filete de água corrente. Pós-lavagem, as lâminas foram cobertas com uma solução de lugol (1/20) durante 1 minuto. Então, o lugol foi descartado e as lâminas novamente lavadas com um filete de água corrente. Após esta etapa, as mesmas foram lavadas com álcool etílico 99,5°GL para lavagem do cristal violeta até que não fosse mais possível observar a saída do corante. Em seguida, o álcool foi escorrido e as lâminas cobertas com uma solução de fucsina que foi deixada agir por 30 segundos. Passado este tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar ao ar livre sobre papel filtro. As lâminas foram lidas e analisadas com a objetiva de 100x com óleo de imersão num microscópio Leica.

3.15. Análises estatísticas e heatmaps

As análises estatísticas para os ensaios de tolerância de à manganês, ferro, arsenato (etapa 2) e arsenito (etapa 2) foram executadas no programa estatístico R studio com os pacotes *vegan* e *gplots*. Foram feitas às análises de GLM (modelo linear generalizado) com distribuição de Poisson, seguidas de análise de PCA (análise de componentes principais). O grau de significância (α) considerado foi de 0,05. O isolado 60 ASB 2 foi excluído das análises para todos os ensaios de tolerância pois apresentou crescimento 0 no controle.

Já os heatmaps foram gerados no servidor online *Heatmapper* (<http://www.heatmapper.ca>) com o mapa de expressão. Para as análises de “Crescimento em diferentes faixas de pH” e “Ensaio de tolerância á peróxido” foram comparadas as distâncias euclidianas das médias dos diâmetros de crescimento de cada isolado. Já para a análise de “Tolerância à arsênio (etapa 2) e metais” também foram comparadas as distâncias euclidianas das médias dos diâmetros de crescimento de cada isolado e estas foram agrupadas de acordo com a média dessa distância.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento

De todos os grupos de solo e dias de isolamento, foram obtidos 466 isolados bacterianos (tabela 2), selecionados de acordo com o morfotipo da colônia. Pela análise da tabela 2, quando analisamos a soma total de isolados obtidos, podemos observar que o número total de isolados variou entre os tipos de solos testados, sendo o solo controle o que apresentou um maior número de isolados (215), seguido do solo contaminado por arsênio (158) e por fim o de canga (93). Em relação aos dias de isolamento, não foram detectadas diferenças significativas entre cada coleta para todos os solos testados.

Quando comparamos as diluições separadamente, o número de colônias isoladas foi diminuindo com o aumento da diluição. Assim, a menor diluição (10^{-1}) contribuiu com a maior parte do número de colônias isoladas, no valor total. Isto também é verdade quando comparamos o número de isolados por grupo de solo e por dias de isolamento em relação as outras diluições (10^{-2} e 10^{-3}). Ainda sobre a diluição 10^{-1} , em números absolutos, os isolados provenientes do solo canga superaram os provenientes do solo artificialmente contaminado por arsênio, o que não se repetiu nas outras diluições.

Tabela 2: Isolados microbianos por dia de coleta e solo testado em números absolutos. Total se refere à soma de todos isolados, considerando todas as diluições da diluição seriada adotada para o isolamento.

	Dia de contaminação	Controle	Arsênio	Canga	Total
TOTAL	0	22	17	15	54
	3	25	22	19	66
	7	30	15	17	62
	14	27	18	9	54
	30	25	22	8	55
	60	27	20	10	57
	90	33	23	5	61
	115	26	21	10	57
	Total	215	158	93	466
DILUIÇÃO 10⁻¹	0	12	15	11	38
	3	10	11	11	32
	7	8	7	9	24
	14	4	4	5	13
	30	7	0	8	15
	60	8	4	4	16
	90	9	7	4	20
	115	10	6	8	24
	Total	68	54	60	182
DILUIÇÃO 10⁻²	0	4	1	2	7
	3	8	8	4	20
	7	11	8	8	27
	14	12	6	4	22
	30	8	10	0	18
	60	11	4	7	22
	90	16	6	4	26
	115	9	8	2	19
	Total	79	51	31	161
DILUIÇÃO 10⁻³	0	6	1	2	9
	3	6	3	4	13
	7	10	0	0	10
	14	12	8	0	20
	30	8	12	0	20
	60	8	9	2	19
	90	8	10	1	19
	115	7	7	0	14
	Total	65	50	9	124

4.2. Ensaios de tolerância à arsênio

Todos os 468 isolados obtidos no isolamento foram submetidos à diferentes doses de Arsenato (As^{5+}) 10mM, 13mM e 15 mM e Arsenito (As^{3+}) 1mM, 2mM e 3 mM. Após a incubação no meio acrescido de As^{5+} ou As^{3+} , os isolados foram analisados de acordo com o tamanho da colônia formada (em mm), 24h após a exposição, como descrito em 3.5.1 e 3.5.2. Na tabela 3, está sumarizado o número absoluto de isolados para cada dia de prospecção em relação aos tratamentos e ao meio controle LB, sem exposição. Nossos dados demonstram que para todos os dias de isolamento o número de isolados que foram tolerantes aos tratamentos foi bastante similar, salvo algumas exceções, como para o dia 90 nos tratamentos para o arsenato. Em relação aos experimentos com arsenito, podemos observar uma variabilidade um pouco maior em relação aos isolados tolerantes por dia de prospecção, principalmente no dia 0, em que poucos isolados foram tolerantes ao metaloide.

Tabela 3: Número de isolados tolerantes aos tratamentos com Arsenato (As^{5+}) 10mM, 13mM e 15mM e Arsenito (As^{3+}) 1mM, 2mM e 3mM, após 24h da exposição.

ENSAIO DE TOLERÂNCIA À ARSÊNIO - quantos isolados cresceram (nº absolutos)							
	10mM As^{5+}	13mM As^{5+}	15mM As^{5+}	1mM As^{5+}	2mM As^{3+}	3mM As^{3+}	Meio LB
Dia 0	34	36	34	15	11	0	54
Dia 3	46	39	44	48	36	15	64
Dia 7	45	45	43	50	35	23	59
Dia 14	38	37	36	50	33	16	50
Dia 30	36	36	36	35	19	12	52
Dia 60	41	41	37	42	38	31	51
Dia 90	27	22	16	38	29	17	57
Dia 115	36	32	45	34	30	24	57
Controle	153	148	145	152	120	61	206
Arsênio	94	89	86	105	83	63	150
Canga	56	51	50	55	28	14	87

Quando comparamos o número de isolados em relação aos tratamentos, sem diferenciar o solo de origem, podemos observar pela análise do gráfico da figura 9, que muitos isolados foram tolerantes aos tratamentos de Arsenato em todas as doses testadas, com um diâmetro médio de colônia de 1 a 3 mm, e que alguns microorganismos se destacam em relação à tolerância por apresentarem diâmetros maiores. Quando comparamos os dados dos tratamentos com arsenito, podemos observar que o número de isolados tolerantes é significativamente menor em relação ao tratamento controle e ao de arsenato, e que o diâmetro médio de colônias é menor e proporcionalmente decai com o aumento da dose de exposição.

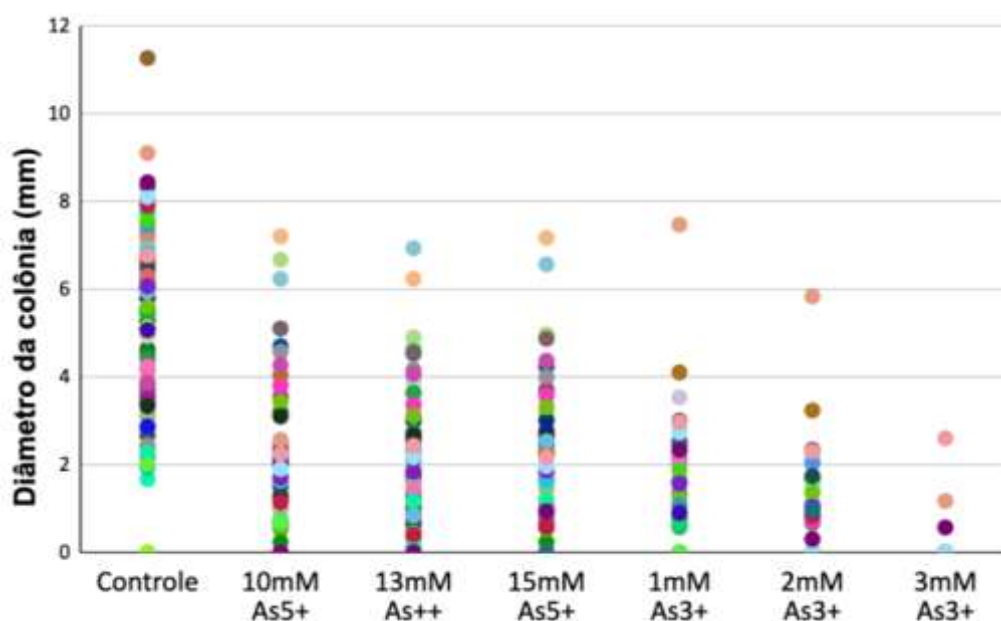


Figura 9: Diâmetro médio das colônias de bactérias isoladas de solos controle, tratado com As^{5+} e canga expostos a Arsenato (As^{5+}) 10mM, 13mM e 15 mM e Arsenito (As^{3+}) 1mM, 2mM e 3 mM, após 24h da exposição. As cores indicam a média de crescimento das réplicas de cada isolado.

Ao analisarmos a porcentagem de isolados tolerantes em relação ao solo de origem, podemos observar pela análise da figura 10 que os isolados provenientes do solo controle, sem tratamento, estavam presentes em maior número para todos os tratamentos testados, seguidos dos isolados do solo tratado com As^{5+} e do solo de canga.

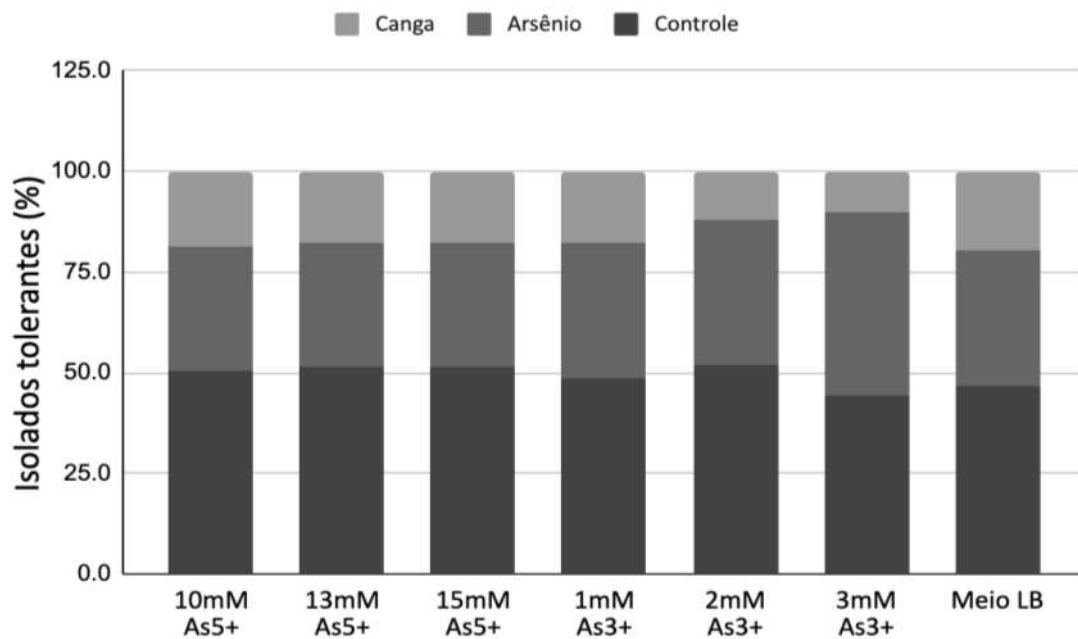


Figura 10: Porcentagem de microrganismos isolados de solos controle, tratado com As⁵⁺ e canga tolerantes aos tratamentos com Arsenato (As⁵⁺) 10mM, 13mM e 15 mM e Arsenito (As³⁺) 1mM, 2mM e 3mM, após 24h da exposição.

4.3. pH dos solos

O pH dos solos testados foi aferido, conforme descrito nos materiais e métodos. Pela análise da tabela 4, todos os solos testados mantiveram seu pH médio ao longo de todo o experimento. Além disso, o solo comercial e o contaminado por arsênio apresentou pH mais básico, cerca de 8,4 - 9,6, que o solo de canga 7,4 - 8.

Tabela 4: pH dos solos controle, canga e contaminado com arsênio ao longo de todo o protocolo experimental (115 dias).

	CONTROLE	CANGA	ARSÊNIO
Dia 0 de contaminação	9,49	8,18	8,44
Dia 3 de contaminação	9,64	7,43	9,47
Dia 7 de contaminação	9,53	7,44	9,5
Dia 14 de contaminação	9,36	8,26	9,64
Dia 30 de contaminação	9,52	7,8	9,55
Dia 60 de contaminação	9,52	7,84	9,33
Dia 90 de contaminação	9,45	8,35	9,49
Dia 115 de contaminação	8,53	7,74	9,34

4.4. Ensaio de crescimento em diferentes pH's

Realizados os ensaios de tolerância à arsenato e arsenito, os mais tolerantes (como descrito no item 3.6) foram selecionados para uma nova rodada de experimentos. Dentre os 468 isolados, 29 apresentaram uma alta tolerância ao semi-metal. Para começar, eles foram estudados em relação à faixa de pH as quais são capazes de crescer. Os microrganismos foram desafiados a pHs que variaram de ácido à básico, 4 a 12. Para análise desses resultados foi construído um *heatmap* que classifica a capacidade de crescimento por escala de cor, como detalhado na legenda da figura. Cada linha representa um isolado diferente, identificado à direita de 1 à 29. Qual isolado corresponde à cada isolado pode ser conferido na tabela 5. Como esperado, de acordo com a análise da figura 11 podemos observar que todos os isolados crescem em pHs de neutro a básico. Destaque para os isolados 1 (115 ASA 3), 12 (30 ASC 12) e 13 (30 CAA 6) que são capazes de crescer em pHs maiores que

10. Vale ressaltar, que o pH dos solos testados nesse trabalho, como discutido acima, são classificados como básicos (7-9).

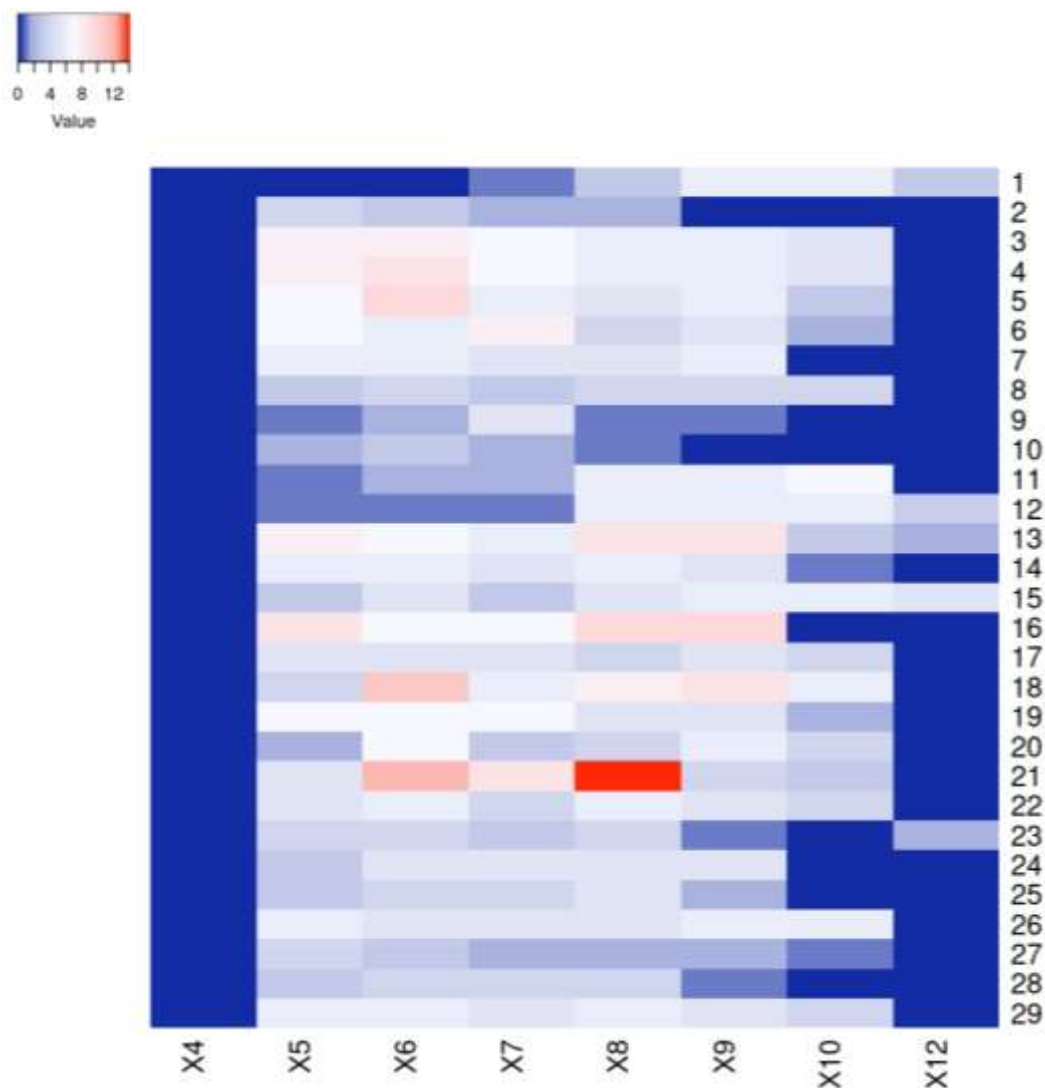


Figura 11: perfil de crescimento dos 29 isolados selecionados a diferentes pHs após 24h de incubação. Os isolados foram cultivados em placa de petri com meio LB sólido nos pHs entre 4 e 12 (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12). As médias dos diâmetros das colônias foram plotadas na forma de heatmap, em que o perfil de crescimento foi codificado em escalas de cores, onde azul escuro significa não cresceu e vermelho indica o maior crescimento encontrado no experimento. O código que corresponde à qual isolado pode ser consultado na tabela 5.

Tabela 5: descrição dos códigos que correspondem aos 29 isolados nas análises de heatmap representadas nas figuras 11 - ensaio de crescimento em diferentes pH's) e figura 12 - ensaio de tolerância à arsênio (etapa 2) e metais.

Código	Isolados	Código	Isolados
1	115ASA3	16	15CAA1
2	115CAA2	17	15COB11
3	115COB5	18	7ASA5
4	115COA5	19	7CAA7
5	90ASC1	20	7COB4
6	90CAB4	21	3ASB4
7	90COB4	22	3ASA11
8	60ASC2	23	3CAA6
9	60ASB2	24	3COA8
10	60CAC2	25	3COA7
11	60COC2	26	0ASA5
12	30ASC12	27	0CAC1
13	30CAA6	28	0COB1
14	30COA4	29	0COA2
15	15ASA3		

4.5. Ensaio de tolerância à arsênio (etapa 2) e metais

Os 29 isolados selecionados após os resultados da etapa 4.2 foram submetidos a concentrações maiores de arsenato e arsenito e também desafiados a crescer em várias concentrações de Ferro e Manganês. O perfil geral de tolerância à Mn, As e Fe pode ser visualizado no heatmap da figura 12. No heatmap é possível observar que os isolados foram agrupados em dois grandes grupos. Os isolados mais tolerantes à arsênio estão agrupados na parte superior do mapa e os isolados mais tolerantes à Mn e Fe no grupo da parte inferior. Não houve crescimento bacteriano nas maiores concentrações de ferro testadas (10 mM, 12 mM e 15mM) no “ensaio de tolerância à ferro” e das maiores concentrações de arsenito testadas (12 mM e 15 mM) no “ensaio de concentração à arsenito” e por isso essas concentrações não entraram nas análises.

Dentre os 29 isolados testados, cerca de 7 tiveram crescimento significativo para serem considerados tolerantes à Mn, sendo 4 originados do solo canga, 2 do solo controle e 1 solo contaminado por As. Já para o Fe, apenas 3 isolados tiveram crescimento significativo para serem considerados tolerantes à Fe, cada um de origem diferente. 12 isolados tiveram crescimento significativo tanto no arsenato quanto no arsenito, sendo 8 de origem do solo contaminado por arsênio e o restante pertencente ao grupo controle.

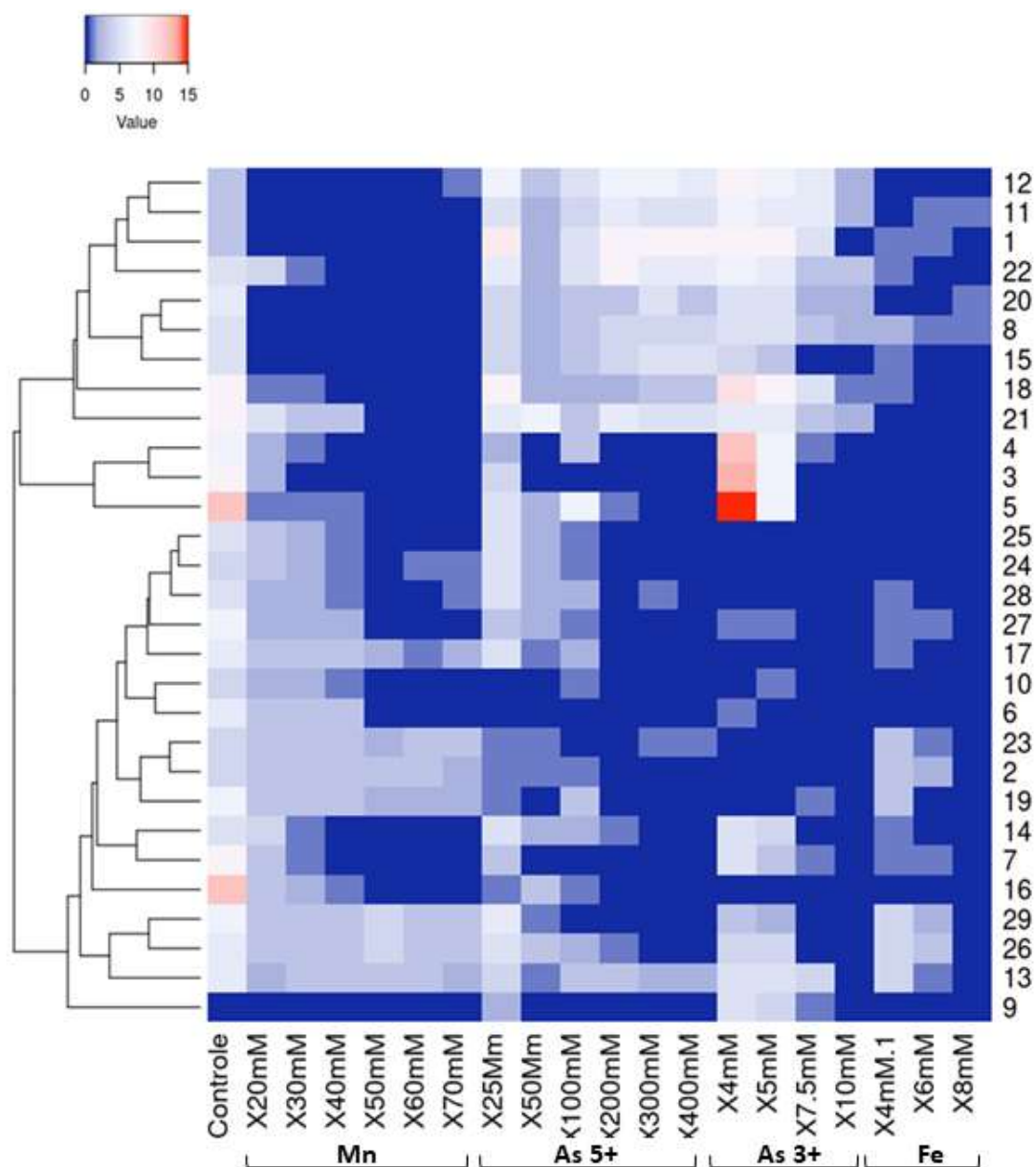


Figura 12: Perfil de crescimento dos isolados dos 29 isolados selecionados frente à diferentes concentrações de arsênio e metais após 48h de incubação. Os isolados foram cultivados em placas de petri com meio LB sólido acrescido de sulfato de manganês [20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM e 70m], de arsenato de sódio [25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 400 mM], de arsenito de sódio [4 mM, 5 mM, 7,5 mM e 10 mM] e cloreto de ferro [4 mM, 6

mM, 8 mM]. No controle, os isolados foram crescidos em LB sólido. As médias dos diâmetros das colônias foram plotadas na forma de heatmap, em que o perfil de crescimento foi codificado em escalas de cores, onde azul escuro significa não cresceu e vermelho indica o maior crescimento encontrado no experimento. Os isolados foram agrupados quanto à média e distância euclidiana em relação à elas. O código que corresponde à qual isolado pode ser consultado na tabela 5.

4.5.1. Ensaio de tolerância à Manganês

A partir da análise de PCA (figura 13) dos dados de tolerância à Mn, é possível observar que houve uma diminuição significativa no diâmetro das colônias quando comparado o controle em relação a menor concentração de Mn testada (20mM). Também é perceptível que nas concentrações de 20 mM, 30mM e 40mM, o número de isolados que cresceram e o diâmetro destes parece permanecer quase constante. A partir da dose de 50mM houve um decaimento no número de isolados capazes de crescer frente ao Mn. Esse número e o diâmetro dos isolados também pareceu permanecer constante nas concentrações seguintes (60mM e 70mM). Com esse resultado, podemos afirmar que o diâmetro das colônias parece ser dose dependente de Mn, numa relação inversamente proporcional porém não de uma forma linear dentre as concentrações de Mn testadas. É possível visualizar esses resultados também na figura 14.

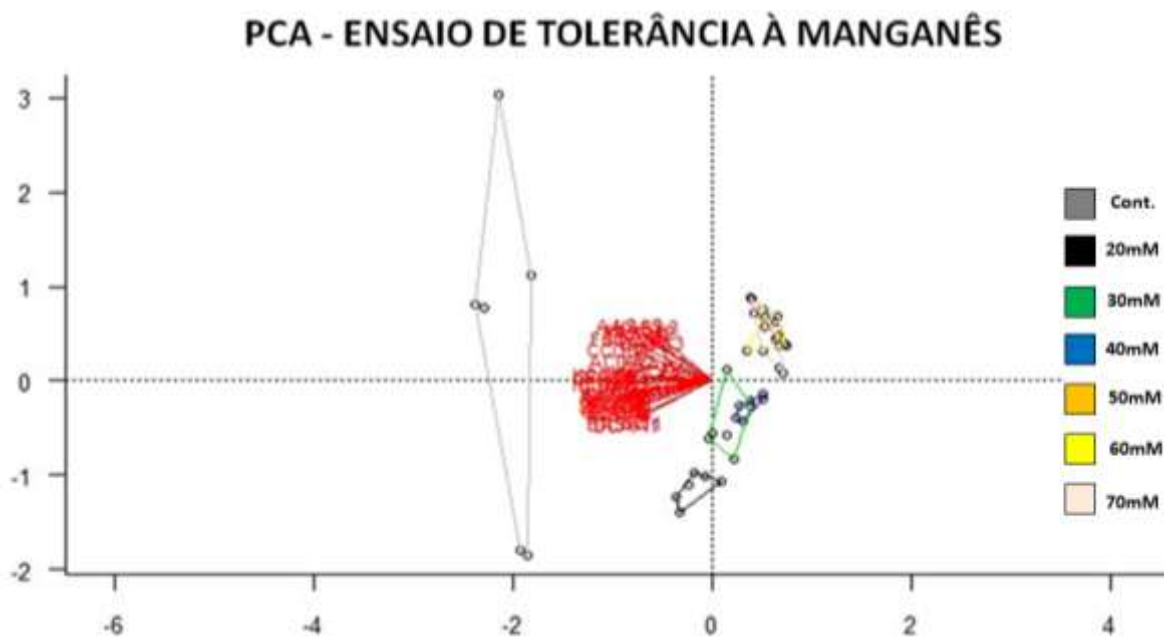


Figura 13: gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Manganês. Cada polígono representa uma concentração de manganês : 20 mM (preto), 30mM (verde), 40 mM (azul), 50mM (laranja), 60mM (amarelo) 70mM (rosa) e

Controle (cinza). Quanto mais deslocado à esquerda estão os elementos gráficos (setas e polígonos) e maior o perímetro destes, mais heterogêneo foi o conjunto de dados analisados. Em vermelho, os isolados.

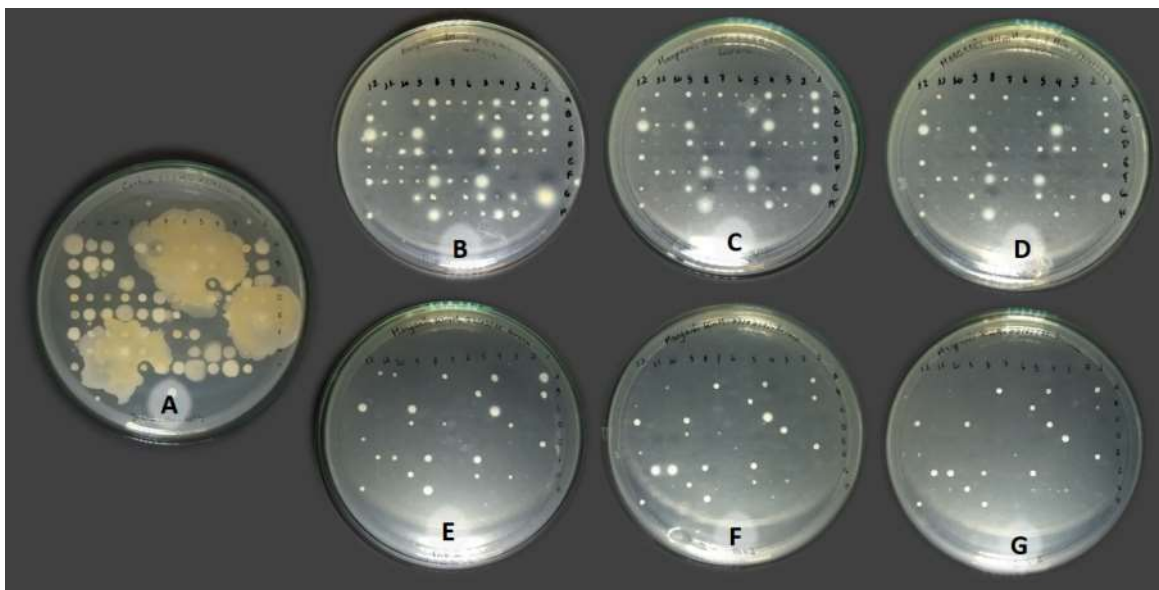


Figura 14: placas de petri com meio LB sólido acrescido de sulfato de manganês após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados. A = controle [0mM de Mn], B = [20 mM], C = [30 mM], D = [40 mM], E = [50 mM], F = [60 mM] e G = [70m].

4.5.2. Ensaio de tolerância à Ferro

No geral, todos os 29 isolados mostraram-se sensíveis ao ferro. Através da análise de PCA dos dados de tolerância à ferro (figura 15), é nítido observar uma diminuição do diâmetro das colônias dos isolados quando comparamos o controle com a primeira concentração de Fe testada (4mM). Também é possível observar que os isolados que conseguiram crescer frente ao Fe, tiveram diâmetros mais ou menos constantes nas duas concentrações apresentadas. Esses resultados também podem ser visualizados na figura 16.

PCA - ENSAIO DE TOLERÂNCIA À FERRO

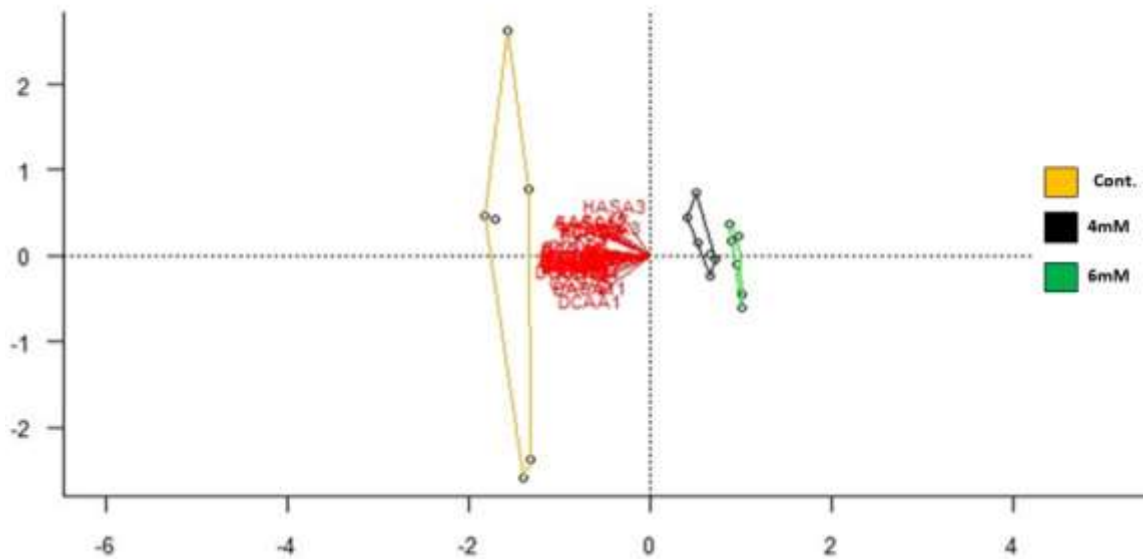


Figura 15: gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Ferro. Cada polígono representa uma concentração de ferro diferente: 4 mM (preto), 6 mM (verde), Controle (laranja). Quanto mais deslocado à esquerda estão os elementos gráficos (setas e polígonos) e maior o perímetro destes, mais heterogêneo foi o conjunto de dados analisados. Em vermelho, os isolados. Como não houve crescimento dos isolados nas outras concentrações de ferro testadas, estas não entraram nas análises

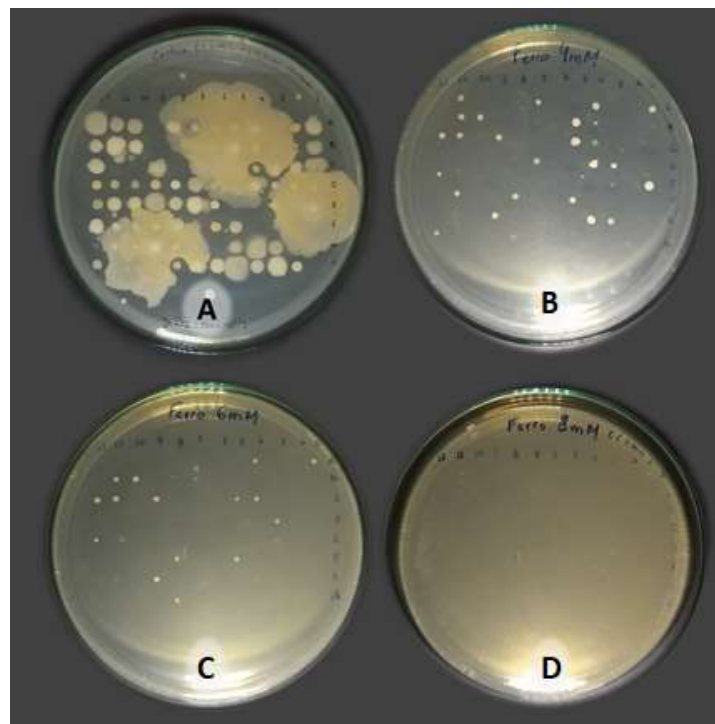


Figura 16: placas de petri com meio LB sólido acrescido de cloreto de ferro após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados. Há uma diminuição significativa no número de colônias que crescem no diâmetro quando comparado as placas A = controle [0 mM de Fe] e B = [4 mM] e C = [6 mM]. Nas placa de D = [8 mM] não houve crescimento significativo de nenhum isolado.

4.5.3. Ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2)

Através da análise de PCA dos dados de tolerância à arsenato (figura 17) podemos observar que houve uma diminuição significativa no diâmetro de crescimento de um grupo de colônias dentre as 29, quando comparamos o controle em relação às concentrações de arsenato testadas. Enquanto outro grupo menor de isolados dentre o total, manteve um crescimento quase constante desde o controle até a maior concentração testada. O número de isolados e diâmetro de crescimento das colônias dos isolados testados parece variar mais quando comparamos os resultados das três primeiras doses testadas (25 mM, 50 mM e 100mM) e permaneceu mais ou menos constante nas maiores concentrações testadas. Estes resultados também podem ser visualizados na figura 18.

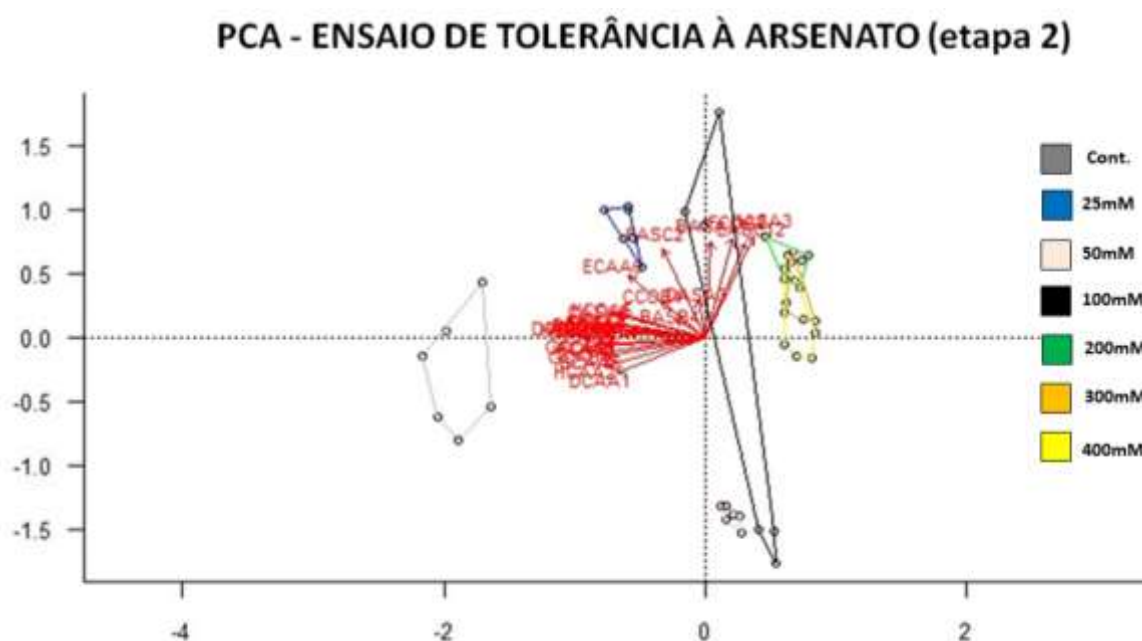


Figura 17: gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Arsenato (etapa 2). Cada polígono representa uma concentração diferente de Arsenato testada: controle (cinza), 25Mm (azul), 50 Mm (rosa), 100 mM (preto), 200 mM (verde), 300mM (laranja) 400mM (amarelo).). Quanto mais deslocado à esquerda estão os elementos gráficos (setas e polígonos) e maior o perímetro destes, mais heterogêneo foi o conjunto de dados analisados. Em vermelho, os isolados.

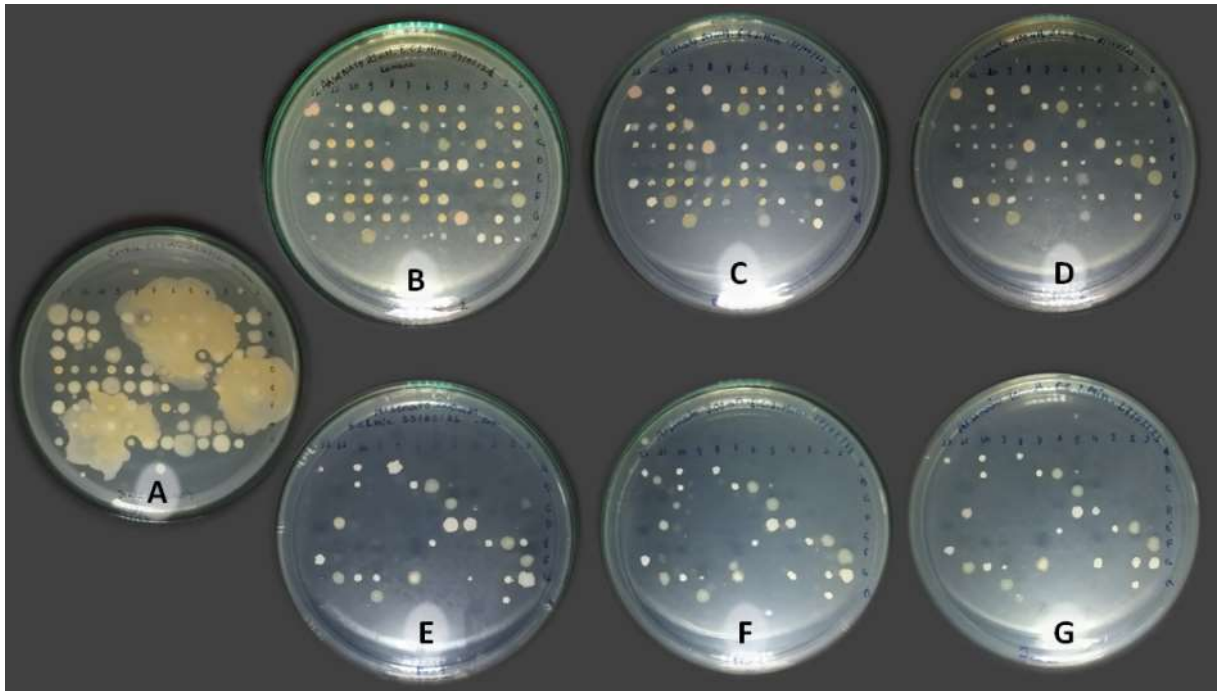


Figura 18: placas de petri com meio LB sólido acrescido de arsenato de sódio após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados. A = controle [0 mM de As^{5+}], B = [25 mM], C = [50 mM], D = [100 mM], E = [200 mM], F = [300 mM] e G = 400 mM. É interessante notar como o número e diâmetro das e colônias que cresceram nas maiores concentrações (200, 300 e 400 mM) variou pouco entre elas.

4.5.4. Ensaio de tolerância à Arsenito (etapa 2)

Através da análise PCA dos dados do ensaio de tolerância à arsenito (figura 19) é possível observar que os isolados testados tiveram seus diâmetros de crescimento mais ou menos constante quando comparamos o controle e as duas primeiras concentrações de arsenito testadas (4 mM e 5 mM), especialmente para um pequeno grupo (entre o segundo e primeiro quadrante inferior do gráfico). A partir da concentração de 7,5 mM de arsenito houve uma diferença significativa no diâmetro das colônias dos isolados que cresceram frente à essa concentração de arsenito. Esses resultados podem ser vistos também na figura 20.

PCA - ENSAIO DE TOLERÂNCIA À ARSENITO (etapa 2)

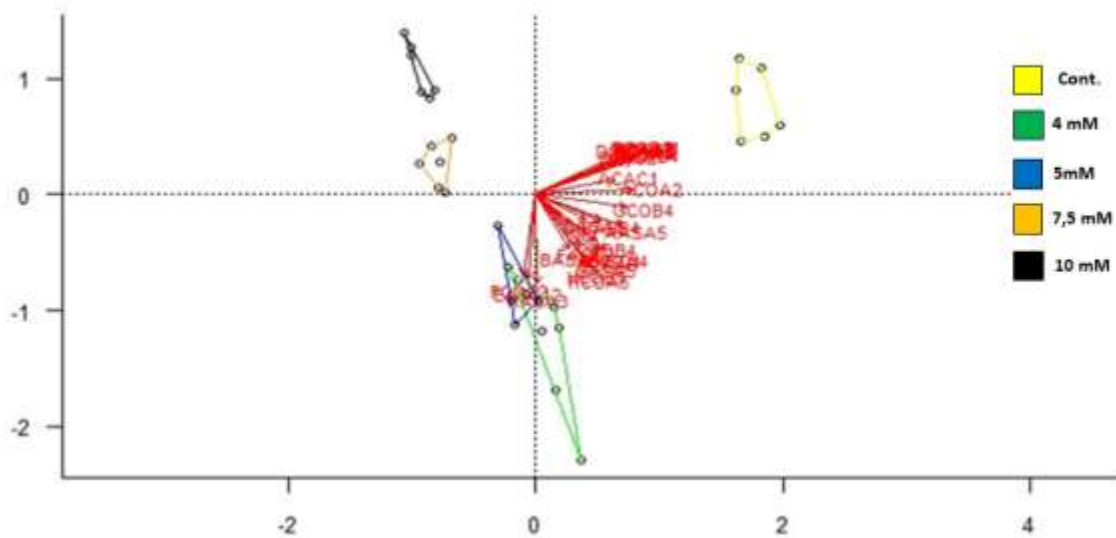


Figura 19: gráfico de análise de PCA (Análise de Componentes Principais) do ensaio de tolerância à Arsenito (etapa 2). Cada polígono representa uma concentração diferente de Arsenito testada: Controle (amarelo), 4 mM (verde), 5 mM (azul), 7,5 mM (laranja), 10 mM (preto). Quanto mais deslocado à esquerda estão os elementos gráficos (setas e polígonos) e maior o perímetro destes, mais heterogêneo foi o conjunto de dados analisados. Em vermelho, os isolados.

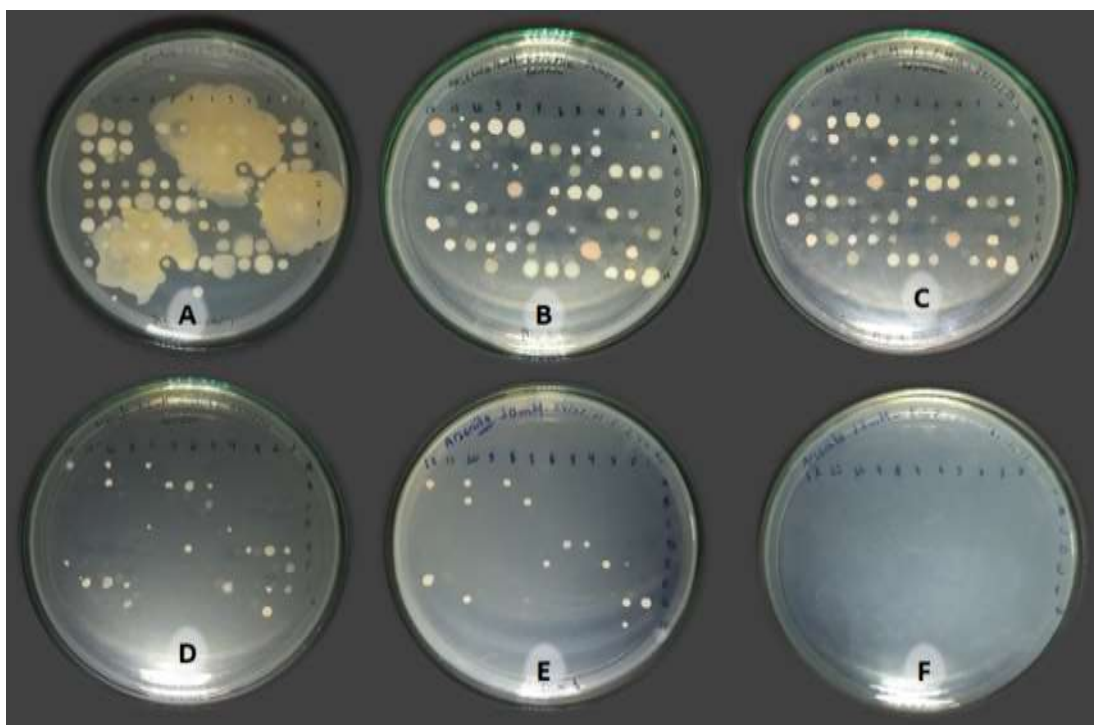


Figura 20: placas de petri com meio LB sólido acrescido de arsenito de sódio após 48h da inoculação dos 29 isolados selecionados. Concentrações acima de 5 mM de arsenito levou à uma diminuição significativa no número de colônias que crescem e no diâmetro. A = controle [0 mM de As^{3+}], B = [4 mM], C = [5 mM], D = [7,5 mM], E = [10 mM]. Na placa F [12 mM] não houve crescimento de nenhum isolado.

4.6. Ensaio de tolerância à Peróxido de Hidrogênio

Dos 29 isolados inicialmente selecionados para a realização dos ensaios de tolerância a metais e pH, 10 foram escolhidos para uma nova rodada de experimentos. O critério de escolha foi baseado nos níveis de tolerância ao arsênio, uma vez que não foram encontradas bactérias resistentes ao arsênio e os outros metais testados, como manganês e ferro, apesar de desejável. Inicialmente, investigamos a toxicidade de peróxido de hidrogênio, conhecido indutor de processos redox.

Os isolados foram tratados com doses que variaram entre 10 – 200 mM de H₂O₂ em PBS por 2h e em seguida plaqueados. O diâmetro das colônias foi calculado 24h após o término do tratamento e a média dos valores plotados no gráfico da figura 14. Pela análise dos resultados podemos observar que dos 10 isolados testados, 3 (115 ASA 3, 30 ASC 12, 3 ASB 4) são pouco tolerantes à exposição, seguido dos isolados 90 ASC 1 e 60 COC 2 que também apresentaram baixa resistência. Os demais isolados testados foram capazes de crescer em doses superiores a 100 mM de H₂O₂, destacando 15 ASA 3, 60 ASC 2 e 7 ASA 5 que foram capazes de crescer na maior concentração testada (200 mM).

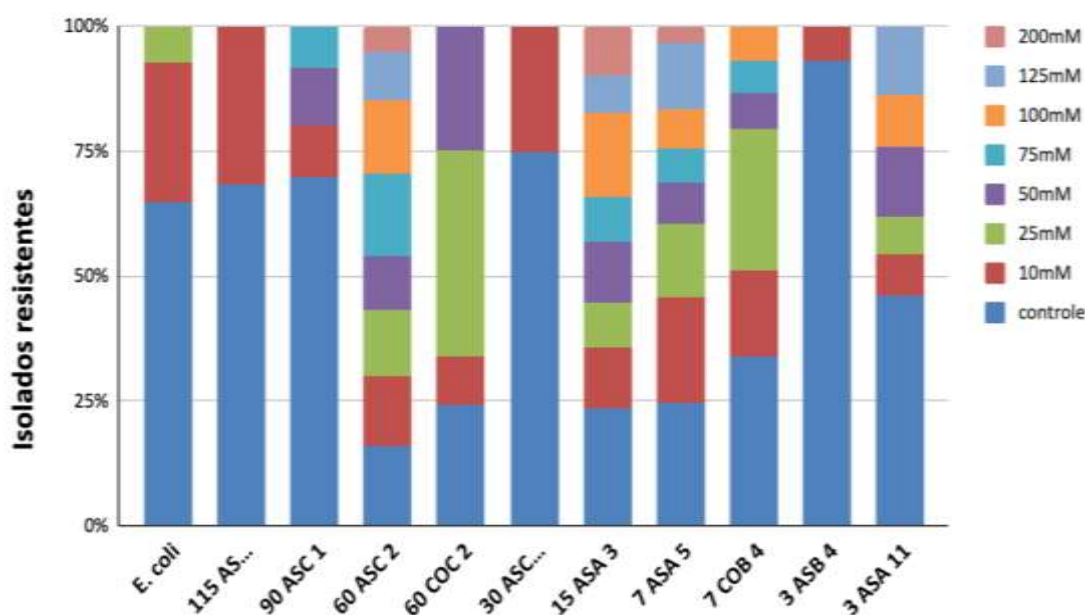


Figura 21: Exposição dos isolados selecionados (10) a peróxido de hidrogênio (10-200mM) por 2h. Destaque para os isolados 15 ASA 3, 60 ASC 2 e 7 ASA 5 que foram capazes de crescer na maior concentração testada.

4.7. Caracterização dos isolados mais tolerantes

4.7.1. Ensaio de produção de Biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado nos dez isolados mais resistentes selecionados a partir dos resultados apresentados nos itens 4.5.3 e 4.5.4. O gráfico da figura 22 demonstra que todos os isolados são capazes de produzir biofilme, no entanto os isolados AS 5 e AS 7 destacam-se por serem altamente produtores de biofilme.

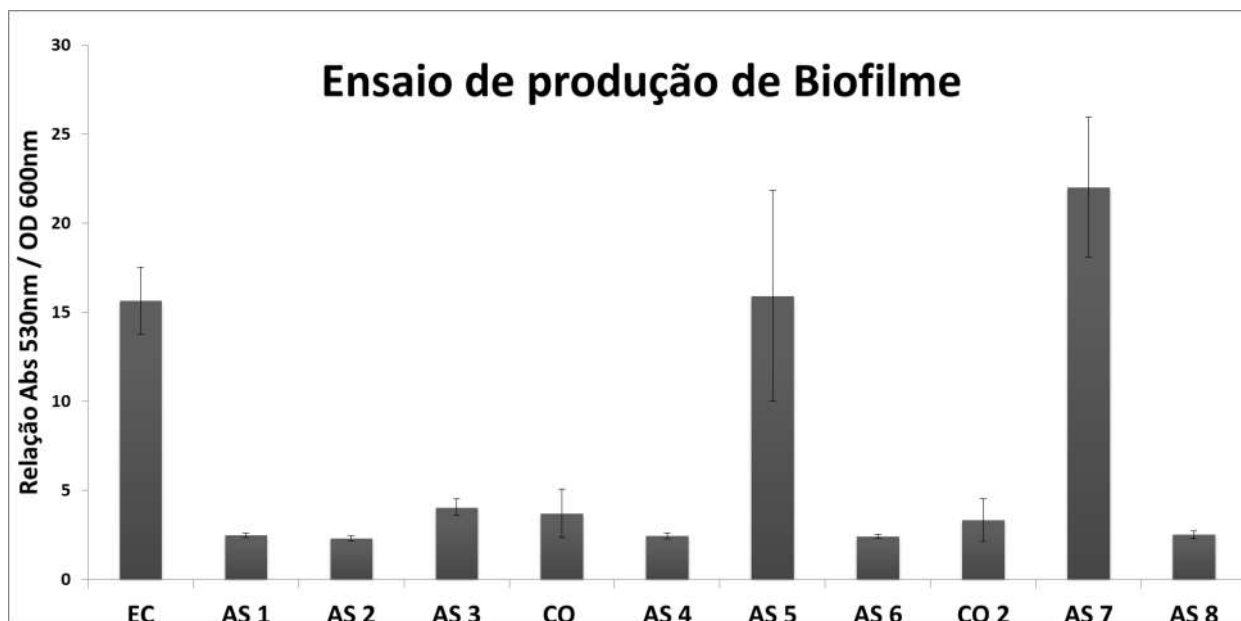


Figura 22: Produção de biofilme calculado a partir da relação entre a absorvância do cristal violeta em 530nm e a OD em 600 nm, padronizada para cada bactéria testada. EC representa a bactéria *E. coli* usada como controle do experimento. AS 1 = 115ASA3, AS 2 = 90 ASC 1, AS 3 = 60 ASC 2, CO = 60 COC 2, AS 4 = 30 ASC 12, AS 5 = 15 ASA 3, AS 6 = 7 ASA 5, CO 2 = 7 COB 4, AS 7 = 7 ASA 5, AS 8 = 3 ASA 11.

4.7.2. Curva de crescimento bacteriana

Os isolados também foram caracterizados em relação ao perfil de crescimento. Para isso, a OD inicial foi padronizada e absorvância medida após 0h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h de crescimento. Pela análise das curvas de crescimento plotadas na figura 23 podemos observar um crescimento exponencial até cerca de 30h para a maioria dos isolados, seguido de platô ou leve decaimento até o último ponto avaliado, após 72h de crescimento.

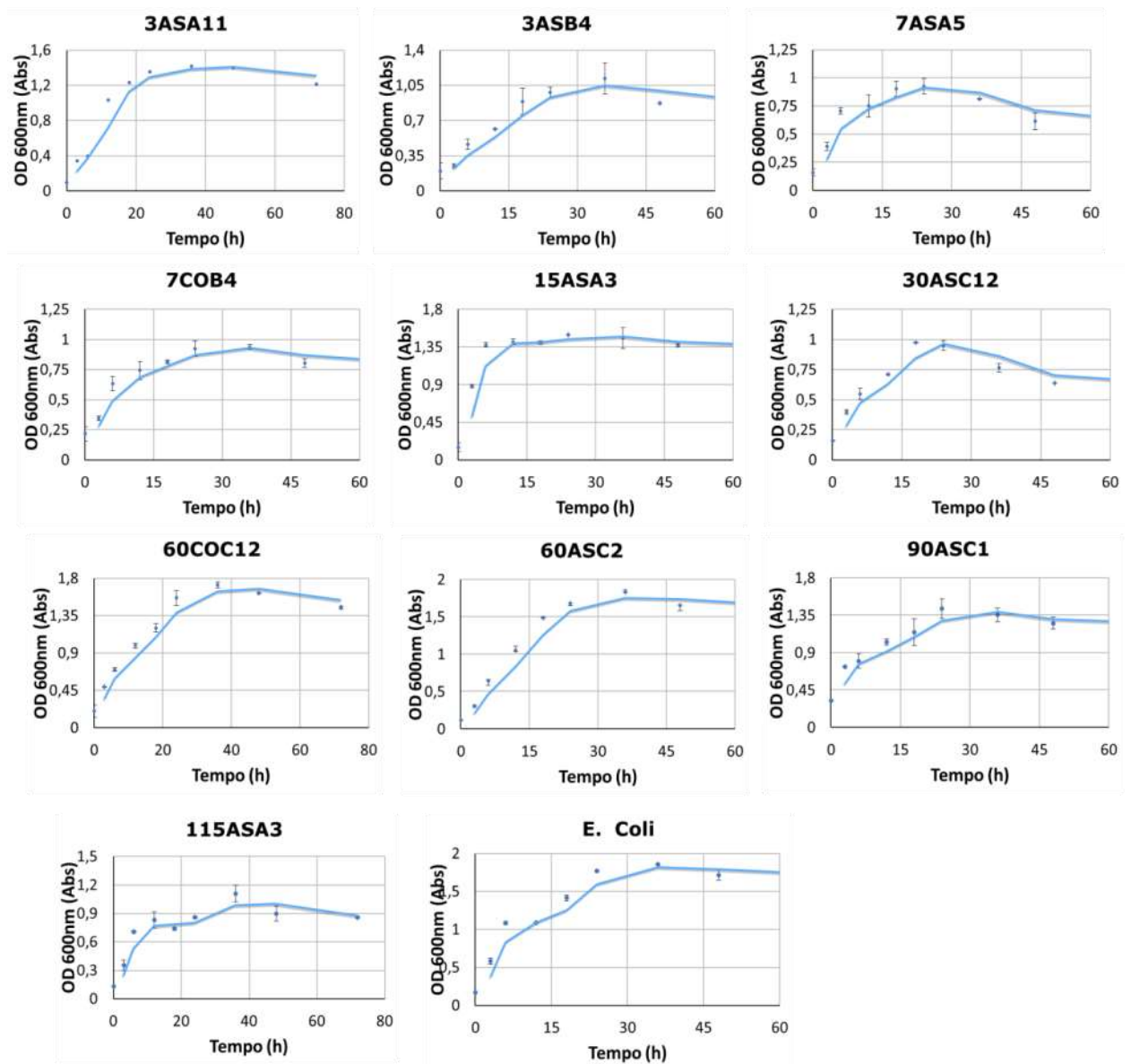


Figura 23: Curvas de crescimento dos isolados selecionados término das medidas em 72h. Valem destaque os isolados 115ASA3 e 15ASA3 que chegaram ao término da fase exponencial em menos de 15h de experimento.

4.7.3. Caracterização morfológica e de parede celular

Os isolados selecionados também foram caracterizados quanto à morfologia e características da parede celular através da coloração de Gram. A figura 24 apresenta as pranchas resultantes dos isolados testados. A tabela 6 decodifica o microrganismo que representa cada imagem e o resultado da análise das figuras. Pela análise da figura 24 podemos concluir, como mostrado na tabela 6, que a maioria dos isolados é Gram positivo e em forma de bacilo.

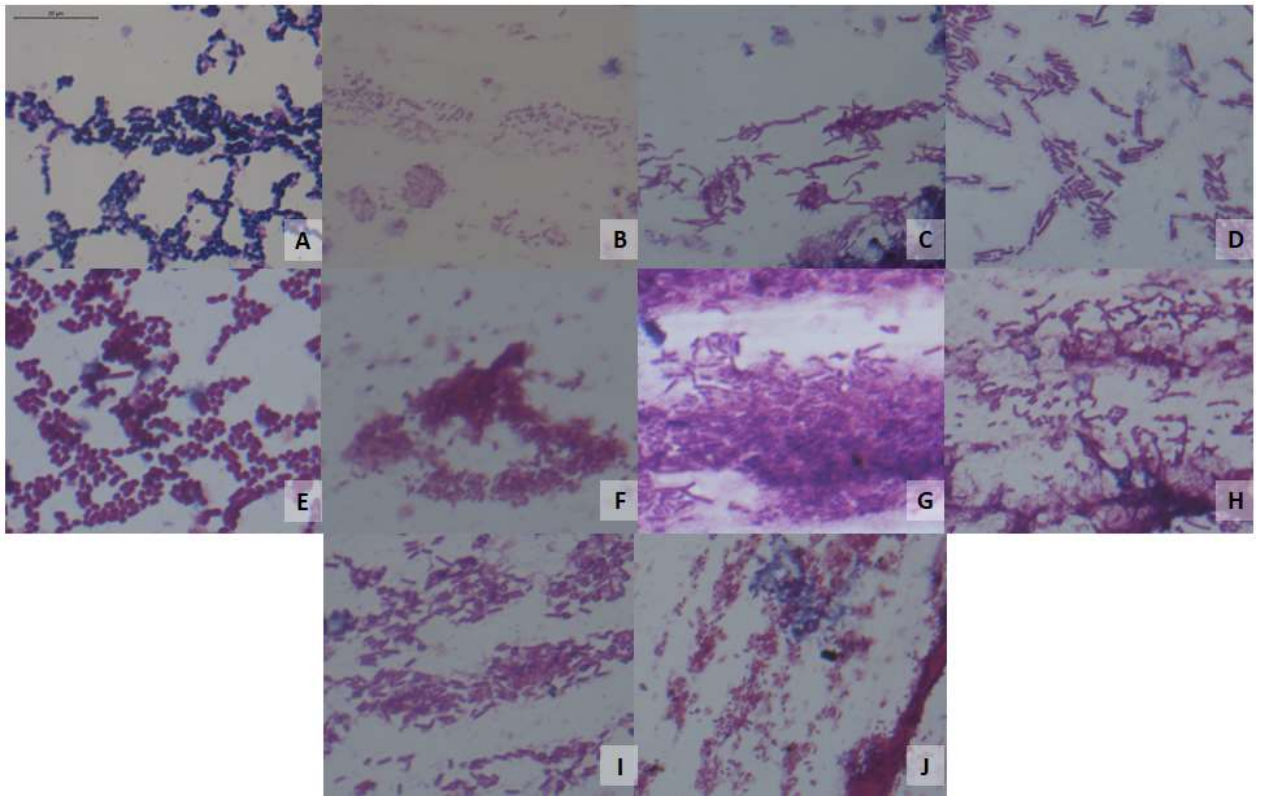


Figura 24: Imagens representativas da coloração de Gram de cada microrganismo analisado.

Tabela 6: Resultado da análise da caracterização morfológica e Gram dos 10 isolados selecionados e códigos.

	Número do Isolado	Classificação de Gram
A	3 ASA 11	Bacilo Gram positivo
B	3 ASB 4	Bacilo Gram negativo
C	7 COB 4	Espirilo Gram Positivo
D	7 ASA 5	Bacilo Gram Positivo
E	15 ASA 3	Coco bacilo Gram negativo
F	30 ASC 12	Cocos negativos
G	60 COC 2	Bacilo Gram positivo
H	60 ASC 2	Bacilo Gram positivo
I	90 ASC 1	Bacilo Gram positivo
J	115 ASA 3	Cocos Gram negativo

Por fim, os resultados obtidos para os 10 isolados mais tolerantes a arsenito e arsenato foram sumarizados na tabela 7. Nossos resultados apontam de maneira conjunta que os 10 isolados selecionados por apresentarem alta resistência ao arsenato, com apenas um dos isolados (90 ASC 1) não crescendo na maior concentração testada (400mM). Estes também são resistentes, em sua maioria ao arsenito. Dentre estes 10, nenhum foi capaz de crescer na maior concentração de manganês testada (70mM), porém 3 foram capazes de crescer na concentração inibitória mínima para o ferro (6mM), sendo eles 60 COC 2, 60 ASC 2 e 115 ASA 3. São bons produtores de biofilme, destacando os isolados 15 ASA 3 e 7 ASA 5. Metade deles pode ser considerada resistente ao peróxido de hidrogênio, e 3 deles (7 ASA 5, 60 ASC 2 e 7 ASA 5) foram capazes de tolerar a maior concentração testada. Além disso, estes 10 isolados são capazes de crescer numa ampla faixa de pH, sendo em média de 6-10, ou seja, podem ser considerados de neutrófilos à basófilos.

Tabela 7: resumo dos resultados dos 10 isolados selecionados para os principais experimentos.

		As ⁺⁵ 400mM	As ⁺³ 10mM	Mn 70mM	Fe 6mM	Produção de biofilme	Tolerância à H ₂ O ₂	Faixa de pH de crescimento
3 ASA 11	Bacilo Gram +	+	+	-	-	+	++	5 à 10
3 ASB 4	Bacilo Gram -	+	-	-	-	+++	-	5 à 10
7 ASA 5	Bacilo Gram +	+	+	-	-	+	+++	6 à 10
15 ASA 3	Cocobacilo Gram -	+	+	-	-	+++	+++	6 à 12
30 ASC 12	Cocos Gram -	+	+	-	-	+	-	7 à 12
60 ASC 2	Bacilo Gram +	+	+	-	+	+	+++	6 à 12
90 ASC 1	Espirilo Gram +	-	+	-	-	+	-	5 à 10
115 ASA 3	Bacilo Gram +	+	-	-	+	+	+	6 à 12
7 COB 4	Espirilo Gram +	+	+	-	-	+	+	6 à 10
60 COC 2	Bacilo Gram +	+	+	-	+	+	-	6 à 10

5. DISCUSSÃO

No Brasil e no mundo existem regiões habitadas, como o QF, naturalmente ricas em arsênio, um metaloide potencialmente tóxico para a saúde humana e ecossistema. Desastres envolvendo o rompimento de barragens de rejeito de minério, como as da barragem de Fundão, em Mariana (2015), da barragem da mina do Córrego do Feijão em Brumadinho (2019), ambos no QF em MG, e de outras barragens no país vêm expandindo as áreas em que as concentrações de As e metais pesados se tornam relevantes e urgentes para a saúde pública. Estes fatos aumentam a necessidade do

desenvolvimento de estratégias que visam diminuir a exposição de pessoas e outros organismos a quantidades significativas de espécies tóxicas, como as de arsênio.

Neste trabalho, foram obtidos 466 isolados dos 3 grupos experimentais estabelecidos. O solo controle foi o que apresentou maior número de isolados no total, seguido do solo contaminado por arsênio e solo de canga, respectivamente. Este último resultado pode não representar de fato a abundância de bactérias desta amostra de solo, uma vez que nos isolamentos à partir do dia 14 de isolamento, houve sempre crescimento de fungos na placa de pelo menos umas das diluições da diluição seriada (item 3.3) da amostra de canga, quase sempre das diluições 10^{-2} ou 10^{-3} . Isto apesar do meio de cultura ter sido acrescido de antifúngico Viper 700[®]. O fato de o solo controle ter prevalecido em número de isolados quando comparado ao solo contaminado por arsênio pode ser explicado pelo fato deste último ter um fator de estresse a mais, desafiando o crescimento das bactérias, a presença do arsenato de sódio.

O diâmetro das colônias de cada isolado foi usado como parâmetro de tolerância a diferentes substâncias nos ensaios aos quais estes foram submetidos. Essa escolha partiu do princípio que a exposição a metais pesados e outros elementos potencialmente tóxicos podem prejudicar processos metabólicos basais das bactérias. Quando o prejuízo a esses processos metabólicos é significativo isso leva a uma diminuição da biomassa bacteriana, culminando num menor diâmetro das colônias (JJEMBA, 2004^b). No entanto, se mecanismos de tolerância e resistência forem ativados, as bactérias conseguem superar os distúrbios e manter certa homeostase celular.

Nossos achados mostraram que mesmo pequenas concentrações de As^{5+} inorgânico no solo (55 $\mu\text{g}/\text{kg}$) parecem ser suficientes para induzir resposta bacteriana contra o arsênio. Numa avaliação geral do ensaio de tolerância à arsenato, mais da metade do total de isolados, levando em consideração solo de origem e dia de isolamento, cresceram em todas as concentrações testadas (10 mM, 13 mM e 15 mM) quando comparados aos isolados crescidos no controle experimental (meio LB). O diâmetro de crescimento das colônias foi claramente dose dependente, numa relação inversamente proporcional, onde, quanto maior a dose de arsenato testada, maior o diâmetro da colônia.

Já numa avaliação geral do ensaio de ensaio de tolerância à arsenito (As^{3+}), o grau de tolerância dos isolados foi bem menor quando comparado ao Meio LB e aos tratamentos com as diferentes doses de arsenato. Isso pode se dar pelo fato das formas trivalentes de arsênio serem até 60 vezes mais tóxicas que as pentavalentes (RATNAIKE, 2003). Apesar de menos isolados terem crescido/tolerado a exposição ao arsenito, também foi observada uma relação inversamente proporcional dose dependente dos diâmetros das colônias. Tanto no ensaio de larga escala de tolerância ao arsenato quanto ao arsenito, o dia 0 teve um menor número de isolados tolerantes quando comparado aos outros dias de isolamento. Como esses isolados foram obtidos minutos após a contaminação do solo por arsenato de sódio, foi descartada a possibilidade de mais isolados terem desenvolvido uma resposta frente ao novo distúrbio, sobrevivendo apenas aqueles isolados com mecanismos de tolerância intrínsecos mais eficientes (JJEMBA^b, 2004).

Quando avaliamos a relação do solo de origem com número de isolados tolerantes a arsênio, os isolados do solo controle corresponderam à cerca de 50% de todos os isolados que cresceram frente à todas as concentrações de As^{5+} (10, 13 e 15 mM) e As^{3+} testadas (1, 2 e 3 mM). Os isolados provindos do solo contaminado por arsênio representaram cerca 30 – 40% dos isolados tolerantes a todas as concentrações das duas espécies de As testadas. Apesar de este resultado parecer ir contra as expectativas de que o solo contaminado por arsênio apresentaria um maior número de isolados tolerantes, ambos os solos contribuíram igualmente para o número de isolados que tiveram crescimento acima da média (maior que 3mm).

É importante apontar que plasmídeos de resistência à metais e metaloides são amplamente disseminados entre populações de procariotos e que sistemas de resistência à metais foram encontrados em todos os grupos bacterianos já testados (SUMMERS, 1986; SILVER & PHUNG, 1996). Além disso, quando em baixas concentrações de um composto tóxico, o metabolismo intrínseco dos organismos, consegue transpor a toxicidade deste, não prejudicando o metabolismo basal ou a biomassa durante um pequeno tempo de exposição (GADD, 1992). Isso pode explicar porque os isolados do grupo controle também tiveram uma boa resposta de tolerância ao As.

Já o solo de canga, contribuiu com menos de 20% dos isolados tolerantes em todas as concentrações de As^{5+} e As^{3+} testadas no ensaio de larga escala. Este resultado é

bastante curioso, uma vez que o solo de canga é reconhecidamente rico em arsênio e metais pesados (CARMO & JACOBI, 2008; ABREU *et al.*, 2014). É provável que o As do solo usado neste estudo não esteja bioacessível para as bactérias ali presentes, não justificando a presença de genes de resistência naquela população. Outra possível explicação para este fenômeno é o fato de ter usado um meio de cultura rico, o meio LB para isolar bactérias de um solo pobre.

Bactérias ambientais vivem sempre num estado de abundância nutricional ou fome, seja por características do próprio ambiente e/ou competição (JJEMBA, 2004^d). O solo de canga, além de rico em arsênio e metais pesados, como já mencionado, também é pobre em nutrientes como fósforo (P), Magnésio (Mg) e Cálcio (Ca) (VINCENT & MEGURO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SILVA, 2013). Ao utilizar um meio de cultura rico para isolar bactérias de ambiente pobre, a abundância de nutrientes pode funcionar como uma pressão seletiva para os microrganismos menos competitivos. Assim, prevalece na fração cultivável apenas uma pequena quantidade de bactérias bastante competitivas e competentes no aproveitamento dos nutrientes (JJEMBA, 2004^d).

Os isolados com maior desempenho (crescimento maior que 3mm em ambos tratamentos) nos ensaios em larga escala de tolerância ao arsênio foram submetidos a novos testes. Mn e Fe são metais de grande importância econômica no QF, com concentrações de até 54 mg/dm³ de solo e 790 mg/dm³ já detectadas em solos do QF, respectivamente (MESSIAS *et al.*, 2013). As reservas minerais desses dois elementos estão intimamente relacionadas à minerais contendo arsênio (ROESER & ROESER, 2010).

Assim, a escolha de avaliar também a tolerância dos 29 isolados mais tolerantes à arsênio (no ensaio em larga escala) à esses dois elementos. No entanto, apenas um isolado (30 CAA 6) apresentou uma tolerância mediana a todos os metais e metalóides testados. Os isolados resistentes à arsenato e arsenito não foram resistentes à Ferro e Manganês e vice-versa. Apesar dos mecanismos de resistência à metais pesados e metalóides serem virtualmente os mesmos, a resistência a esses diferentes elementos depende da presença de operons/genes altamente específicos para cada metal (SUMMERS, 1986; SILVER & PHUNG, 1996).

Para aplicar uma bactéria em processos biotecnológicos, antes de inoculá-la em um determinado ambiente, fatores bióticos e abióticos do local e também o potencial metabólico das bactérias diante de várias modificações ambientais devem ser levados em conta (ALVAREZ *et al.*, 2017). Isto, a fim de permitir o crescimento destas e melhor aproveitamento do processo. Esses fatores abrangem a disponibilidade de nutrientes, Eh, pH, temperatura, entre outros. Cada microrganismo cresce melhor numa determinada faixa de pH, sendo a maioria dos isolados na faixa de pH ótima em torno de 6,5 – 7, neutrófilos (JJEMBA, 2004^b).

Em vista disso, os 29 isolados selecionados foram submetidos a crescimento em diferentes faixas de pH. Todos os isolados testados têm um crescimento bom entre 6 e 9, sendo 8 a faixa de pH ótima para a maioria, portanto considerados micro-organismos basófilos. Poucas bactérias prospectadas se encaixam nessa categoria (JJEMBA^b, 2004). Isso pode ser explicado por 2 eventos: 1) os isolados vieram de solo também com pH's de neutro à básicos; 2) o isolamento dessas bactérias sempre ocorreu em meio LB, que é um meio de cultura com pH neutro. Isso levou a uma seleção de isolados cuja faixa de pH de crescimento girasse em torno de valores próximos da origem do isolado e meio em que foi cultivado no momento do isolamento.

Os 29 isolados selecionados, também foram desafiados a crescer em concentrações ainda maiores de As^{5+} (25, 50, 100, 200, 300 e 400 mM) e de As^{3+} (4, 5, 7.5, 10, 12 e 15mM). No geral, os 29 isolados continuaram apresentando uma alta tolerância ao arsenato. 10 isolados ainda tiveram crescimento considerável quando submetidos até a concentração de 200 mM e 9 isolados até a concentração de 400 mM. Já, frente ao arsenito, os isolados foram mais sensíveis. 10mM foi a concentração inibitória de crescimento de As^{3+} . Apesar de terem o diâmetro da colônia significativamente menor quando comparado ao tratamento de 400 mM de As^{5+} , os isolados capazes de crescer em 10mM de As^{3+} foram os mesmos capazes de crescer na maior concentração de arsenato testada.

Esses 10 isolados mais tolerantes ao arsênio foram selecionados e submetidos a um ensaio de tolerância a peróxido de hidrogênio. Além disso, estes também foram caracterizados quanto ao perfil de crescimento (curva de crescimento bacteriana), produção de biofilme e classificados quanto à morfologia e características da parede

celular. O isolado 90 ASC 1 apesar de não ter crescido nas duas maiores concentrações de arsenato foi selecionado pois apresentou uma alta tolerância ao arsenito.

O ensaio de tolerância a peróxido de hidrogênio foi executado a fim de se ter uma pista de qual via de resistência poderia ser a responsável pela alta tolerância à arsênio apresentada pelos 10 isolados selecionados. Sabe-se que um dos mecanismos de toxicidade do arsênio é a geração de ERs (APOSHIAN; APOSHIAN, 2006). O peróxido de hidrogênio é uma importante ER e, quando presente na célula ativa a resposta antioxidante mediada por enzimas como Catalases e Glutathione peroxidase que a neutralizam (AUGUSTO, 2006) evitando assim, danos na célula. Os isolados tolerantes ao arsênio e que também cresceram em doses altas de H₂O₂ (7 ASA 5, 60 ASC 2 e 7 ASA 5) podem ter boa parte de sua tolerância ao As explicada pela ativação do sistema antioxidante frente as ER's geradas quando o metalóide adentra a célula.

Em continuação aos ensaios de caracterização, o método utilizado para medir a produção de biofilme avalia os estágios iniciais de formação deste, como a adesão mediada por fimbrias, cápsula, formação de pili, produção de adesinas e EPS (O'TOOLE, 2011). A *E. coli*, usada aqui como controle positivo no ensaio de produção de biofilme, produz fimbrias de alta adesão que ajudam a colonizar os ambientes com fluxo intenso como o sistema gastrointestinal (THOMAS *et al*, 2008). Todos os 10 isolados testados foram capazes de produzir biofilme, mas dois isolados se destacaram (15 ASA 3 e 7 ASA 5) pois ultrapassaram a produção de biofilme da própria *E. coli*.

Levando em conta que a produção de biofilme pode se dar após a exposição bacteriana a um distúrbio ambiental (SINGH *et al.*, 2018), o arsênio pode atuar como um fator de estímulo à produção de biofilme. Além disso, já se sabe que biofilmes bacterianos são capazes de adsorver metais pesados em sua matriz (HUANG *et al.*, 2000; LABRENZ *et al.*, 2000). A produção de fortes biofilmes associada à remoção de arsenito e arsenato abre um leque de aplicações dessas cepas em ambientes onde há fluxo, como no tratamento de água para consumo humano e em solos alagados ou constantemente irrigados.

Quanto à morfologia dos isolados, dentre os 10, seis são bacilos e 3 cocos e 1 um possível espirilo (7 COB 4). A morfologia "Bacilo" corresponde ao formato de grande parte das bactérias conhecidas. 6 isolados foram classificados como Gram

positivos e 4 como Gram negativos. Geralmente bactérias Gram negativas são mais tolerantes a metais que as Gram positiva devido à maior complexidade de sua parede celular, o que permite imobilizar metais com mais eficiência (JJEMBA, 2004^b). No entanto, ainda não é possível verificar se esta afirmativa é verdadeira dentre estes isolados considerando somente os experimentos já realizados.

Conhecer o perfil de crescimento, plotando a curva de crescimento de seus isolados fornece dados essenciais principalmente para o delineamento experimental de novos ensaios. Conhecer esses dados facilita planejar o tempo de incubação necessário para se comparar os resultados obtidos por cada isolado nos experimentos. Também é possível avaliar se e o quanto substâncias potencialmente tóxicas afetam o perfil de crescimento bacteriano. Por fim, os 10 isolados selecionados ao final mostraram resultados promissores tanto quanto à caracterização quanto ao grau de tolerância destes frente ao arsênio.

6. CONCLUSÃO

Nossos achados mostraram que mesmo pequenas concentrações de As^{5+} inorgânico no solo (55 $\mu\text{g}/\text{kg}$) parecem ser suficientes para induzir resposta bacteriana contra o arsênio. De todos os isolados obtidos (466), pelo menos cerca de 64% mostraram alguma tolerância às menores doses As^{5+} (10mM) ou As^{3+} (1mM) testadas. Além disso, o crescimento das colônias foi claramente dose dependente, numa relação inversamente proporcional, aonde, quanto maior a dose de arsênio testada, menor o diâmetro da colônia.

Por fim, do total prospectado, foram selecionados 10 isolados (3 ASA 11, 3 ASB 4, 7 COB 4, 7 ASA 5, 15 ASA 3, 30 ASC 12, 60 COC 2, 60 ASC 2, 90 ASC 1 e 115 ASA3) com características que abrem perspectivas de aplicações biotecnológicas bastante úteis e de interesse econômico e social, como a biorremediação. Características como alta tolerância à arsenato e arsenito, boa produção de biofilme, tolerância à ERs e crescimento numa ampla faixa de pH são muito desejáveis para este fim.

O fato de algumas bactérias apresentarem todas essas características juntas (à destaque, o isolado 15 ASA 3), aumentam consideravelmente as chances de sucesso de biorremediação se estas forem aplicadas em campo visando a detoxificação de arsênio. Dessa forma, áreas hoje consideradas não seguras para a saúde pelas concentrações de arsênio seja na água ou solo poderiam ser utilizadas para diversos fins.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.A., SIVA, R.O., CANTONI, M., COELHO, R.M. Natural contents of arsenic in soils of the state of São Paulo, Brazil. In: Bundschuh, J., Bhattacharya, P. (Eds.), *Arsenic in the Environment - One Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914–2014)*. Taylor & Francis, London, pp. 258–259. 2014.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, ATSDR's Substance Priority List (2019) (online at www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl).

AHMAD, MANZURUL SK AKHTAR HAQUE, K. M. H. Arsenic contamination in groundwater in bangladesh: Implications and challenges for healthcare policy. *Quimica Nova*, v. 11, n. 1, p. 10–11, 1 mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1529552>>. Acesso em: 28 mar. 2021.

ANTONIO J. SIGNES-PASTOR et al., Inorganic Arsenic Exposure and Neuropsychological Development of Children of 4-5 Years of Age Living in Spain (Apr. 29, 2019) (online at www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6541502/).

ANVISA. Nota técnica nº 8: Avaliação de Risco: Consumo de pescado proveniente de regiões afetadas pelo rompimento da Barragem do Fundão/MG. SEI/ANVISA. Processo nº 25351.918291/2019-53. 2019.

APOSHIAN, H. V.; APOSHIAN, M. M. Reviews Arsenic Toxicology: Five Questions. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

AUGUSTO, J. *et al.* Arsenic in the groundwater of Ouro Preto (Brazil): its temporal behavior as influenced by the hydric regime and hydrogeology. [S.d.].

BARBOSA, A. P. Alterações fisiológicas causadas pelo arsênio, genotoxicidade e importância do mecanismo mismatch repair no reparo do dna em arabidopsis thaliana. p. 1–76, 2003. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9924/texto_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 fev. 2018.

BIANCHI, M.E. *et al.* Mutants resistant to manganese in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 4:215-220. 1981

BHATTACHARYA P, FRISBIE SH, SMITH E, NAIDU R, JACKS G, SARKAR B. Arsenic in the environment: a global perspective. In *Handbook of Heavy Metals in the Environment*, ed. B Sarkar, pp. 147–215. New York: Marcell Dekker Inc. 2002.

BHATTACHARYA P, WELCH AH, STOLLENWERK KG, MCLAUGHLIN MJ, BUNDSCHUH J & PANAUULLAH G. Arsenic in the environment: biology and chemistry. *Sci. Total Environ.* 379 (2–3): 109–20. 2007.

BRUINS, M.R. *et al.* 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 45: 198-207.

CANESCHI, W. L. *et al.* Brazilian Ironstone Plant Communities as Reservoirs of Culturable Bacteria With Diverse Biotechnological Potential. *Frontiers in microbiology*,

v. 9, p. 1638, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30083146>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

CHEN, J.H. *et al.* Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Res.* 29:421-430. 1995.

CHEN, Y.; PARVEZ, F.; GAMBLE, M.; ISLAM, T.; AHMED, A.; ARGOS, M.; AHSAN, H. Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 239, n. 2, p. 184-192, 2009.

CHEN, Q. Y. & COSTA, M. Arsenic: a global environmental challenge. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 61:47–63. 2021.

CHIU, HUI-FEN; HO, SHU-CHEN; YANG, CHUN-YUH. Lung cancer mortality reduction after installation of tap water supply system in an arseniasis-endemic area in Southwestern Taiwan. *Lung Cancer*, v. 46, n. 3, p. 265-270, 2004.

COBO, M.; CASTIREIRA, M. Oxidative Stress, Mitochondrial Respiration, and Glycemic Control: Clues from Chronic Supplementation with Cr³⁺ or As³⁺ to Male Wistar Rats. *Nutrition*. [S.l.]: Elsevier Science Inc, 1997.

COOK, W.J. *et al.* 1998. Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor smtB: a model for metalloregulatory proteins. *J. Molec. Biol.* 275: 337-346.

CUTTER, G. A.; CUTTER, L. S. Biogeochemistry of arsenic and antimony in the North Pacific Ocean. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, v. 7, n. 5, 2006.

DA SILVA, C. A. *et al.* Metal and metalloid concentrations in marine fish marketed in Salvador, BA, northeastern Brazil, and associated human health risks. *Regional Studies in Marine Science*, v. 43, p. 101716, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101716>>.

DESCHAMPS, E. *et al.* Soil and sediment geochemistry of the iron quadrangle, Brazil: The case of Arsenic. *Journal of Soils and Sediments*, v. 2, n. 4, p. 216–222, 2002.

DO CARMO, F. F.; JACOBI, C. M. Diversity and plant trait-soil relationships among rock outcrops in the Brazilian Atlantic rainforest. *Plant and Soil*, v. 403, n. 1–2, p. 7–20, 25 jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-015-2735-7>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

DOMBROWSKI PM, LONG W, FARLEY KJ, MAHONY JD, CAPITANI JF, DI TORO DM (2005) Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environ Sci Technol* 39:2169–2176. doi:10.1021/es0489691

FDA. Staff report: Baby Foods Are Tainted with Dangerous Levels of Arsenic, Lead, Cadmium, and Mercury. *Subcommittee on Economic and Consumer Policy Committee on Oversight and Reform U.S. House of Representatives*. February 4, 2021. oversight.house.gov

FEAM. Inventário de áreas contaminadas Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: Feam, 35 P.: II. 2019.

FELESTRINO, É. B. et al. Biotechnological potential of plant growth-promoting bacteria from the roots and rhizospheres of endemic plants in ironstone vegetation in southeastern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 10, p. 156, 4 out. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11274-018-2538-0>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

GADD, G.M. 1992. Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 197-203.

GIULIETTI AM, PIRANI JR, HARLEY RM. 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.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, v. 2012, p. 1–15, 11 out. 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

GROVER, M. *et al.* Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 5, p. 1231–1240, 5 maio 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11274-010-0572-7>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

HONG, YOUNG-SEOUB; SONG, KI-HOON; CHUNG, JIN-YONG. Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of preventive medicine and public health*, v. 47, n. 5, p. 245, 2014.

HU, Y.; LI, J.; LOU, B.; WU, R.; WANG, G.; LU, C.; XU, Y. The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 240, 2020.

HUANG, Y.B., WANG, W.H., PENG, A. (2000): Accumulation of Cu (II) and Pb (II) by biofilms grown on particulate in aquatic systems. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 35: 575–592.

IARC, Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres, and dusts, in: *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, France, 2009.

IARC. A review of human carcinogens. C. Metals, arsenic, dusts and fibres. Lyon, vol (IARC Monographs 100). International Agency for Research on Cancer, 2012.

IBRAM. Relatório anual de atividades. Instituto Brasileiro de Mineração, 2018.

JACOBI CM; CARMO FF; VINCENT RC; STEHMANN JR. Plant communities on ironstone outcrops: A diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodivers. Conserv.* 2007

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; VINCENT, R. D. C. Phytosociological study of a plant community on ironstone as support for recovery of a mined area in the iron quadrangle, MG. *Revista Arvore*, v. 32, n. 2, p. 345–353, 2008.

JJEMBA^a, Patrick K. Mechanisms of adaptation by Microorganisms to Environmental Extremes. JJEMBA, Patrick K. *Environmental Microbiology*. Enfield, NH: Science Publishers, 2004. p 119-150.

JJEMBA^b, Patrick K. Interaction Metals and Metalloids with Microorganisms in the Environment. JJEMBA, Patrick K. *Environmental Microbiology*. Enfield, NH: Science Publishers, 2004. p 257-284.

JJEMBA^c, Patrick K. Microbial Interaction with Organic Pollutants. JJEMBA, Patrick K. *Environmental Microbiology*. Enfield, NH: Science Publishers, 2004. p 206-236.

JJEMBA^d, Patrick K. Prokariotes. JJEMBA, Patrick K. *Environmental Microbiology*. Enfield, NH: Science Publishers, 2004. P. 16-31.

KEIM, C. N. Arsenic in Biogenic Iron Minerals from a Contaminated Environment. *Geomicrobiology Journal*, v. 28, n. 3, p. 242–251, 21 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2010.493571>>.

KRAUTLER B (1990) Chemistry of methylcorrinoids related to their roles in bacterial C1 metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 7:349–354

LABRENZ, M. *et al.* Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Science* 290: 1744–1747. 2000

LIN YF, YANG J, ROSEN BP. ArsD: an As(III) metallo- chaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 39:453–458. 2007. doi:10.1007/s10863-007- 9113-y

MALLICK, I., BHATTACHARYYA, C., MUKHERJI, S., DEY, D., SARKAR, S. C., MUKHOPADHYAY, U. K., *et al.* Effective rhizoinoculation and biofilmformation by arsenic immobilizing halophilic plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from mangrove rhizosphere: a step towards arsenic rhizoremediation. *Sci. Total Environ.* 610–611, 1239–1250. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.234. 2018.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: A review. *Talanta*, v. 58, n. 1, p. 201–235, 2002.

MASSCHELEYN R., DELAUNE R. D.R. & PATRICK, W. H. J. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil RN - *Environ. Sci. Technol.*, vol. 25, pp. 1414-1419. *Environmental Science Technology*, v. 25, n. 8, p. 1414–1419, 1991. Disponível em: <<http://environmentalgeochemistry.pbworks.com/w/file/52731741/AsSpeciationEffectEhpHContaminatedSeds.pdf>>.

MATSCHULLAT, J. *et al.* Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Applied Geochemistry*, v. 15, n. 2, p. 181–190, 2000.

MAZUMDER, DEBENDRA N. GUHA; HAQUE, REINA; GHOSH, NILMA; DE, BINAY K; SANTRA, AMAL; CHAKRABORTI, DIPANKAR; SMITH, ALLAN H.

Arsenic in drinking water and the prevalence of respiratory effects in West Bengal, India. *Jornal internacional de epidemiologia*, v. 29, n. 6, pág. 1047-1052, 2000.

MAZUMDER, DN GUHA; SANTRA, AMAL; GUPTA, J. DAS; DE, BINAY K; ROY, B. Chronic arsenic toxicity: Epidemiology, natural history and treatment. In: *Arsenic Exposure and Health Effects III*. Elsevier Science Ltd, 1999. p. 335-347.

MESSIAS, M. C. T. B., LEITE, M. G. P., MEIRA NETO, J. A. A., KOZOVITS, A. R., & TAVARES, R.. Soil-Vegetation Relationship in Quartzitic and Ferruginous Brazilian Rocky Outcrops. *Folia Geobotanica*, 48(4), 509–521. 2013 doi:10.1007/s12224-013-9154-4

MIGUEL RODRÍGUEZ-BARRANCO *et al.*, Association of Arsenic, Cadmium and Manganese Exposure with Neurodevelopment and Behavioural Disorders in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis (June 1, 2013) (online at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23570911/>)

MILLER, W. H. et al. Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide 1. p. 3893–3903, 2002.

MONDAL, D. et al. Arsenic exposure from food exceeds that from drinking water in endemic area of Bihar, India. *Science of the Total Environment*, v. 754, p. 142082, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142082>>.

NICOLLI HB, BUNDSCHUH J, BLANCO MDC, TUJCHNEIDER OC, PANARELLO HO, *et al.* Arsenic and associated trace-elements in groundwater from the Chaco-Pampean plain, Argentina: results from 100 years of research. *Sci. Total Environ.* 429:36–56. 2012.

NG, J.C., JUHASZ, A., SMITH, E., NAIDU, R. Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8802–8825. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1820-9>.

NG, J. C. et al. Health risk apportionment of arsenic from multiple exposure pathways in Paracatu, a gold mining town in Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 673, p. 36–43, 10 jul. 2019.

NORDSTROM DK (2002) Worldwide occurrences of arsenic in groundwater. *Science* 296:2143–2145. doi:10.1126/science. 1072375

NRC (National Research Council). *Arsenic in Drinking Water – 2001 Update*. Washington, D.C. National Academy Press, 2001.

O'SHEA, B.; JANKOWSKI, J.; SAMMUT, J. The source of naturally occurring arsenic in a coastal sand aquifer of eastern Australia. *Science of The Total Environment*, v. 379, n. 2–3, p. 151–166, jul. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969706007704>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

OLIVEIRA, S. H. F., NEGREIROS, D., FERNANDES, G. W., BRABOSA, N. P. U., ROCHA, R., E ALMEIDA-CORTEZ, J. C. Seedling growth of the invader *Calotropis procera* in ironstone rupestrian field and seasonally dry forest soils. *Neotrop. Biol. Conserv.* 4, 69–76. 2009. doi: 10.4013/nbc.2009.42.01

OREMLAND, R. S.; STOLZ, J. F. The ecology of arsenic. *Science* (New York, N.Y.), v. 300, n. 5621, p. 939–44, 9 maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738852>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

O'TOOLE G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 47. 2011. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi: 10.3791/2437.

PÁEZ-ESPINO, D. *et al.* Microbial responses to environmental arsenic. fev. 2009, [S.l.]: Biometals, fev. 2009. p. 117–130. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19130261/>>. Acesso em: 17 jul. 2020.

PARENTE, C. E. T. *et al.* First year after the Brumadinho tailings' dam collapse: Spatial and seasonal variation of trace elements in sediments, fishes and macrophytes from the Paraopeba River, Brazil. *Environmental Research*, v. 193, p. 110526, 1 fev. 2021.

PEROBELLI, R; BORBA, B. & FIGUEIREDO, R. A influência das condições geoquímicas na oxidação da arsenopirita e na mobilidade do arsênio em ambientes superficiais tropicais. *Revista Brasileira de Geociências*, v. 34, n. 4, p. 489–500. 2004.

PUNSHON, T., JACKSON, B.P., MEHARG, A.A., WARCZACK, T., SCHECKEL, K., LOU, M., 2017. Understanding arsenic dynamics in agronomic systems to predict and prevent uptake by crop plants. *Sci. Total Environ.* 581e582, 209e220. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.111>

RAHMAN MM, CHOWDHURY UK, MUKHERJEE SC, MONDAL BK, PAUL K, LODH D, BISWAS BK, CHANDA CR, BASU GK, SAHA KC, ROY S, DAS R, PALIT SK, QUAMRUZZAMAN Q, CHAKRABORTI D. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India--a review and commentary. *J Toxicol Clin Toxicol.*;39(7):683-700. 2001. doi: 10.1081/clt-100108509. PMID: 11778666.

RAHMAN, M. A.; HASSLER, C. Is arsenic biotransformation a detoxification mechanism for microorganisms? *Aquatic Toxicology*, v. 146, p. 212–219, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.009>>.

RATNAIKE, R. N. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J*, v. 79, p. 391–396, 2003.

RENELLA, G. , Microbial and hydrolase activity after release of low molecular weight organic compounds by a model root surface in a clayey and a sandy soil. *Applied Soil Ecology*, v. 36, n. 2–3, p. 124–129, jun. 2007.

ROESER, MATTHIAS PETER, H.; ROESER, ANGELIKA P. O Quadrilátero Ferrífero-MG, Brasil: Aspectos Sobre Sua História, Seus Recursos Minerais E Problemas Ambientais Relacionados. *Geonomos*, v. 18, n. 1, p. 33–37. 2010.

ROSEN P. Theoretical significance of arsenic as a carcinogen. *J Theor Biol* 32:425–426. doi:10.1016/0022-5193(71)90178-0. 1971.

ROUCH, D.A. *et al.* Understanding cellular responses to toxic agentes: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J. Indus. Microbiol.* 14: 132- 141. 1995.

SAUGE-MERLE S, CUINE S, CARRIER P, LECOMTE-PRADINES C, LUU DT, PELTIER G. Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells

- expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Appl Environ Microbiol* 69:490–494. 2003.
- SCHOOLMEESTER WL, WHITE DR. Arsenic poisoning. *South Med J*. Feb;73(2):198-208. 1980. doi: 10.1097/00007611-198002000-00021. PMID: 7355321.
- SCOTT, J.A. *et al.* 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:221-225.
- SILVA, W. Gradiente Vegetacional e Pedológico em Complexo Rupestre de Quartzito no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 79. 2013.
- SILVEIRA, F. A. O. *et al.* Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, v. 403, n. 1–2, p. 129–152, 18 jun. 2016.
- SILVER S, PHUNG LT. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol* 50:753–789. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.753. 1996
- SILVER, S. & PHUG, L.T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann. Ver. Microbiol.* 50: 753-789.
- SINGH, V. K. *et al.* Interaction of plant growth promoting bacteria with tomato under abiotic stress: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 267, p. 129–140, 15 nov. 2018.
- SOUZA, J. M. O. *et al.* Arsenic and Rice: Toxicity, Metabolism, and Food Safety. *Química Nova*, v. 38, n. 1, p. 118–127, 2014.
- STUPPERICH E. Recent advances in elucidation of biological corrinoid functions. *FEMS Microbiol Rev* 12:349– 365. 1993. doi:10.1111/j.1574-6976.1993.tb00027.x
- SUMMERS, A.O. & SILVER, S. 1978. Microbial transformation of metals. *Ann. Ver. Microbiol.* 32: 637-672.
- TEIXEIRA, M. C. V. T. S. C. Development of a Biosorbent for Arsenite : Structural Modeling Based on X-ray Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol*, v. 39, n. 3, p. 895–900, 2005.
- TEIXEIRA, M. C. *et al.* Arsenic contamination assessment in Brazil – Past, present and future concerns: A historical and critical review. *Science of the Total Environment*, v. 730, 2020.
- THOMAS WE, NILSSON LM, FORERO M, SOKURENKO EV, VOGEL V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2004; 53:1545–1557.
- UPADHYAY, M. K. *et al.* Utilizing the potential of microorganisms for managing arsenic contamination: A feasible and sustainable approach. *Frontiers in Environmental Science*, v. 6, n. MAY, p. 1–11, 2018.

USEPA. National Primary Drinking Water Regulations, Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. Federal Register, v. 65, n. 121, June 22, p.38888-38983, 2000.

VERMA, S.; KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. Environmental Technology and Innovation, v. 14, p. 100369, 2019. doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369.

VINCENT, R. C., AND MEGURO, M. Plant soil relationships in ferruginous rocky soil vegetation. Revista Brazil. Bot. 31, 377–388. 2008.

VORMITTAG, EVANGELINA. Relatório: Resultado Exames Toxicológicos Município de Barra Longa - MG. Instituto Saúde e Sustentabilidade. 2018.

WHO. ARSENIC IN DRINKING WATER. 2001b. Fact Sheet No 210, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.html>.


XIA, Q. *et al.* Interaction effects of As, Cd and Pb on their respective bioaccessibility with time in co-contaminated soils assessed by the Unified BARGE Method. Environmental Science and Pollution Research, v. 24, n. 6, p. 5585–5594, 2017.

XU C, ZHOU T, KURODA M, ROSEN BP (1998) Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. J Biochem (Tokyo) 123:16–23

XU, Y. *et al.* Microbial functional diversity and carbon use feedback in soils as affected by heavy metals. Environment International, v. 125, p. 478–488, 1 abr. 2019.

8. ANEXOS

8.1. SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A1635BB

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A1635BB
Usuário:	UFOP
CPF/CNPJ:	23.070.659/0001-10
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Impossibilidade de Identificação


Titulo da Atividade: **Efeito da contaminação por arsênio sobre a diversidade bacteriana de solo**

Equipe

Camila Carrião Machado Garcia	UFOP
Leandro Marcio Moreira	UFOP
Lorrana Cachulle Mendes Rocha	UFOP

Data do Cadastro:	15/09/2020 16:03:22
Situação do Cadastro:	Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:43 de 01/03/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN