UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METAGENOMAS E ISOLADOS BACTERIANOS VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO.

Erica Mendes Lopes

Bióloga

JABOTICABAL –SÃO PAULO-BRASIL

Janeiro de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METAGENOMAS E ISOLADOS BACTERIANOS VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO.

Erica Mendes Lopes

Orientadora: Profª. Drª. Eliana G. de Macedo Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em **Microbiologia Agropecuária.**

JABOTICABAL –SÃO PAULO-BRASIL

Janeiro de 2016

Lopes, Erica Mendes
L864i Identificação e caracterização de metagenomas e isolados bacterianos visando a biorremediação de dolos de áreas de mineração / Erica Mendes Lopes. – – Jaboticabal, 2016
xii, 97 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Eliana G. de Macedo Lemos
Coorientador: Jackson A. Marcondes de Souza
Banca examinadora: Tsai Siu Mui, Hugo Miguel Preto de Morais Sarmento, Janete Ap. Desiderio, Tereza Cristina Luque Castelane.
Bibliografia

1. Biorremediação . 2. Biorremoção. 3. Genes de resistência . I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METAGENOMAS E ISOLADOS BACTERIANOS VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO

AUTORA: ÉRICA MENDES LOPES

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

COORIENTADOR: JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. TSAI SIU MUI
Centro de Energia Nuclear Na Agricultura / Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Prof. Dr. HUGO MIGUEL PRETO DE MORAIS SARMENTO
Universidade Federal de São Carlos / São Carlos/SP

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE
Pós-Doutoranda / Depto. de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de janeiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Erica Mendes Lopes - nascida na cidade de Jaboticabal (SP), em 10 de agosto de 1988. Graduou-se em Ciências Habilitação Plena em Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá, em Ribeirão Preto (SP), no ano de 2009. Estagiou no Laboratório de Bioquímica e Microrganismos de Plantas da FCAV/UNESP Câmpus Jaboticabal (Departamento de Tecnologia) de fevereiro de 2007 à dezembro de 2009. Em 2012, concluiu o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Durante esse período publicou artigos em revistas científicas e participou de eventos apresentando trabalhos na área de Microbiologia e Fixação Biológica do Nitrogênio. Ingressou no ano de 2012 o curso de Doutorado em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. Desenvolveu sua tese junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP/FCAV, atuando na área de Biotecnologia aplicada à utilização de ferramentas moleculares e microrganismos para identificação de comunidade microbiana de diferentes ecossistemas de regiões de mineração e uma possível aplicação na recuperação de áreas contaminadas por metais pesados.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível"

São Francisco de Assis

MEUS PAIS

Manoel e Neuci- Por terem me dado o meu maior dom a "vida" e por preencherem ela de alegrias e sonhos. Muito obrigado por sonharem por mim e comigo saibam que este trabalho é a concretização de um sonho de uma família e uma vida. Pai e Mãe jamais esquecerei todas as lições conselhos e alegrias. Agradeço por tudo que sempre fizeram para que meus sonhos se realizassem, agradeço ainda por todas as bençõe que Deus nos concedeu e a maior delas vocês. Mãe que você continue sendo essa mulher sábia e companheira e continue nos motivando sempre com seu otimismo, positividade e fé. Pai que continue este homem forte, lutador e protetor que Deus te abençoe sempre com muita saúde para que continue perpetuando seus ensinamentos de homem sábio que és. Continuem sempre sendo meu exemplo de moral, honestidade e profissionalismo.

MEUS AVÓS

Nivaldo e Lourdes - Agradeço a vocês meus velhinhos por sempre terem dispensado um pouquinho de seu tempo para participarem da minha vida, e dividirem comigo suas experiências. Saibam que jamais esquecerei cada uma das histórias que dividiram comigo. Que vocês continuem sendo essas pessoas açucaradas e cheias de alegria que mesmo nos momentos de maior desespero conseguem com a maior calma do mundo me dar uma palavra amiga. Vó que a senhora continue por muitos anos essa pessoa generosa, prestativa e que deixou de ter para si para que eu tivesse esta é a maior prova de amor. Vô que o senhor continue sendo esse homem altivo, animado, um exemplo de bondade e de um enorme coração que só consegue doar o seu melhor ao próximo.

Antônia e Gervasio - Que continuem sendo esta força sobrenatural que me auxiliam em meus caminhos e que onde quer que estejam cuidam para que sempre aconteça o melhor na minha vida e de meu Pai. Vó saiba que mesmo sem conhece-la sinto nas palavras de meu Pai a doçura de mulher que foi e um grande exemplo de garra a ser seguido.

MEU IRMÃO

Murilo- O maior amor não é aquele que vem do sangue e sim do coração. E você é o irmão que Deus me deu continue sendo meu grande Amigo.

ALEGRIAS DE MINHA VIDA

Eduardo, Felipe e Lenita- Muito obrigado Lê por sempre se alegrar com minhas vitórias e por toda a parceria e generosidade que tem por mim e minha família e continue sendo esta grande amiga. Eduardo muito obrigado por tão pequenininho me ensinar o verdadeiro significado do amor e gratidão. Felipe obrigado por encher a minha vida de alegria e por me ensinar o verdadeiro significado da bondade.

AO MEU NAMORADO

Thiago – Muito obrigado pela parceria e companheirismo e que apesar das diferenças nos possamos conseguir sempre buscar no amor e na Fé a força necessária para conseguirmos conquistar nossos objetivos e crescer juntos.

Tudo que sou e conquistei foi por vocês.

DEDICO

A **DEUS** – Pai todo poderoso, que me concedeu o dom de minha vida e que me dá forças e sabedoria para trilhar meus caminhos me orientando com todo o amor de Pai.

A **São Judas Tadeu** – por todas as graças concedidas e por ter sido a força que de maneira indireta me movimentou para realização deste trabalho, pela sua história de forca, determinação e garra.

A **São Miguel Arcanjo -** pela presença constante em minha vida, me guiando nas provações e participando das minhas alegrias. Minha eterna gratidão pelas palavras de carinhos nos momentos de espiritualidade intensa.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Profª. Eliana** por ter me acolhido em seu laboratório e em seu coração por ser esta grande mulher e pesquisadora. Muito obrigado por dividir uma mínima parte de seus conhecimentos e por contribuir imensamente para meu crescimento intelectual e moral. Que a senhora continue sendo esta pessoa maravilhosa este anjo sem asas, que sempre tem uma palavra amiga para nos dar.

Ao meu coorientador **Prof. Jackson** muito obrigado por contribuir para o meu crescimento profissional.

A **Profª Lucia** por todos os conselhos ensinamentos e por me tratar com a maior ternura do mundo. Muito obrigado por sempre me ouvir, acolher e por nunca me deixar desistir mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos Professores **Dra. Janete Ap. Desidério, Dra. Tsai Siu Mui, Dra. Tereza C. Luque Castellane, Dr. Hugo Miguel Preto de Morais Sarmento,** pela participação na banca examinadora e preciosas sugestões.

Ao **Prof. Daniel** por me ensinar muito sobre informática e estatística. Obrigado pela dedicação ao meu trabalho.

Aos meus amigos **Elisangela, Thais Mariana e Elwi** pelos momentos engraçados que vivemos em nosso aquário, por tudo que aprendi com cada um de vocês e sobretudo pela amizade, carinho, compreensão e ideias para conclusão deste trabalho. Muito Obrigado por serem estas pessoas maravilhosas.

Ao **Dr. Luciano Kishi,** pela amizade, carinho, compreensão e por dividir comigo uma pequena parte de seu conhecimento, saiba que graças a suas preciosas ideias este trabalho fez com que ele se tornasse mais importantes do que imaginava.

Ao **Dr. João Carlos Campanharo**, por tudo que me ensina até hoje, que você continue sendo este exemplo de humildade, competência e profissionalismo.

A **Drª Silvana Pompeia** por todos os auxílios e por ser sempre muito generosa, amorosa e carinhosa comigo. Sil você uma pessoa maravilhosa digna de muitas bênçãos.

Aos meus amigos do **LBMP** por tornaram deste ambiente de trabalho muito alegre e sadio.

Aos amigos do **Departamento de Tecnologia** e **Biologia** por todo auxilio e carinho – Muito Obrigado.

Aos funcionários da **Pós Graduação** por toda compreensão e auxilio.

Ao meu primo Murilo Por ser esta pessoa boa e este grande amigo, po ser meu exemplo de bondade amor carinho e dedicação as pessoas. Te amo.

As minhas amigas **Franciele, Isabelli e Marcia**, por sempre torcerem por mim e para realização deste sonho. Vocês minhas amigas sabem mais do que ninguém o quanto esta caminhada foi árdua e o quanto cresci profissionalmente. Muito Obrigado.

Ao querido **Padre Edson**, por sempre tocar meu coração com suas palavras de fé. Que o senhor continue sendo este homem iluminado e cheio de Deus, que suas palavras continuem encontrando morada no coração de todos por muito tempo. Obrigado por ser uma das forças que me movimentou até o fim desta etapa.

A **Dona Célia**, pelas orações e torcida. Muito Obrigado.

A amiga **Adriana**, por sempre orar por mime por minha família, por toda a torcida. Obrigado que Deus te conceda sempre mais.

Aos amigos **Diversino e Rose**, por sempre orarem por mim. Obrigado por serem este exemplo de generosidade, humildade e fé. Pois quem em Deus se consagrou será para sempre discípulo e anunciador de sua palavra.

Aos meus amigos de Franca por todos os momentos de alegria, felicidade e carinho nestes dez anos de convivência.

A **Drª Fernanda e ao Dr Paulo** , por valorizarem sempre meu trabalho e pela grande importância que deram para este momento.

Ao **Sr. Asley, Luiz Roberto, Dona Ofélia e Bernadade,** por sempre me motivarem a seguir em frente saibam vocês foram parte importante para realização deste sonho.

Gostaria de agradecer a todos que participaram de maneira direta ou indireta em minha jornada, saibam que vocês foram muito importantes, que Deus continue honrando e abençoando todos vocês. Muito Obrigado !!!

"A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades" - Abraham Lincoln

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS xv
LISTA DE FIGURAS xvi
RESUMO- 1
ABSTRACT- 3
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais 5
1.INTRODUÇÃO 5
2.REVISÂO DE LITERATURA 7
2.1. Quadrilátero Ferrífero 7
2.1.1. Sabará 8
2.1.2. Brumadinho 8
2.2. Comunidade microbiana do solo. 9
2.3. Técnicas para exploração da riqueza de compostos microbianos. 10
2.3.1. Análise do perfil metabólico - Biolog Ecoplate 10
2.3.2. Isolamento de microrganismos 11
2.3.3. Metagenômica microbiana 11
2.4. Microrganismos na biorremediação de metais 14
2.4.1. Processos de Imobilização de íons Metálicos 15
2.4.1.1.Compostos metabólicos de ligação ao metal 16
2.4.2. Aplicação dos microrganismos em processos de biorremediação de metais. 17
3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 19
CAPÍTULO 2- Biolog® EcoPlate aplicado para avaliar o perfil metabólico da comunidade microbiana de ecossistemas do quadrilátero ferrífero (MG). 25
RESUMO - 25
ABSTRACT- 26
1.INTRODUÇÃO 27
2.MATERIAL E MÉTODOS 28
2.1. Regiões de Estudo e Coleta das amostras de solo 29
2.2. Análise da atividade Metabólica Microbiana 31
2.3. Análise Estatística 33
3.RESULTADO 34
4.DISCUSSÃO 38

5.CONCLUSÃO 40

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 41

CAPÍTULO 3- Potencial de tolerância, bioacumulação e biossorção de isolados bacterianos de solos de região de mineração de ferro. 47

RESUMO- 47

ABSTRACT- 48

1.INTRODUÇÃO 49

2.MATERIAL E MÉTODOS 50

2.1. Região de estudo. 50

2.2. Coleta de material 50

2.3. Isolamento e caracterização de culturas bacterianas 51

2.4. Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA 52

2.5. Curva de Crescimento 53

2.6. Seleção de isolados e desafio de resistência a metais. 53

2.7. Biorremoção e biossorção de metais 54

2.8. Análise estatística 55

3.RESULTADOS 55

3.4. Isolamento e seleção de isolados resistentes a metais. 55

3.5. Desafio de resistência a metais 56

3.6. Caracterização dos isolados por sequenciamento do gene 16S rDNA. 57

3.7. Curva de crescimento bacteriano 58

3.8. Imobilização de Metais 60

3.8.1. Biossorção de metais 60

3.8.2. Acumulação de metais por células 62

4.DISCUSSÃO 64

5.CONCLUSÃO 66

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

CAPÍTULO 4- Prospecção *in silico* de genes ortólogos envolvidos em processos de resistência e remoção de metais em metagenomas de ecossistemas da região de Sabará –MG. 73

RESUMO - 73

ABSTRACT- 74

1.INTRODUÇÃO 75

2.MATERIAL E MÉTODOS 76

2.1. Seleção de sequências 76
2.2. Prospecção 76
2.3. Análise estatística 77
3.RESULTADOS 78
4.**DISCUSSÃO** 86
5.CONCLUSÃO 89
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90
CAPITULO 5- Considerações Finais 96

LISTA DE TABELAS

Páginas

CAPÍTULO 2- Biolog® EcoPlate aplicado para avaliar o perfil metabólico da comunidade microbiana de ecossistemas do quadrilátero ferrífero (MG).25

Tabela 1: Coordenadas dos pontos de coletas das amostras de Sabará e Brumadinho realizadas pelo aparelho GPS da marCP Garmin, modelo 62sc sendo os pontos apresentam as seguintes coordenadas em UTM. 31

Tabela 2 : Fontes de carbono das microplacas Biolog Ecoplate. 32

Tabela 3: Fórmulas para cálculos dos índices de diversidade funcional Shannon (E), Ritches e Desenvolvimento de cor médio..... 33

Tabela 4: Valores médios dos índices de diversidade funcional Shannon (E) e riqueza de substratos (R) dos quatro ecossistemas após 140 horas de incubação (*Tuckey 0,05%)*. 35

CAPÍTULO 3- Potencial de tolerância, bioacumulação e biossorção de isolados bacterianos de solos de região de mineração de ferro. 47

Tabela 1: Desafio de resistência para cobre, cromo e níquel em concentrações variáveis de 100 a 500 mgL^{-1} para 13 isolados dos diferentes ecosssitemas Mata Floresta (MF), Cerrado (CE), Capim (CP), Mata Eucalipto (ME) e Canga (CG). 57

CAPÍTULO 4- Prospecção *in silico* de genes ortólogos envolvidos em processos de resistência e remoção de metais em metagenomas de ecossistemas da região de Sabará –MG. 73

Tabela 1: Número de ORFs encontradas no banco Metagenômico MVDB do Laboratório de Bioquímica e Microrganismos de Planta para os genes de resistência a metais níquel oxidase *(nixA)*, multicooper oxidase ATPase *(copA)*, cromato oxidase *(chrA),* cooper oxidase *(cueO), multicooper* oxidase ATPase like *(copB).* 79

LISTA DE FIGURAS

Páginas

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais 5

Figura 1: Mapa de Minas Gerais com a delimitação do Quadrilátero Ferrífero (ALEX et al., 2012). 7

Figura 2: Métodos em Bioinformática para estudos metagenômicos de diversidade microbiana e funcional através de sequenciamento de nova geração (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012). 13

Figura 3: Imobilização de metais por microrganismos dependente de metabolismo, por transporte através da membrana e precipitação, e não dependente, permeabilidade iônica, precipitação e adsorção de superfície (ONLINE, 2014). 16

CAPÍTULO 2- Biolog® EcoPlate aplicado para avaliar o perfil metabólico da comunidade microbiana de ecossistemas do quadrilátero ferrífero (MG). 25

Figura 1: Fluxograma metodológico 29

Figura 2: Absorção de tetrazólio ao longo do tempo com base no índice de desenvolvimento médio de cor (AWDC) para as duas áreas coletadas. 34

Figura 3: *HeatMap* com os valores normalizados de absorbância agrupados para degradação de fontes de carbono das placas Biolog-Ecoplate para os ecossistemas Capim (CP), Canga (CG), Cerrado (CE) e Floresta (MF) de Sabará e Brumadinho. 36

Figura 4: Médiana da utilização de substratos dos ecossistemas da região de Sabará e Brumadinho. 37

Figura 5: Análise dos componentes principais (PCA) da mediana dos valores de absorbância dos diferentes tempos de quatro ecossistemas em duas coletas sendo: (MF_1) - Mata Floresta, (CP_1) Capim, (CE_1) Cerrado e (CG_1) Canga solos do Centro de Biodiversidade CEBIO – Sabará e (MF_2) - Mata Floresta, (CP_2) Capim, (CE_2) Cerrado e (CG_2) Canga, solos da Centro de Preservação do Miguelão –Brumadinho – MG. 38

CAPÍTULO 3- Potencial de tolerância, bioacumulação e biossorção de isolados bacterianos de solos de região de mineração de ferro. 47

Figura 1: Imagem das coordenadas geográficas dos locais amostrados recuperada com *Google Earth*. Estas áreas de coletas estão localizadas em Sabará-MG no Centro de Biodiversidade da Vale. 51

Figura 2: Diagrama de Venn, *screening* de isolados resistentes a metais nas concentrações de 50 mg L^{-1} de Cobre, Cromo e Níquel. 56

Figura 3: Curva de crescimento dos microrganismos, :(A) MF10, (B) CE05, (C) CP15, (D) CP16, (E) CE11 e (F) ME02, leituras em DO($_{600nm}$) em meios PGE, e meios PGE suplementado com 500 mg L^{-1}Cobre (Cu^{+2}), Cromo (Cr^{+6}), e Níquel (Ni^{+2}) as figuras foram geradas pelo programa *Sigmaplot*. 59

Figura 4: Porcentagem de biossorção de Cu^{2+} em sobrenadante dos cultivos dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h , com análise estatística ANOVA e Tuckey 0,5%. 60

Figura 5: Porcentagem de biossorção de Ni^{2+} em sobrenadante dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h , com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%.* 61

Figura 6: Porcentagem de biossorção de Cr^{6+} em sobrenadante dos cultivos dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 analisados nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h, com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%.* 62

Figura 7: Bioacumulação em células bacterianas cultivados em meios suplementado com 500 mg L^{-1} de Ni^{2+f} para os isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192 , com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%* 63

Figura 8: Bioacumulação em células bacterianas cultivados em meio suplementado com 500 mg L-1de Cu^{2+} dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h, com análise estatística ANOVA e Tuckey 0,5%..... 63

Figura 9: Bioacumulação em células bacterianas cultivados em meios suplementado com 500 mg L^{-1} de Cr^{6+} dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h, com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%.*..... 64

CAPÍTULO 4- Prospecção *in silico* de genes ortólogos envolvidos em processos de resistência e remoção de metais em metagenomas de ecossistemas da região de Sabará –MG. 73

Figura 1: Genes envolvidos cem processos metabólicos e de resistência a metal. 76

Figura 2 : Fluxograma metodológico 77

Figura 3: Porcentagem de ORFs do total de ORFs anotados para genes de resistência e de metabolismo de metal do banco Meteganômico MVDB - LBMP. 78

Figura 4: Distribuição de ORFs para os genes *copA, copB, cueO chrA, chrC, cusA, cusB* e *nixA* para o total de ORFs nos cinco ecossistemas Cerrado (CE), Capim (CP), Canga (CG), Mata Eucalipto (ME) Mata Floresta (MF). Os dados foram visualizados através do software Circos, o comprimento das barras, tal como no anel exterior foi representa na porcentagem de genes em cada ecossistema. 80

Figura 5: Análise de componentes principais de cinco ecossistemas. 81

Figura 6: Distribuição de filo bacteriano para os genes *copA, copB, cueO chrA, chrC, cusA, cusB* e *nixA* para os contigs dos cinco ecossistemas Cerrado (CE), Capim (CP), Canga (CG), Mata Eucalipto (ME) Mata Floresta (MF). Os dados foram visualizados através do software Circos, o comprimento das barras, tal como no anel exterior foi representa na porcentagem de genes em cada ecossistema. 82

Figura 7 : Alinhamento múltiplos pelo software ClustalW de sequências do banco NCBI para o gene *copA* para resistência de cobre com ORFs do banco Metagenômico MVDB do LBMP dos cinco ecossistemas mata floresta, mata eucalipto, cerrado, capim e canga, sendo que as colunas em negrito demonstram as regiões conservadas de acordo com o banco PFAM, a seta indica o sítio de ligação ao cobre *Acidobacterium capsulatum* (ACO33430), *Acetobacter pasteurianus* (BAI12244) *Xanthomonas citri* (ADR70747), *Enterobacter cloacae (*KGB08036) e *Pseudomonas* sp. (ABR10510). 83

Figura 8: Alinhamento múltiplos pelo programa ClustalW com sequências do banco NCBI para o gene *copA,* para multi cooper oxidase ATPse, e com sequências de metagenoma dos cinco ecossistema, Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga, sendo que as coluna colorias demonstram as regiões conservadas de acordo com o banco de PFAM *Arthrobacter arilaitensis* (CBT74889), *Pseudomonas alcaligenes* (GAD63322), *Nitrosomonas europaea* (CAD84930), *Acinetobacter radioresistens* (GAB76331), *Streptococcus agalactiae* (CFV18308), *Bacillus amyloliquefaciens* (AHZ17356), *Paenibacillus mucilaginosus* (AEI44753) e *Bacillus licheniformis* (AGN37932) 84

Figura 9: Alinhamento múltiplos pelo programa ClustalW de sequências do banco NCBI para o gene *chrA* cromato oxidase com sequencias de metagenoma dos cinco ecossistemas, Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga, sendo que as colunas coloridas demonstram as regiões conservadas de acordo com sequências do banco de dados PFAM, a seta indica o sitio de ligação ao cromo *Enterobacter cloacae* (KGB07959), *Pseudomonas fluorescens* (AEV63938), *Stenotrophomonas maltophilia* (CCH12056), *Paenibacillus mucilaginosus* (AEI41168) *Pseudomonas* sp. (CBL87892) e *Bradyrhizobium* sp. (EGP06243). 85

Figura 10: Alinhamento múltiplos pelo programa ClustalW de sequências do banco NCBI para o gene *chrA* cromato oxidase com sequencias de metagenoma dos cinco ecossistemas, Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga, sendo que as colunas coloridas demonstram as regiões conservadas de acordo com sequências do banco de dados PFAM, a seta indica o sitio de ligação ao cromo *Enterobacter cloacae* (KGB07959), *Pseudomonas fluorescens* (AEV63938), *Stenotrophomonas maltophilia* (CCH12056), *Paenibacillus*

mucilaginosus (AEI41168) *Pseudomonas* sp. (CBL87892) e *Bradyrhizobium* sp. (EGP06243). 85

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METAGENOMAS E ISOLADOS BACTERIANOS VISANDO A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO.

RESUMO- Os impactos ambientais causados por sucessivas extrações de minérios e compostos gerados dos resíduos tóxicos dessa atividade têm sido foco de preocupação dos ambientalistas, neste contexto há um grande esforço gerado para o desenvolvimento de metodologias eficientes e de baixo custo para remoção de metais pesados de solos e águas contaminadas. Os métodos biológicos surgem como uma alternativa aos métodos convencionais para o solo, um dos ecossistemas terrestre que apresentam uma infinidade de recursos naturais além da grande diversidade de microrganismos interagindo entre si. O mesmo constitui fonte de investimento para o isolamento de microrganismos e análises metagenômicas para prospecção de genes envolvidos em processos importantes para o equilíbrio metabólico e ecológico, pois, tanto de maneira isolada, como em interações, estes organismos desempenham papel importante no que diz respeito à produção de enzimas na biorremoção de metais e contaminantes do solo. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar a biossorção e bioacumulação de metais por microrganismos originados de solos de ecossistemas de Sabará, uma região de mineradora desativada Minas Gerais. Adicionalmente buscou-se avaliar a diversidade metabólica funcional, para uma comparação da microbiota de, Sabará e Brumadinho, combinada com busca de genes que conferem resistência a cromo (crhA), cobre (copA, copB, cueO) e níquel (nixA). Os isolados obtidos foram classificados em gêneros como *Burkolderia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Artrobacter*, que apresentam potencial para biorremediação de metais do solo e água. Entretanto, seis dos 32 isolados apresentaram resistência aos metais cobre, cromo e níquel, na concentração de 500 mgL^{-1}. Destes isolados, dois deles, do gênero *Burkolderia* e *Arthrobacter* (CP15 e CR11) apresentaram capacidade metabólica de biossorver e interiorizar metais pesados em diferentes fases do desenvolvimento. Quanto a atividade metabólica, a comunidade microbiana dos solos do perímetro do quadrilátero ferrífero (MG) tem alta atividade na degradação de fontes de carbono importantes nos ciclos biogeoquímico e biorremediação, justificando a grande quantidade de ORFs encontradas nas anotações do metagenoma sequenciado. Destaca-se os ecossistemas canga e

floresta que apresentaram maior número de sequências identificadas para todos os genes envolvidos no processo de resistência, influxo e efluxo de metais, sendo eles genes de resistência a cobre, multicooper oxidase ATPase (*copA, copB, cueO)*, multicopper ATPase like (*copA, copB)*, cromo oxidase (*chrA*), cromo transporte (*chrB)* e níquel oxidase (*nixA)*. Os solos da região de Sabará e Brumadinho alocados no, quadrilátero ferrífero, apresentam diversidade funcional para degradação de fontes de carbono como aminoácidos e compostos fenólicos, e genes funcionais de grande importância em processos metabólicos de remoção de metais pesados por microrganismos, além de microbiota com capacidade remover e interiorizar metais oriundos dos resíduos de mineração sendo um indicativo para a aplicação na biorremediação de metais em áreas afetadas pela mineração.

Palavras Chaves- Biorremediação, Biorremoção, Genes de Resistência, Cobre, Cromo e Níquel.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF METAGENOMAS AND ISOLATED BACTERIAL AIMED AT BIOREMEDIATION CONTAMINATION OF SOIL AREAS.

ABSTRACT- The environmental impacts caused by successive extractions of minerals and compounds generated toxic waste of this activity have been the focus of concern for environmentalists in this context there is a great effort generated for the development of efficient methodologies and cost-effective to remove heavy metals from soils and contaminated water. Biological methods appear as an alternative to conventional methods for the ground of the earth's ecosystems have a multitude of natural resources beyond the great diversity of microorganisms interacting. The same is investment source for the isolation of microorganisms and metagenomic analyzes to search for genes involved in important processes for metabolic and ecological balance, since both in isolation, as in interactions, these organisms play an important role as regards the production of enzymes in biorremoção metal and soil contaminants. This study aimed to isolate, characterize and evaluate the biosorption and bioaccumulation of metals by microorganisms originating from Sabara ecosystems soil, a mining region of Minas Gerais disabled. In addition we sought to evaluate the functional metabolic diversity, for a comparison of the microbiota of Sabara and Brumadinho, combined with search of genes that confer resistance to chromium (CRHA), copper (copA, CopB, cueO) and nickel (Nixa). The isolates were classified into genres such as Burkolderia, Serratia, Bacillus, Stenotrophomonas and Artrobacter, which have the potential for bioremediation of metals from soil and water. However, six of the 32 isolates were resistant to metals copper, chromium and nickel, at a concentration of 500 mg L-1. Of these isolates, two of them, the genus Arthrobacter and Burkolderia (CP15 and CR11) had metabolic capacity to internalize biossorver and heavy metals at different stages of development. As metabolic activity, the microbial community of the perimeter of iron quadrangle soils (MG) has high activity in the degradation of important carbon sources in biogeochemical cycles and bioremediation, which explains the large amount of ORFs found in the notes of sequenced metagenome. the yoke ecosystems and forest that had a greater number of sequences identified for all the genes involved in the resistance process is noteworthy, influx and efflux of

metals, and they copper resistance genes, multicooper oxidase ATPase *(copA, copB, cueO)* multicopper ATPase like *(copA, CopB)*, chrome oxidase *(chrA)*, chrome transport *(chrB)* and nickel oxidase *(nixA).* The soils of Sabara and Brumadinho region allocated to, iron quadrangle, have functional diversity for degradation carbon sources such as amino acids and phenolic compounds, and functional genes of great importance for metabolic processes of removing heavy metals by microorganisms, and microorganisms with ability to remove and internalize metals coming from the waste mining being an indication for use in the bioremediation of metals in areas affected by mining.

Keywords - Bioremediation, Biorremoção , Resistance Genes , Copper , Chrome and Nickel

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a presença de metais pesados, que mesmo em quantidades vestigiais é tóxico e prejudicial para a flora e fauna, tornou-se um grande problema ambiental (GADD, 2000). Técnicas como precipitação, oxidação/redução, adsorção, complexação e cimentação, redução eletrolítica, troca iônica e osmose reversa vem sendo utilizados para remoção de metais pesados de ambientes aquáticos e solos (BAI et al., 2014), sendo que no entanto, existem processo naturais, como biososorção por células mortas, por bactérias, onde sua utilização que vem sendo estudados, como exemplo a utilização de plantas na biorremoção de metais, uma vez que a mesma absorve os metais pela raiz ou em associação com microrganismos, não transferindo os mesmos para cadeia alimentar (MARGESIN; PŁAZA; KASENBACHER, 2011).

Além de plantas e dos processos convencionais, os micro-organismos relacionados a solubilidade de minerais, biomineralização, biorremediação, corrosão microbiana (LI et al., 2014) é de peculiar interesse para a biorremediação de ambientes, devido ao baixo custo de sua implementação, despertando assim um grande interesse na indústria. (CHEN et al., 2014; UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009).

O solo é conhecido por apresentar uma comunidade microbiana extremamente diversificada, que apresenta uma grande diversidade funcional de genes para a produção de enzimas envolvidas em diferentes processos importantes para ciclagem de nutrientes bem como aqueles envolvidos no metabolismo oxidativo, biorremediação, biomineração, entre outros (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008; PANICKER; GOPALAKRISHNAN, 2014). As tecnologias de sequenciamento de nova geração possibilitam gerar inúmeras sequências em um curto período de tempo a preços acessíveis, esta facilidade permite acessar a diversidade bacteriana e genes funcionais envolvidos em ciclos biogeoquímicos. Neste contexto, a metagenômica fornece informações para visualizar e entender as interações microbianas com o ambiente e assim entender as mudanças ambientais (MYROLD; ZEGLIN; JANSSON, 2014) .

Muitos gêneros bacterianos também encontrados no solo atuam nos processos de biomineração e biorremediação, principalmente os acidófilos com potencial oxirredutor, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus sp*. e *Acidithiobacillus caldus* (GADD, 2000). Além destes, alguns gêneros como *Pseudomonas, Burkolderia, Bacillus e Rhizobium* (WANI; AYOOLA, 2015) apresentam potencial para biorremediação considerando que esses microrganismos apresentam metabolismo oxidativo de minerais atuando de maneira importante na biorremediação de cobre, cromo , níquel e zinco (SILVER, 1996).

Os processos biológicos relacionados a ambientes têm sido bastante explorado uma vez que os mesmos exercem papel importante na manutenção dos ecossistemas. Uma série de tecnologias e esforços ao longo do mundo todo tem sido aplicada para a descoberta da diversidade e acesso as informações funcionais a nível de genes (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). Estudos de diversidade funcional em áreas de extração de metal, possibilitam identificar genes que conferem resistência a metais pesados e envolvidos no metabolismo de metal (COSTA et al., 2015; HUNTER et al., 2014; PANICKER; GOPALAKRISHNAN, 2014).

Considerando que os microrganismos apresentam um papel essencial nos ciclos biogeoquímicos, e na biodisponibilidade de metais, tornam-se de relevância os estudos para conhecer a diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas em áreas com grandes concentrações de metais (COSTA et al., 2015). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos de diferentes biomas do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais, uma das maiores regiões do mundo de mineração, com intensa atividade de mineração desde o século 17, visando a seleção daqueles com possível potencial para biorremediação de Cobre bivalente (Cu^{2+}), Cromo Hexavalente (Cr^{6+}) e Níquel (Ni^{2+}), bem como avaliar por meio de análise metabólica, as características funcionais da comunidade procariótica e a prospecção de genes envolvidos no metabolismo de metal.

2. REVISÂO DE LITERATURA

2.1. Quadrilátero Ferrífero

O estado de Minas Gerais apresenta uma região denominada Quadrilátero Ferrifero, a qual engloba municípios que se enquadram entre as maiores produtoras nacionais de minério de ferro. São os municípios de Sabará, Santa Bárbara, Mariana, Congonhas, Ouro Preto, João Monlevade, Rio Piracicaba, Itaúna , Itabira, Brumadinho entre outros (Figura 1) (ALEX et al., 2012).

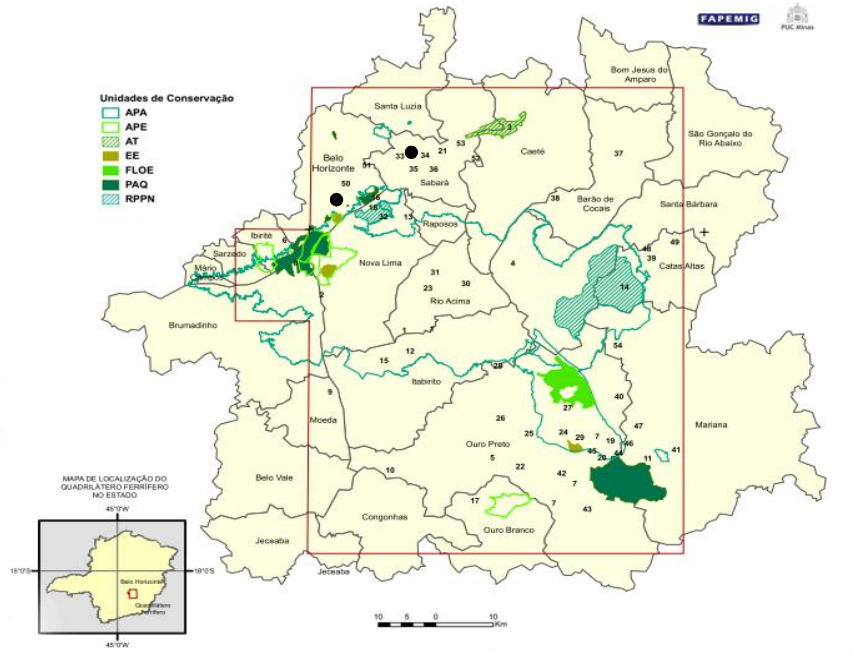

Figura 1: Mapa de Minas Gerais com a delimitação do Quadrilátero Ferrífero (ALEX et al., 2012).

As riquezas do Quadrilátero não só englobam minério de ferro mas outros minérios como manganês, ouro, entre outros. Esta região é de extrema importância para história brasileira por ter sido o maior polo de extração de ouro no ciclo do ouro. Esta região também engloba uma série de companhias e empresas de grande porte com a Vale S/A entre outras.

A Vale é grande responsável pela extração de minério nesta região contribuindo para o crescimento econômico e estrutural desta Região. Esta

apresentarem grande preocupação com a parte ambiental dos municípios alocados nesta região tendo dois parques denominados Centro de Biodiversidade CEBIO-Sabará-MG e Vale Estadual do Miguelão em Brumadinho – MG. Os centros de diversidade compartilham cinco ecossistemas de preservação e revitalizados: Campo Rupestre, Campo de Gramíneas, Mata Floresta, Cerrado e Mata Eucalipto (MORAIS et al., 2010).

2.1.1. Sabará

Sabará é um município do estado de Minas Gerais, localizado na Região Metropolitana de Belo Horizonte. Sabará apresenta uma paisagem repleta de montanhas rochosas com solos com características calcarias e grande concentração de ferro, está sendo de grande importância para o crescimento econômico e industrial, por conta da extração deste minério (VARAJAO, 1991).

O município de Sabará está localizado na bacia do Rio das Velhas se estendendo pelo Rio Sabará e apresenta um clima tropical com períodos de chuva em outubro e abril, com temperatura em torno de 21ºC na mínima e 27ºC em períodos de verão e 16ºC no inverno (REZENDE; AUGUSTO; SALGADO, 2011). A região de Sabará se apresenta revestida por uma floresta semidecidual típica de Mata Atlântica, solo do tipo latossolo vermelho argiloso, com vegetação características deste ecossistema além de campos rupestres com características quartizoliticas com preenchimento por vegetações rasteiras. Solo de cerrado com características bastante semelhantes ao Campos Rupestre e um campo de gramíneas povoado por capim gordura caracterizam este municípios (DE MORAES, 2006).

2.1.2. Brumadinho

Brumadinho é um município localizado em Minas Gerais, sendo a mineração uma das atividades econômicas de maior destaque nestas regiões. Esta região possui grande riqueza ambiental e paisagísticas com vegetação composta por Florestas Estacionais Semideciduais, Campos Altimontanos e Campos Rupestres (SILVA, 1998). Apresenta um clima com duas estações definidas,

uma chuvosa e outra seca (nordeste, centro-oeste e parte do Sudeste), e acentuada variação térmica (sul) (MAIA, 2014).

As florestas estacionais e semideciduais apresentam amplitude de 100 a 1800 metros, distribuída de 300 a 1200 metros. Esse ecossistema recobre os solos do espaço dos domínios dos Morros Florestados no sul e no sudeste, com predomínio dos solos Vermelhos-Amarelados (Podzólicos e Latossolos). Encontram-se distribuída sobre embasamento sudeste além da região centro sul do Paraná e Triangulo Mineiro (MORAES et al., 2010). Nas regiões montanhosas de Brumadinho se encontram os campos Rupestres, campos com solos característicos pela formação de quartzo e arenito, com cobertura de uma vegetação rústica que normalmente sobrevivem em solos de característica rochosa ou até mesmo desértica. Ainda apresentam um ecossistema de cerrado com características próximas a canga quanto a composição do solo (VARAJAO, 1991).

A região de Brumadinho abriga o cenário perfeito para a mineração além de lindas paisagens, contando ainda com o Centro de Tecnologia de Ferrosos mantido pela Vale /SA, área onde antes era feito extrações de minério e hoje consiste em uma área de preservação que engloba grande parte desta diversidade de ecossistema. Este Centro de Preservação engloba ecossistemas como Campo Rupestre (Canga), Mata Floresta, Cerrado e Campo de Gramíneas (ANTONIO; ELIAS, 2011)

2.2. Comunidade microbiana do solo.

O solo é um dos reservatórios de carbono orgânico da Terra constituindo-se em um dos mais importantes habitats para microrganismos, componentes essenciais da biota terrestre. Os micro-organismos exercem um importante papel na manutenção da vida na Terra, atuando na ciclagem de nutrientes e minerais, na produção de biomassa, relações simbióticas, no controle de populações (ACID et al.,1995). A versatilidade deste reservatório natural de espécies deriva de um longo caminho evolutivo em que inúmeras adaptações e estratégias metabólicas foram desenvolvidas em diferentes condições de pressão seletiva (GOMEZ; FERRERAS; TORESANI, 2006).

Os micro-organismos catalisam reações metabólicas de extrema importância dos ciclos biogeoquímicos da biosfera produzindo componentes importantes para a manutenção da atmosfera, além de representarem a maior diversidade genética e metabólica dentre as formas de vida existentes. O solo é o habitat que contém a maior quantidade e diversidade de micro-organismos, um grama de solo contém mais de 10.000 diferentes espécies (TORSVIK et al., 2002).

Esta diversidade de micro-organismos e suas atividades metabólicas têm sido muito exploradas pela biotecnologia como alternativa de melhoria do padrão de vida humana e na qualidade ambiental. Nesta temática a busca por novos isolados e enriquecimentos microbianos, com a finalidade de aplicação em abordagens enzimáticas para realização de diversos processos tem movimentado grandes esforços no meio acadêmico e industrial (GADD, 2010).

2.3. Técnicas para exploração da riqueza de compostos microbianos.

2.3.1. Análise do perfil metabólico - Biolog Ecoplate

A biodiversidade do solo tem despertado grande interesse para estudos, devido a riqueza de microrganismos e a complexidade deste bioma, na regulação e funcionamento de processos ecológicos. Os microrganismos que habitam o solo são capazes de metabolizar moléculas orgânicas e assim liberar nutrientes inorgânicos utilizados pelas plantas, devido a esta alta atividade microbiana para ciclagem de nutrientes. Garland e Mills introduziram o uso comercial de microplacas Biolog como um sistema para avaliar a diversidade funcional destes microrganismos oriundos de amostras ambientais, baseado na utilização de determinadas fontes de carbono (C) (GARLAND & MILLS,1991; WEBER et al., 2007).

O método pode revelar diferenças consideráveis de utilizações de diferentes substratos pela comunidade microbiana, segundo Stefanowicz (2006) a placa surge com um método eficiente para avaliar as interações microbianas e compostos gerados, sendo uma ferramenta eficiente para avaliar a diversidade funcionala da comunidade microbiana de diferentes ecossistemas (SCHUTTER e DICK, 2001). Portanto, o perfil fisiológico Biolog tem sido uma ferramenta muito

útil para refletir mudanças de atividade metabólica e/ou potencial de versatilidade funcional de comunidades microbianas expostas a diversos estresses, inclusive pela concentração de metais pesados (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014; SOUZA et al., 2012).

2.3.2. Isolamento de microrganismos

Historicamente, microrganismos cultiváveis dos solos tem sido uma fonte inesgotável para a prospecção e produção de compostos naturais com atividade biológica para a vida terrestre. Desde 1900 aproximadamente, produtos oriundos do metabolismo secundário destes microrganismos têm sido aplicados nos setores industriais (WHITE; SAYER; GADD, 1997). Estes compostos têm sido aplicados para produção de medicamentos, inseticidas, promotores de crescimento, polímeros e enzimas de aplicação biotecnológica (ISLAM et al., 2004).

O isolamento e obtenção de culturas puras permitem estudar os microrganismos de amostras ambientais de maneira individual e assim caracterizá-los, principalmente por critérios nutricionais (SCHLOTER; DILLY; MUNCH, 2003). Esta técnica tradicional permite acessar uma parte da diversidade existente no solo e também a busca de linhagens produtoras de diversas substâncias e assim aplicar estes microrganismos, bem como aplicar biotecnologicamente seus compostos (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009).

2.3.3. Metagenômica microbiana

Os microrganismos cultiváveis tem sido uma fonte inesgotável, para a produção de compostos (enzimas) importantes na aplicação biotecnológica, atendendo uma série de setores como, energético, têxtil, farmacêutico, agropecuário e também sendo aplicados em processos alternativos para recuperação de ambientes através da biorremediação (AURÉLIO; PINHO; FILHO, 2010). Estes compostos de extrema importância para o setor industrial têm sido acessado por técnicas tradicionais como isolamento e cultivo de microrganismos de amostras ambientais (COSTA et al., 2015).

A maioria das enzimas utilizadas no setor industrial tem sido descoberta por meio de métodos tradicionais por microrganismos isolados, busca em bibliotecas metagenômicas, entretanto estes processos apresentam algumas limitações por conta da biotransformação e efeitos biocatalíticos, os quais ainda permanecem impraticáveis em função de deficiências associadas às enzimas, tais como baixa taxa de expressão ou localização intracelular (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009). Além da problemática descrita acima há um aumento na redescoberta de compostos, enquanto há muito ainda a se explorar, uma vez que os ecossistemas apresentam uma grande diversidade de microrganismos, que técnicas tradicionais não permitem acessar.

Neste contexto, a metagenômica surge para acessar o desconhecido e toda a informação não cultivável tradicionalmente, sendo, assim uma ferramenta que permite acessar toda a informação presente no ambiente através do DNA de amostras mistas, permitindo aprofundar estudos a nível gênico, com finalidade de se encontrar genes que codificam enzimas importantes para a aplicação biotecnológica (MYROLD; ZEGLIN; JANSSON, 2014). Atualmente, com o surgimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração é possível acessar toda esta diversidade de uma maneira mais ampla em um curto período de tempo e com custos mais acessíveis, portanto este avanço tecnológico aumenta ainda mais a facilidade de acessar a diversidade de microrganismos e genes funcionais (Figura 2) para uma possível aplicação biotecnológica e biorremediação, além de permitir o entendimento do metabolismo da comunidade microbiana (HUNTER et al., 2014).

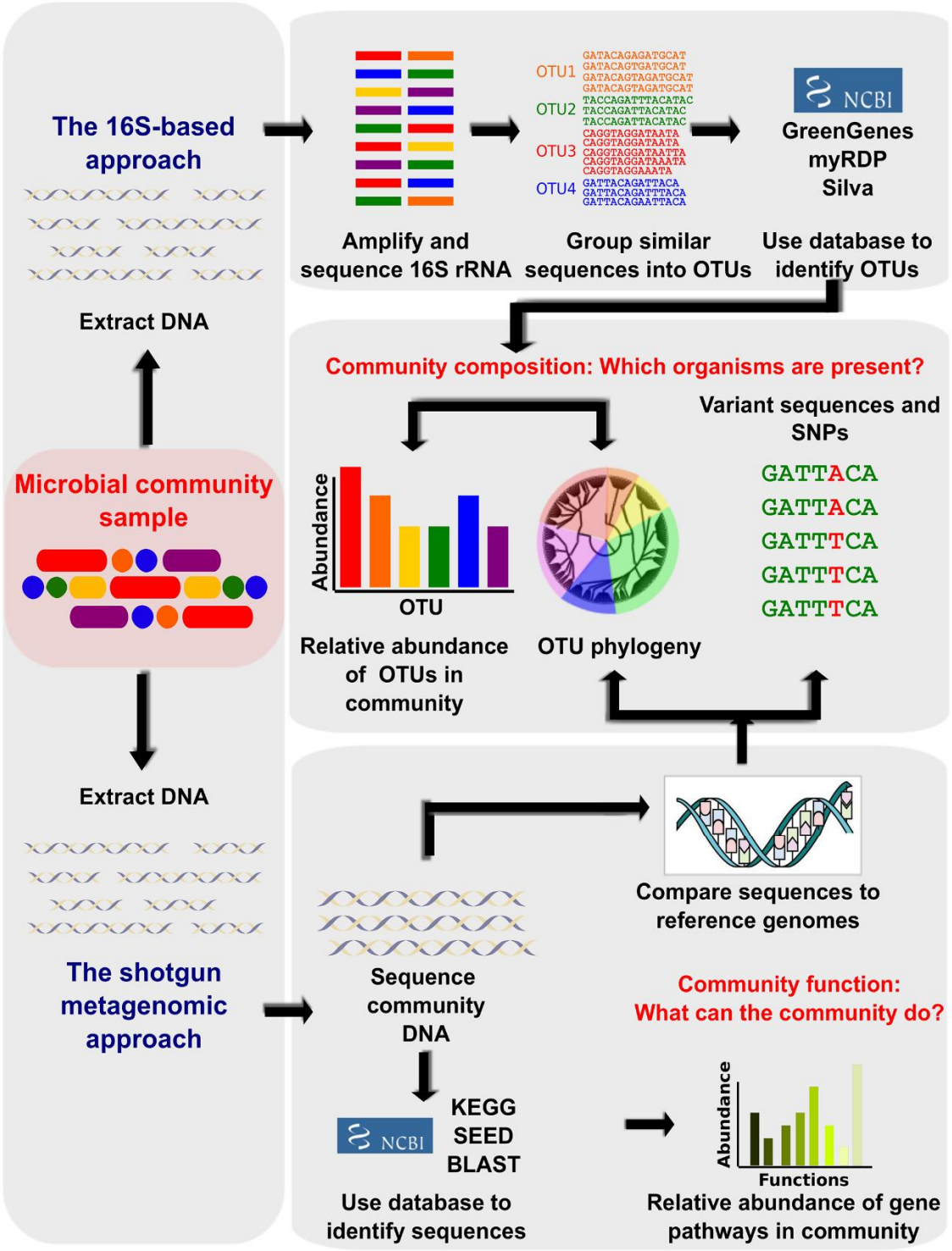

Figura 2: Métodos em Bioinformática para estudos metagenômicos de diversidade microbiana e funcional através de sequenciamento de nova geração (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

2.4. Microrganismos na biorremediação de metais

Os mecanismos de remoção, acumulação e transformação de metais são processos de bastante importância para manutenção da vida terrestre, por serem componentes fundamentais para os ciclos biogeoquímicos (GAAD, 2000). Processos alternativos para remoção de metais por microrganismos são dependentes da capacidade de efetuar e/ou mediar a mobilização de metais. Os processos de mobilização de metais bem como remoção de metais podem ser obtidos por exemplo por protonação, quelação e transformação química enquanto imobilização pode ocorrer por precipitação ou a cristalização de compostos orgânicos ou inorgânicos insolúveis ou por adsorção, absorção e sequestro intracelular (DAS; VIMALA; KARTHIKA, 2008). Uma série de interações metal microrganismos foram estudadas bem como o meio para que os processos como remoção, recuperação ou desintoxicação de metal inorgânico e orgânico ou poluentes radionuclídeos possam ocorrer (Figura 1) (LOVLEY & COATES, 1997; FRANCIS, 1998; STEPHEN & MACNAUGHTON, 1999 e ECCLES; 1999).

No contexto de reduzir, reutilizar e remover metais, matrizes como solo, sedimentos, lixeiras e resíduos industriais, podem ser fontes com bastante potencial para aplicação em processos de revitalização de áreas visto que estes microecossitemas apresentam uma diversidade de microrganismos com maquinaria metabólica necessária que permite que os metais sejam transformados *in situ* em formas insolúveis e inertes quimicamente e que também são aplicáveis para a remoção de metais a partir de uma solução aquosa (DAS; VIMALA; KARTHIKA, 2008b). Entretanto estes processos de transformação ou remoção de metais são intrínsecos embora menos apropriados para meios tradicionais de tratamento de águas e esgotos. As técnicas moleculares e de análise genética permitem uma maior compreensão do metabolismo microbiano de metais, incluindo aqueles aspectos que são de relevância ambiental e biotecnológico (NIES, 1999; CHEN et al., 1999).

2.4.1. Processos de Imobilização de íons Metálicos

Inúmeros processos são envolvidos na imobilização de metais, estes processos visam a redução de íons metálicos livres no meio externo, podendo promover a solubilização e deslocamento (Figura 3) de maneira equilibrada para que não ocorra liberação de mais metal na solução (TSEZOS, 2001).

Processos de remoção por biossorção pode ser definido como adsorção de ions metálicos nas formas orgânicas e inorgânicas solúveis ou insolúveis em processos físico-quimicos. Em células na sua forma viva os processos de adsorção recebem influencia direta dos metabolismos bem como outros fatores como pH, nutrientes orgânicos, inorgânicos e metabolitos. Processo de remoção de metais podem ser locais, ou seja, pelo contato e envolvendo processos metabólicos Remoção de metais por biossorção podem ser locais ou até mesmo de modificação de íons metálicos, uma vez que alguns microrganismos tem capacidade de remover por adsorção na superfície espécies catiônicas tem capacidade de acumular metais no interior das células vivas, visto que apresentam mecanismos genotipicos e fenoticos como por exemplo, proteínas de membrana que fazem esse transporte por afinidade e especificidade. Uma vez que esse metal se encontra no interior da célula ele pode se metabolizado e atuar como co-fator enzimático para metabolismo celular (GADD, 1996; BRANCO, 1997; WHITE et al., 1997; GADD & SAYER, 2000).

Os microrganismos apresentam características importantes como Peptidioglicano grupos carboxílico, que são os locais principal para a ligação de íons na parede celular de bactérias Gram-positivas e os grupos de fosfato que contribuem significativamente em espécies Gram-negativas (BEVERIDGE DOYLE, 1989 E MCLEAN ET AI., 2002). Dentre os processos de remoção de metais destaca-se atualmente a biomassa de células mortas que tem cargas que permitem a ligação de metal sem gasto de energia, processo que apresentam grande vantagem, visto sua maior resistência mecânica, fácil separação dos biossorventes do sobrenadante (MACASKIE & DEAN, 1989, BRIERLEY, 1990, MACASKIE, 1991; TOBIN et ai., 1994). A biomassa viva também tem sido amplamente utilizada sob a forma de biofilmes bacterianos e de forma isolada em uma variedade de aplicações como contatores biológicos

rotativos, reatores de leito fixo, gotejamento filtros, leito fluidizado e biorreatores (GADD, 2001; MACASKIE & DEAN, 1989; GADD E BRANCO, 1993; SCHIEWER & VOLESKY, 2000).

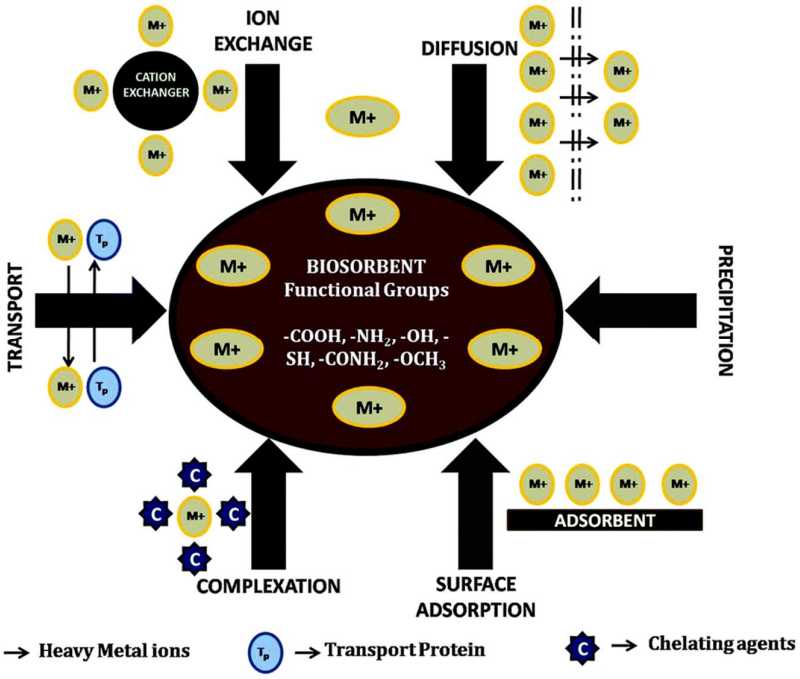

Figura 3: Imobilização de metais por microrganismos dependente de metabolismo, por transporte através da membrana e precipitação, e não dependente, permeabilidade iônica, precipitação e adsorção de superfície (ONLINE, 2014).

2.4.1.1. Compostos metabólicos de ligação ao metal

Os microrganismos excretam uma série de compostos metabólicos que são sítios de ligação específicos e inespecíficos para íons metálicos. Os sítios não específicos são ácidos orgânicos e álcoois para a ligação de macromoléculas, como polissacarídeos, ácidos húmicos (BIRCH BACHOFEN, 1990; FAIA & CHEUNG, 1995, BRIDGE et al., 1999; SAYER & GADD, 2001). Entretanto alguns microrganismos tem a capacidade de liberar compostos extracelulares como Exopolisscarideos (EPS) que apresentam carga positiva que permite a ligação com metais pesados (CHEUNG, 1995). Além de compostos metabólicos em geral alguns organismos vivos apresentam

metaloproteinas, que normalmente são proteínas de membrana que permite a difusão dos metais através da membrana da célula ou até mesmo a ligação por afinidade. (VALLS et al., 1998, PAZIRANDEH et al., 1998)

2.4.2. Aplicação dos microrganismos em processos de biorremediação de metais.

Microrganismos no processo de biomineração já é uma realidade, podendo citar como exemplo o emprego de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus sp.* e *Acidithiobacillus caldus* (WHITE; SAYER; GADD, 1997). O uso da biomineração microbiana é bastante difundido em processos de extração de cobre em mineradoras na China, Peru, Arizona, Austrália e Chile. (BRIERLEY & BRIERLY CONSULTANCY, 2008).

Dentre outras áreas de interesse, os produtos do metabolismo microbiano podem permitir a otimização de processos na extração de produtos de origem mineral, abrindo uma grande perspectiva para a exploração comercial de novos potenciais.

A atividade microbiana explorada resulta tanto de mecanismos diretos, enzimático, quanto por mecanismos químicos, e acarreta na melhor disponibilização dos minerais por dois processos: a bioxidação e a biolixiviação, podendo levar tanto à liberação de compostos conjugados quanto à precipitação de minerais originalmente em solução (SCHMIDELL, 2011).

A atuação sobre a solubilidade de minerais é de peculiar interesse para a biorremediação de ambientes hídricos, sobretudo pelo alto custo do processo de descontaminação tradicional em situações em que o poluente se encontra altamente diluído. Essa característica também desperta o interesse na própria indústria hidro-metalúrgica em virtude das possibilidades de aumento no rendimento da atividade mineradora.

O processo conhecido como bioadsorção de metais é a mais promissora tecnologia envolvida na remoção de compostos tóxicos de ambientes hídricos gerados pela indústria. Recentemente, o foco das pesquisas é a exploração da técnica na própria indústria, podendo expandir a recuperação de metais de base

e preciosos disponíveis em baixas concentrações (WASE, FORSTER, 1997; BAILEY et al., 1999; KUMAR et al., 2006). A bioadsorção engloba processos de difusão, quelação, adsorção, complexação e microprecipitações de metais, sob condições fisico-químicas específicas (VEGLIO, BEOLCHINI, 1997).

Pseudomonas é um gênero bacteriano de interesse para a aplicação na biomineração, sobretudo pela habilidade desses microrganismos de se ligarem a íons metálicos por uma ligação dependente do tipo de ligante, do sítio de ligação e da forma química do metal (KUMARAN; SUNDARAMANICKAM; BRAGADEESWARAN, 2011) além do gênero *Pseudomonas*, gêneros como: *Burkolderia*, *Bacillus* e *Rizobium* também apresentam capacidade de bioadsorção de metais como Fe, Cu, Cr entre outros, estes gêneros adsorvem metais através de estratégias do metabolismo sem formar compostos tóxicos ao meio (KUMAR et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCESS, O. Biodegradation. v. 5, n. 3, p. 8–10, 2014.

ACID, B. et al. Microbial Community Analysis Microbial Community Analysis. p. 1–2, [s.d.].

ALEX, M. et al. O quadrilátero ferrífero e o norte de minas gerais: análise da história e importância econômica. p. 1–16, 2012.

ALTIMIRA, F. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC microbiology**, v. 12, p. 193, jan. 2012.

AMBIENTAL, T. et al. USO DE MICROORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS. n. 6, p. 995–1006, 2012.

ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biolixiviação: Utilização de Micro-organismos na Extração de Metais**. [s.l: s.n.].

ARORA, P. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, V. P. Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in Burkholderia sp. RKJ 800. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 3, p. 2298–304, fev. 2014.

AURÉLIO, M.; PINHO, C. DE; FILHO, P. Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado. p. 28, 2010.

BAI, J. et al. Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by Bacillus subtilis DBM in a multi-metal-contaminated soil. **Journal of environmental sciences (China)**, v. 26, n. 10, p. 2056–64, 1 out. 2014.

BALDRIAN, P. et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME journal**, v. 6, n. 2, p. 248–58, fev. 2012.

BICKEL, S.; TANG, K.; GROSSART, H. Structure and function of zooplankton-associated bacterial communities in a temperate estuary change more with time than with zooplankton species. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 72, n. 1, p. 1–15, 7 mar. 2014.

BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. TtMCO: A highly thermostable laccase-like multicopper oxidase from the thermophilic Thermobaculum terrenum. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 59–65, 2015.

CAMPBELL, C. D.; GRAYSTON, S. J.; HIRST, D. J. Methods Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. v. 30, p. 33–41, 1997.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura - pecuária sob intensidades de pastejo. n. 1, p. 1254–1261, 2011.

CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; MERLIN, G. Seasonal and Spatial Changes of Microorganism Communities in Constructed Wetlands: A Community Level Physiological Profiling Analysis. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

CHEN, S. et al. Influence of co-existed benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of Stenotrophomonas maltophilia during biodegradation and transformation. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 181–187, 2014.

CHIEN, C. et al. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 359–363, jan. 2008.

COSTA, P. S. et al. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119465, jan. 2015.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – An overview. v. 7, n. April, p. 159–169, 2008a.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008b.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1229–34, jul. 2008.

DE, N. Ufop – cetec – uemg. 2006.

FERNÁNDEZ-MONTIEL, I. et al. Short-term effects of simulated below-ground carbon dioxide leakage on a soil microbial community. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 36, p. 51–59, 2015.

FINN, R. D. et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 222–230, 2014.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource technology**, v. 160, p. 3–14, maio 2014.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271–279, 2000.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource technology**, v. 97, n. 13, p. 1484–9, set. 2006.

GRYTA, A.; FRĄC, M.; OSZUST, K. The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9–18, 2001.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. August 2006, p. 481–483, 2008.

HUNTER, S. et al. EBI metagenomics - A new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 600–606, 2014.

INÁCIO, L.; ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Presente**. [s.l: s.n.].

ISLAM, F. S. et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 68–71, 1 jul. 2004.

KANG, C.-H. et al. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. **Ecological Engineering**, v. 74, p. 402–407, jan. 2015.

KLAUS-JOERGER, T. et al. Bacteria as workers in the living factory: Metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2001.

KUMAR, R. et al. Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. v. 12, n. January, p. 115–119, 2013.

KUMARAN, N. S. R. I.; SUNDARAMANICKAM, A.; BRAGADEESWARAN, S. ABSORPTION STUDIES ON HEAVY METALS BY ISOLATED BACTERIAL STRAIN (PSEUDOMONAS Sp .) FROM UPPANAR ESTUARINE WATER , SOUTHEAST COAST OF INDIA. v. 6, n. 4, p. 471–476, 2011.

LASHEEN, M. R.; AMMAR, N. S.; IBRAHIM, H. S. Adsorption/desorption of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) using chemically modified orange peel: Equilibrium and kinetic studies. **Solid State Sciences**, v. 14, n. 2, p. 202–210, 2012.

LI, L.-G. et al. Potentially novel copper resistance genes in copper-enriched activated sludge revealed by metagenomic analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10255–66, dez. 2014.

LIU, X. et al. TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 271, 2008.

LIU, X. et al. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: A multi-medium analysis. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 530–540, 2013.

MAHRAJBNE, C.; MAHRAGBNE, C. RESISTANCE OF E N V I R O N M E N T A l . BACTERIA TO H E A V Y METALS. v. 64, p. 7–15, 1998.

MAIA, V. O. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS BANCO DE SEMENTES DO SOLO EM ÁREAS DE MINERAÇÃO E. 2014.

MARGESIN, R.; PŁAZA, G. A.; KASENBACHER, S. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1583–1588, 2011.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 208–IN1, 1961.

MÉNDEZ-GARCÍA, C. et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May, p. 1–17, 2015.

MORETTI, G. et al. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. **Annals of Microbiology**, 2015.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12 : Human Microbiome Analysis. v. 8, n. 12, 2012.

MYROLD, D. D.; ZEGLIN, L. H.; JANSSON, J. K. The Potential of Metagenomic Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 78, n. 1, p. 3, 2014.

NGUYEN, V. H.; SHIM, J.-J. Three-dimensional nickel foam/graphene/NiCo2O4 as high-performance electrodes for supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 273, p. 110–117, 2015.

ONLINE, V. A. Environmental Science Processes & Impacts bioremediation-based abolition of heavy metals. p. 180–193, 2014.

PANICKER, V. P.; GOPALAKRISHNAN, A. Mini Review Article Metagenomics : a Novel Tool to Unravel the Secrets of Nature. v. 2, n. 6, p. 312–315, 2014.

PERSPECTIVES, C.; MICROBIOLOGY, A. Vigna mungo. v. 1, n. 2, p. 1–10, 2012.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium. **Journal of microbiological methods**, v. 97, p. 20–4, fev. 2014.

POWELL, S. et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D231–D239, 2014.

RELACIONADOS, A. et al. O QUADRILÁTERO FERRÍFERO - MG , BRASIL : ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA , SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS. v. 18, n. 1, p. 33–37, 2010.

REZENDE, É. A.; AUGUSTO, A.; SALGADO, R. MAPEAMENTO DE UNIDADES DE RELEVO NA MÉDIA SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL - MG. p. 45–60, 2011.

SCHLOTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. . Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255–262, set. 2003.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions - A review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 9–19, 1996.

STUDIES, I.; AUTHOR, C. HEAVY METAL TOLERANCE OF THREE DIFFERENT BACTERIA ISOLATED FROM. v. 2, n. 2, p. 137–147, 2013.

SZYMAŃSKA, S.; PIERNIK, A.; HRYNKIEWICZ, K. Metabolic potential of microorganisms associated with the halophyte Aster tripolium L. in saline soils. **Ecological Questions**, v. 18, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2013.

TARTAGLIA, M. et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 75–79, 2007.

THIJS, S. et al. Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: isolation and characterization of a military soil. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 294–306, 2014.

TSEZOS, M. Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 241–243, fev. 2001.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–622, 2009.

URAKAWA, H. et al. Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. **ISRN Oceanography**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

VARAJAO, S. A. R. A. C. A QUESTÃO DA CORRELAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE EROSÃO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO , MINAS GERAIS. v. 21, n. 2, p. 138–145, 1991.

VELA-CANO, M.; CASTELLANO-HINOJOSA, A.; VIVAS, A. F. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. n. August, p. 644–655, 2014.

WANI, P. A.; AYOOLA, O. H. Bioreduction of Cr (VI) by Heavy Metal Resistant Pseudomonas Species. n. Vi, p. 1–9, 2015.

WEBER, K. P. et al. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 3, p. 461–9, jun. 2007.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 697–703, 1991.

WHITE, C.; SAYER, J. A; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 503–16, jul. 1997.

XIA, X. et al. On the role of surface diffusion in determining the shape or morphology of noble-metal nanocrystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6669–73, 2013.

ZOU, R. et al. Three-dimensional networked NiCo 2 O 4 /MnO 2 branched nanowire heterostructure arrays on nickel foam with enhanced supercapacitor performance. **J. Mater. Chem. A**, v. 3, n. 4, p. 1717–1723, 2015.

KUMAR, R. et al. Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. v. 12, n. January, p. 115–119, 2013.

CAPÍTULO 2- Biolog® EcoPlate aplicado para avaliar o perfil metabólico da comunidade microbiana de ecossistemas do quadrilátero ferrífero (MG).

RESUMO **-** Muito tem se investido na utilização de microrganismos para aplicação biotecnológica bem como na manutenção de ambientes e até mesmo na redução de compostos tóxicos liberados neste contexto os métodos biológicos surgem como uma alternativa aos métodos convencionais sendo possível aproveitar a diversidade funcional da comunidade microbiana, portanto as Biolog® Ecoplate permitem analisar a atividade metabólica, diversidade funcional em amostras de ecossistemas ambientais, que reflete o estado da sua atividade. Esta é considerada uma tecnologia moderna, complementar e promissora, que através de propriedades biológicas permite a caracterização rápida do estado ecológico das amostras ambientais, tais como solos ou água e avaliar assim o potencial de sua aplicação dos microrganismos no processo de biorremediação. Entanto recorreu-se microplacas Biolog® EcoPlate para caracterizar e comparar a diversidade funcional da comunidade microbiana de quatro ecossistemas, campo rupestre, capim, mata floresta e cerrado, de dois municípios localizados no perímetro do quadrilátero ferrífero. Amostras de solo destes ecossistemas forma coletado, após a diluição seriada foram inoculadas nas Biolog® EcoPlate seguido pela leitura de absorbância, posteriormente os dados forma normalizados submetidos as análises. A microbiota dos ecossistemas se Sabará e Brumadinho apresentaram diferenças quanto a degradação de substratos e a diversidade funcional, sendo que os ecossistemas afetados por ação do homem apresentaram maior degradação de compostos de carbono da placa e alta diversidade microbiana. Os solos da região das regiões do quadrilátero apresentaram microbiota com atividade metabólica características para ecossistemas preservados e afetados. Portanto as Biolog® EcoPlate**,** surgem como uma alternativa promissora para avaliar a saúde de ecossistemas baseado na atividade metabólica microbiana.

Palavras chave: EcoPlate, comunidade microbiana, diversidade metabólica, atividade microbiana, perfil metabólico.

CHAPTER 2 - Biolog® Ecoplate applied to evaluate the metabolic profile of the microbial community of iron quadrangle of ecosystems (MG).

ABSTRACT- Much has been invested in the use of microorganisms for biotechnological applications as well as the maintenance of environments and even in the reduction of toxic compounds released this context biological methods emerge as an alternative to conventional methods and can take advantage of the functional diversity of the microbial community, so the Biolog® Ecoplate allow us to analyze the metabolic activity, functional diversity in ecosystems environmental samples, which reflects the state of its business. This is considered a modern, complementary and promising technology, which through biological properties allows rapid characterization of ecological status of environmental samples such as soil or water and thereby evaluate the potential of its application of microorganisms in the bioremediation process. However resorted to microplates Biolog® Ecoplate to characterize and compare the functional diversity of the microbial community four ecosystems, rocky fields, grass, woods forest and savanna, two cities located on the perimeter of iron quadrangle. Soil samples collected form these ecosystems, after the serial dilution were inoculated in Biolog® Ecoplate followed by absorbance reading later formed the analyzes submitted standard. The microbiota of ecosystems Sabara and Brumadinho showed differences in the degradation of substrates and functional diversity, and ecosystems affected by human action had higher degradation plate carbon compounds and high microbial diversity. The soils in the area of the quadrilateral regions showed microbiota with metabolic activity characteristics for preserved and affected ecosystems. So the Biolog® Ecoplate emerge as a promising alternative to assess the health of ecosystems based on microbial metabolic activity.

Keywords: Ecoplate, microbial community, metabolic diversity, microbial activity, metabolic profile.

1. INTRODUÇÃO

A degradação do solo em consequência da intensificação do uso da terra e inadequadas atividades, como são as principais preocupações ambientais (LIU et al., 2013).

A liberação de resíduos e a contaminação de ambientes tem despertado a atenção de ambientalistas, empresários e pesquisadores, dando maior atenção pela preservação de áreas que sofreram pressão ambiental, além da utilização de técnicas alternativas para recuperar ambientes, visto que nos últimos anos, a presença de metais pesados, que mesmo em quantidades vestigiais é tóxico e prejudicial para a flora e fauna, tornando um grande problema ambiental (GADD, 2000). Dentro da temática de minimizar os impactos que as liberações de resíduos industriais podem gerar, surge a utilização de microrganismos e plantas com o intuito de reduzir e remediar o ambiente (CHÁVEZ; ESCOBAR; ANGHINONI, 2011).

A atividade metabólica de microrganismos presentes em ecossistemas nativos ou impactados pode surgir como alternativa para a prospecção de enzimas importantes para a biorremediação de áreas além de atuar como um indicador da grande diversidade de microrganismos em ecossistemas com diferentes características, sendo assim, um indicativo da pressão ambiental sofrida (SZYMAŃSKA; PIERNIK; HRYNKIEWICZ, 2013)

As placas Biolog EcoPlate consistem em uma ferramenta para auxiliar o entendimento da comunidade microbiana e sua diversidade funcional nos estudos ambientais; análises a partir desta técnica podem ser realizadas com culturas isoladas de microrganismos ou mesmo culturas mistas e de amostras ambientais de solos, águas e resíduos (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014).

A população de microrganismos pode apresentar assim um padrão de resposta em característica `as diferentes fontes de carbono, servindo como um tipo de impressão digital metabólica (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014).

A tecnologia Biolog EcoPlate se baseia nas fontes de carbono que mimetizam situações ambientais, neste contexto as respostas da comunidade

de microrganismos permitem realizar um *screening* da atividade funcional dos microrganismos (THIJS et al., 2014; URAKAWA et al., 2013). Portanto esta ferramenta consiste em uma abordagem eficaz para auxiliar no entendimento dos fatores bióticos e abióticos, como exemplo, avaliar ambientes onde estas foram afetados devido à toxicidade de compostos ali presentes (BICKEL; TANG; GROSSART, 2014).

Nos últimos anos muitos esforços têm sido gerados para o desenvolvimento de tecnologias para proteção, entendimento e controle dos compostos gerados em relação a diversidade de microrganismos e subprodutos. A abordagem de fontes de carbono como entendimento da comunidade microbiana, tem atuado de maneira útil para entender a relação entres os resíduos tóxicos gerados e a redução da atividade bacteriana sendo um bom detector de compostos tóxicos que podem reduzir e inibir a atividade bacteriana (KLAUS-JOERGER et al., 2001; KUMAR et al., 2013; LI et al., 2014).

Nesta temática, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade funcional e efeitos das pressões ambientais da mineração na atividade microbiana por meio da ferramenta Biolog EcoPlate. Esta pesquisa apresenta grande importância cientifica e suporte para uma possível aplicação dos microrganismos na recuperação e remediação de ambientes (CHÁVEZ; ESCOBAR; ANGHINONI, 2011).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 1 tem-se o fluxograma experimental das abordagens utilizadas para avaliar a capacidade metabólica da comunidade microbiana, bem como a utilização de substratos e os índices de diversidade dos ecossistemas das regiões de Sabará e Brumadinho.

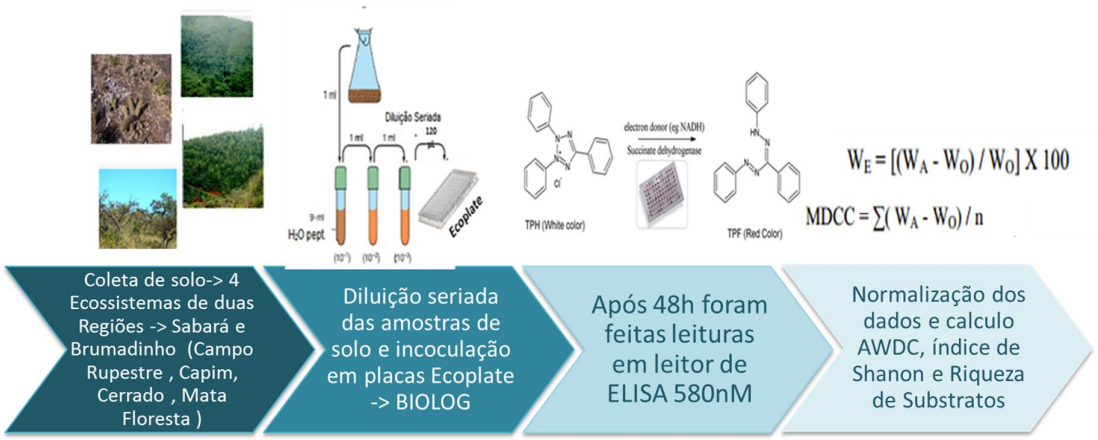

Figura 1: Fluxograma metodológico

2.1. Regiões de Estudo e Coleta das amostras de solo

A região de estudo, consiste em uma área de preservação ambiental mantida pela VALE S.A., conhecido como Centro de Conservação e Pesquisa em Biodiversidade (CEBIO), localizado na região de Sabará, MG, Brasil. Esta região ficou conhecida historicamente pela descoberta e exploração de minerais como ouro, esmeralda, diamante e outros, tornando-a nesse período, um dos importantes polos comerciais desses produtos. Posteriormente, esta área foi afetada por constantes extrações dos minerais e pela prática agrícola. O centro de Biodiversidade - CEBIO é comporto por quatro ecossistema distintos sendo eles: Campo Rupestre, Floresta Mata Atlântica, Cerrado e Campo de Gramíneas, região esta onde se armazenava as escórias da mineração. Amostras de solo também foram coletadas no município de Brumadinho na região Belo Horizonte (MG) localizada na Via do Minério; na Região de Brumadinho localiza-se o Centro de Tecnologia de Ferrosos (CTF) – Vale Miguelão, este centro de pesquisa também abrange quatro ecossistemas semelhantes ao Centro de Biodiversidade CEBIO, sendo Campo Rupestre, Floresta Mata Atlântica, Cerrado e Campo de Gramíneas, onde está última sofreu uma queimada por duas vezes em períodos desconhecidos.

A região apresenta um clima tipicamente tropical, definido por um pequeno período seco (4 a 5 meses) e outro úmido bem acentuado, marcado por chuvas concentradas na estação quente (verão). Regionalmente, o solo dominante da

área em estudo pertence à classe Latossolo Vermelho-Amarelo, quase sempre associado ao Argissolo Vermelho-Amarelo, ambos de caráter distrófico, o que determina o predomínio da Floresta Estacional da região (Mata Atlântica) e outros quatro ecossistemas.

A coleta dos solos foi realizada no período considerado de seca, setembro de 2013 para as amostras do CEBIO e setembro de 2015 para as amostras do CTF. As amostras eram relacionadas a quatro diferentes ecossistemas de solo: 1) Mata de Floresta Atlântica (MF); 2) Solo de Capim (CP); 3) Cerrado (CE) e 4) Canga (CG). A amostragem foi realizada em quadruplicada segundo as coordenadas do GPS (Tabela1) com auxílio de trado de 10 polegadas de diâmetro e comprimento de 20 centímetros, realizando uma assepsia para o início das coletas nos diferentes solos. Para cada réplica de solo, foram realizadas 12 extrações de 0-20 cm, as quais foram reunidas em uma amostra composta.

Tabela 1: Coordenadas dos pontos de coletas das amostras de Sabará e Brumadinho realizadas pelo aparelho GPS da marCP Garmin, modelo 62sc sendo os pontos apresentam as seguintes coordenadas em UTM.

	Sabará		Brumadinho	
Amostras de solo	**Latitude**	**Longitude**	**Latitude**	**Longitude**
Mata Floresta 1	19°51'41.41"S	43°48'7.90"O	23k0608966	7775499
Mata Floresta 7	19°51'44.60"S	43°48'6.81"O	23k0609021	7775546
Mata Floresta 8	19°51'40.38"S	43°48'4.76"O	23k0609069	7775597
Mata Floresta 9	19°51'43.56"S	43°48'3.57"O	23k0609120	7775644
Mata Eucalipto 1	19°51'40.35"S	43°48'26.58"O	23k0609180	7775695
Mata Eucalipto 2	19°51'36.27"S	43°48'24.25"O	23k0589207	7770466
Mata Eucalipto 3	19°51'39.32"S	43°48'23.29"O	23k0589187	7770512
Mata Eucalipto 4	19°51'38.30"S	43°48'20.07"O	23k0589157	7770543
Cerrado 1	19°51'48.47"S	43°48'20.08"O	23k0589101	7770558
Cerrado 2	19°51'45.42"S	43°48'21.12"O	23k0589050	7770587
Cerrado 3	19°51'42.38"S	43°48'22.18"O	23k0588670	7770620
Cerrado 4	19°51'41.45"S	43°48'18.92"O	23k0588753	7770620
Capim 2	19°51'40.56"S	43°47'53.75"O	23k0588790	7770643
Capim 3	19°51'39.62"S	43°47'50.61"O	23k0588823	7770663
Capim 4	19°51'38.59"S	43°47'47.36"O	23k0588846	7770693
Capim 5	19°51'37.58"S	43°47'44.11"O	23k0608960	7775829
Canga 1	19°50'2.06"S	43°44'7.40"O	23k0609021	7775862
Canga 2	19°50'5.13"S	43°44'6.35"O	23k0609087	7775889
Canga 4	19°50'1.11"S	43°44'4.15"O	23k0609148	7775896
Canga 6	19°50'7.25"S	43°44'1.99"O	23k0609195	7775946

2.2. Análise da atividade Metabólica Microbiana

A análise de atividade metabólica microbiana de solos dos quatro ecossistemas do quadrilátero ferrífero, foi avaliado usando Biolog Ecoplate (URAKAWA et al., 2013). Alíquotas de 2,5 g de solo dos quatro pontos coletados foram misturadas

totalizando 10 g e posteriormente foi adicionada à 190 mL de solução salina 0,85%, sendo colocada em agitador orbital por 30 min, 200 ×g, a 30°C. Posteriormente foi realizado uma diluição seriada e 120 µL da diluição 10^{-3} foram adicionados às microplacas Biolog Ecoplates (Biolog Inc. Harward, California) (URAKAWA et al., 2013). Para cada amostra foi utilizada uma microplaca Biolog contendo 31 fontes de carbono (Tabela 2), em triplicata, e 1 cavidade sem nenhuma fonte de carbono, (controle negativo), além de corante indicador tetrazólio violeta. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

Tabela 2 : Fontes de carbono das microplacas Biolog Ecoplate.

Substratos	***Fonte de carbono***	***Substratos***	***Fonte de carbono***
Polímeros	Glicogênio	**Aminoácidos**	L-serina
	α-ciclodextrina		L-fenilalanina
	Tween 40		L-arginina
	Tween 80		L-treonina
Carboidratos	D-celobiose		L-asparagina
	β-metil-D-glicosídeo		Ácido glicil-L-glutâmico
	N-acetil-D-glicosamina		
	i-Eritritol		
	D-xilose	**Amina/Amida**	Fenilalanina
	Ácido-D-galacturônico		Putrescina
	α-D-lactose		
	D-manitol		
Ácido carboxílico	Ácido γ-hidroxibutírico	**Carboidratos**	D,L-α-glicerolfosfato
	Ácido D-glicosamínico		Glicose-1-fosfato
	Éster Metílico do ac pirúvico		
	Ácido Itacônico		
	Ácido-D-galacturônico	**Fenólico**	Ácido-2-Hidroxibenzóico
	Ácido α-cetobutírico		Ácido 4-Hidroxibenzóico
	Ácido D-málico		

O crescimento microbiano em cada poço foi avaliado pelo aumento da, densidade óptica DO 580 nm, com um leitor de ELISA, por um período de cinco dias. A capacidade de utilizar uma fonte de Carbono foi determinada conforme

Ibekwe & Kennedy (2010) pela avaliação do potencial redox da redução do corante tetrazólio. Os valores de absorbância foram subtraídos do branco e normalizados segundo WEBER (2014), posteriormente foi realizado uma mediana dos valores das leituras dos diferentes tempos, devido à característica de que cada enzima apresenta uma cinética diferente para degradação de substratos. Para as análises de degradação de fontes de carbono, análise de componentes principais (PCA), agrupamento hierárquico, e cálculos de índices de diversidade através do desenvolvimento médio de cor (AWDC) por Shannon e riqueza de substratos foram realizados no tempo de 120h de cultivo (Tabela 3).

Tabela 3: Fórmulas para cálculos dos índices de diversidade funcional Shannon (E), Ritches e Desenvolvimento de cor médio.

Índice	Definição	Formula	Definição
Desenvolvimento de cor		$AWCD=\Sigma OD_{pi}/31$	pi= desenvolvimento da cor proporcional a cor do mais intenso do total de cavidades de uma placa
Shannon diversity	Riqueza	$H=-\Sigma pi(lnpi)$	H= Índice de diversidade de Shannon
Shannon evenness	Evenness calculado índice de Shannon	$E=H/lnS$	S= Riqueza de substratos utilizados

2.3. Análise Estatística

Os índices de desenvolvimento médio de cor (AWDC), Shannon, bem como a riqueza de substratos foram investigados por meio de análise de variância (ANOVA). O agrupamento hierárquico foi utilizado para avaliar os substratos que foram mais utilizados em cada amostra e avaliar a correlação entre os quatro ecossistemas. Os dados para índices de desenvolvimento médio de cor foram normalizados e todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R, versão 3.1 e PAST 3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) .

3. RESULTADO

Análises do perfil metabólico microbiano consiste em uma forma de avaliar de maneira quantitativa e qualitativa a atividade metabólica da comunidade microbiana conforme se observa pelos. Nos resultados de Biolog EcoPlates, a utilização de substratos, mostrou que há um aumento exponencial da atividade metabólica ao longo do tempo, evidenciando um aumento potencial das atividades metabólicas para os diferentes ecossistemas, bem como as diferentes regiões do perímetro do quadrilátero ferrífero (Figura 2).

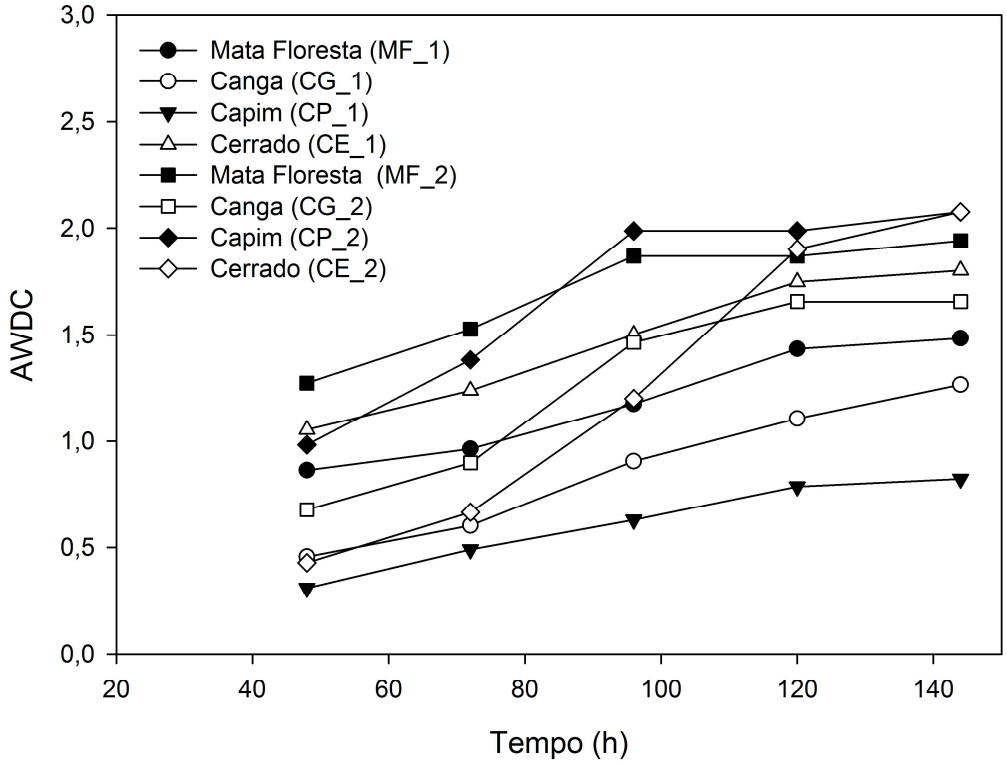

Figura 2: Absorção de tetrazólio ao longo do tempo com base no índice de desenvolvimento médio de cor (AWDC) para as duas áreas coletadas.

Para comparar a diversidade funcional dos microrganismos metabolizar fontes de carbono, os ecossistemas das diferentes regiões foram observados os valores dos índices de diversidade de Shannon (E), e a riqueza (R), foram obtidos no último tempo de incubação (140h). Na Tabela 4, como pode ser observado não houve diferença significativa, entre os ecossistemas. Os solos

dos ecossistemas da região de Sabará apresentaram maiores valores para os índices de diversidade de Shannon, entretanto os solos da região de Brumadinho apresentaram um valor de Shannon abaixo em relação aos solos da região de Sabará.

Tabela 4: Valores médios dos índices de diversidade funcional Shannon (E) e riqueza de substratos (R) dos quatro ecossistemas após 140 horas de incubação (*Tuckey 0,05%)*.

Índices	Ecossistemas							
	MF_1	MF_2	CE_1	CE_2	CP_1	CP_2	CG_1	CG_2
Shannon's evenness (E)	0,812ab	0,768ab	0,844ab	0,723b	0,814a	0,850a	0,813ab	0,738b
Richness (R)	21ab	25a	20b	24ab	20ab	25a	21ab	24ab

Amostras de Sabará apresentaram maior diversidade funcional enquanto que as comunidades microbianas dos solos de Brumadinho apresentaram maior riqueza, ou seja, uma preferência para uma variedade de compostos da placa. Uma vez que diferenças quanto aos índices recorreu-se ao agrupamento hierárquico (Figura 3), que leva em consideração a mediana dos valores de DO para as diferentes fontes de carbono da placa.

Os solos preservados dos ecossistemas das regiões apresentaram metabolismo para as fontes de carbono semelhantes, agrupando próximo, amostras de solo que sofreram ações antropogênicas como queimada e ação da mineração, nas duas regiões em estudo, Brumadinho e Sabará, se apresentaram bastante diferentes quanto à capacidade de degradar fontes de carbono, em relação aos demais ecossistemas, como pode ser visto no agrupamento hierárquico onde CP_1 apresenta agrupamento distante para CP_2.

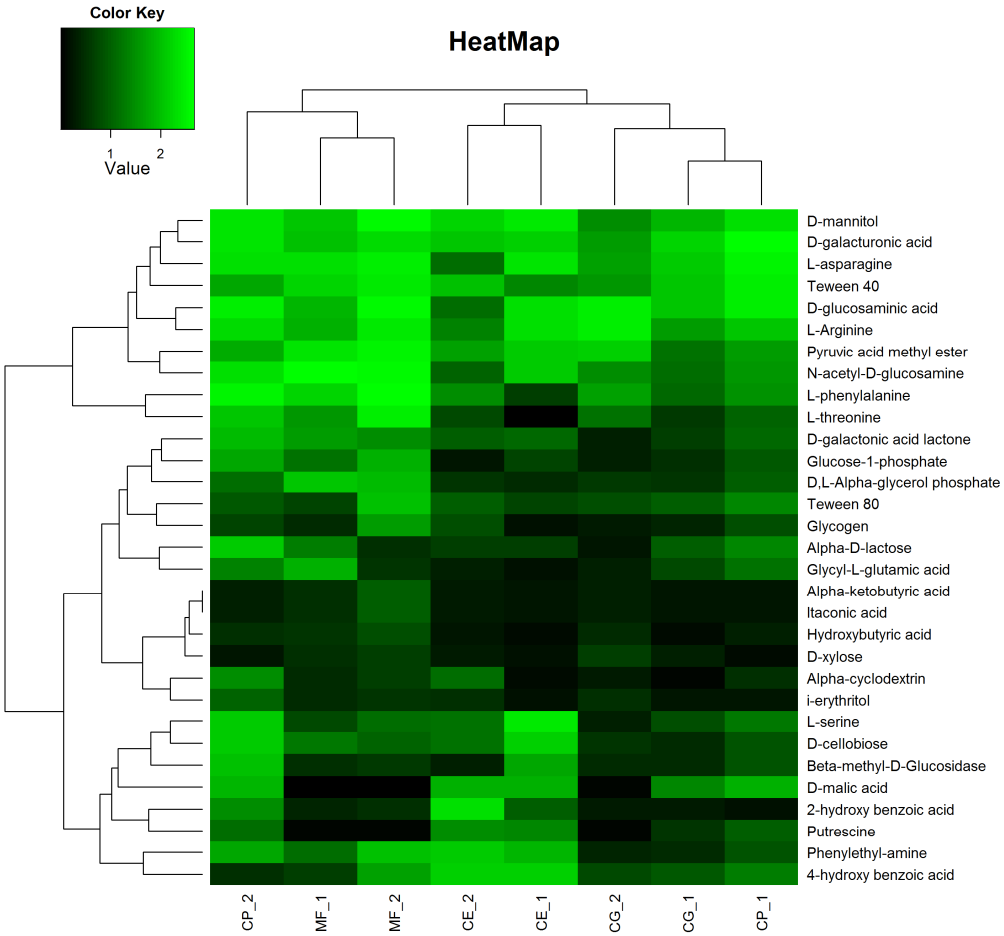

Figura 3: *HeatMap* com os valores normalizados de absorbância agrupados para degradação de fontes de carbono das placas Biolog-Ecoplate para os ecossistemas Capim (CP), Canga (CG), Cerrado (CE) e Floresta (MF) de Sabará e Brumadinho.

Os solos dos diferentes ecossistemas apresentaram preferência para o consumo de fontes de carbono dando destaques para carboidratos, aminas/amidas e compostos fenólicos (Figura 4). Uma outra observação pode ser vista de que os solos da região de Brumadinho apresentam valores maiores para degradação de substratos em relação a Sabará o que corrobora com os valores de riqueza de substratos (Tabela 3).

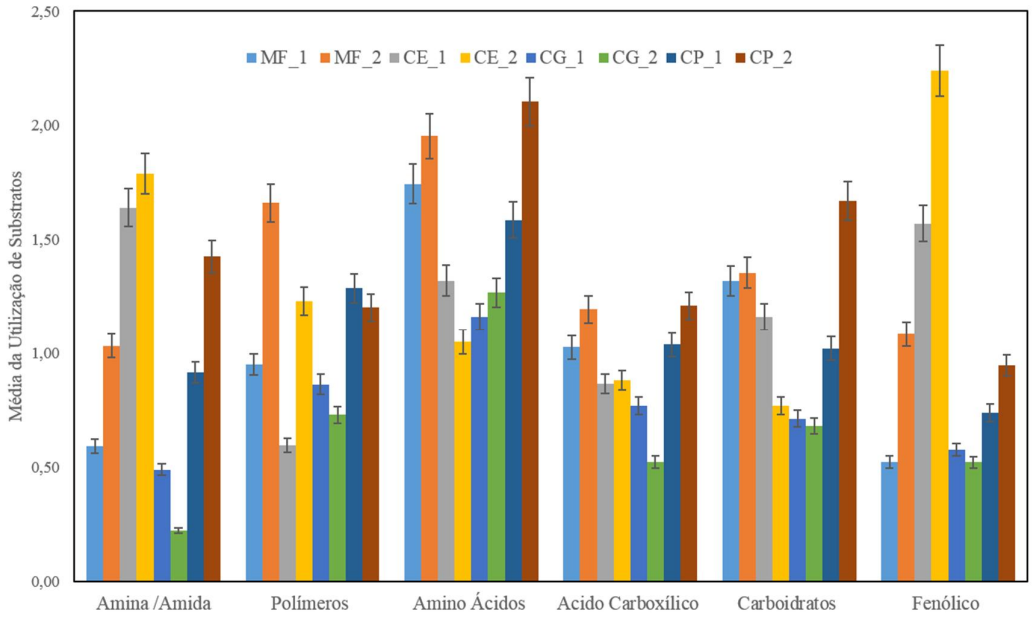

Figura 4: Médiana da utilização de substratos dos ecossistemas da região de Sabará e Brumadinho.

Análise de componentes principais, considerando a degradação de fontes de carbono, apresentaram tendências para consumo das fontes de carbono agrupadas em carboidratos, aminas e amidas, bem como de maneira menos intensa para compostos fenólicos e ácidos carboxílicos (Figura 5). Entretanto para os ecossistemas que sofreram ações de fatores abióticos como queimadas (CP_2) e até mesmo ações de recuperação ambiental, apresentaram maior degradação de fontes de carbono relacionado aos ácidos carboxílicos, aminas/amidas e aminoácidos para o ecossistema localizado em Brumadinho (CP_2) e Sabará (CP_1).

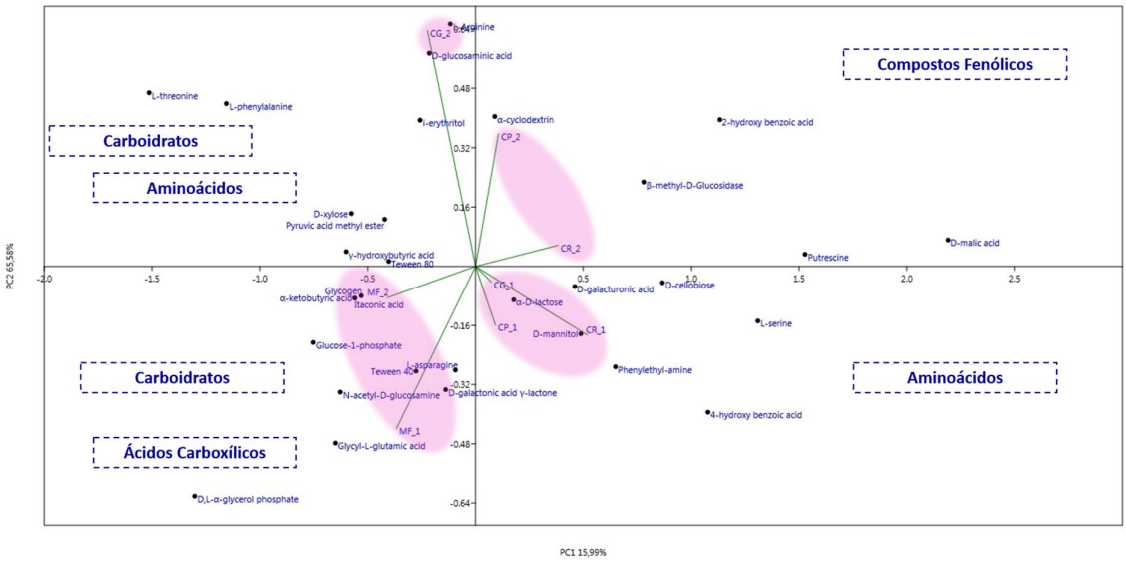

Figura 5: Análise dos componentes principais (PCA) da mediana dos valores de absorbância dos diferentes tempos de quatro ecossistemas em duas coletas sendo: (MF_1) - Mata Floresta, (CP_1) Capim, (CE_1) Cerrado e (CG_1) Canga solos do Centro de Biodiversidade CEBIO – Sabará e (MF_2) - Mata Floresta, (CP_2) Capim, (CE_2) Cerrado e (CG_2) Canga, solos da Centro de Preservação do Miguelão – Brumadinho – MG.

A análise de componentes principais foi possível observar que ecossistemas de CP_2 e CE_2 apresentaram na maioria tendência algumas fontes de carbono do grupo de compostos fenólicos (Figura 5), já microbiota dos ecossistemas CP_1 e CE_1, tendência para uma degradação de aminoácidos bem como CG_2 vale salientar o agrupamento de MF_1 e MF_2 para degradação de ácidos carboxílicos.

4. DISCUSSÃO

Os solos sob *stress* e sua microbiota previamente adaptada surgem como alternativa para estudos de recuperação de áreas por processos de biorremediação e biorremoção de compostos tóxicos liberados no ambiente, uma vez que estes são nocivos a saúde dos organismos vivos (ACID et al.,2000). Atividade dos microrganismos de forma única ou até mesmo combinada

participando da remoção de componentes tóxicos tem sido de grande interesse e amplitude. A placa Biolog Ecoplate foi utilizada para os estudos metabólicos que evidenciaram a atividade funcional de comunidades microbianas do solo (URAKAWA et al., 2013),

A análise da comunidade microbiana tem sido bastante utilizada para estimar as modificações causadas pelos fatores abióticos e estressadas, como metais pesados (CHAZARENC; BRISSON; MERLIN, 2010) ou a contaminação por hidrocarbonetos (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008), alta salinidade, alto pH do solo, ou de aquecimento (CHIEN et al., 2008). O Biolog EcoPlate, normalmente utilizado para comparação da microbiota de ecossistemas quanto a sua capacidade funcional, é uma técnica rápida para avaliar a atividade metabólica em estudos de prospecção de organismos antes mesmo de serem isolados (SZYMAŃSKA; PIERNIK; HRYNKIEWICZ, 2013).

Os valores de AWCD do presente trabalho evidenciaram que apesar das altas concentrações de metais características dos solos das regiões de estudo deste trabalho, a capacidade de degradar fontes de carbono e atividade metabólica não foram afetadas, somente para alguns ecossistemas podendo ser evidências dos fatores abióticos e até mesmos bióticos sobre os ecossistemas (BICKEL; TANG; GROSSART, 2014). O presente estudo evidencia uma forte influência da atividade metabólica nos diferentes ecossistemas, relacionados as diferenças na abundância de micro-organimos observados pelos índices de diversidade e riqueza, sugerindo assim uma possível aplicação em biorremediação de metais, observados pela degradação de Amina/Amida e Aminoácidos (MORETTI et al., 2015; SZYMAŃSKA; PIERNIK; HRYNKIEWICZ, 2013; WEBER et al., 2007) tendo indícios de que a comunidade microbiana da região de Sabará e Brumadinho apresentam solos com altas concentrações de metais e consequentemente uma microbiota com características para sobrevivência na presença de metais e até mesmo aplicado para biorremediação.

Índices como AWCD, H, R, S e nos cálculos com base nos resultados medidos em DO 580nm, são muito úteis para descrever a atividade e a diversidade da população de microrganismos (OSZUST, G,F, 2014). O perfil

metabólico da comunidade microbiana apresentou-se com um bom indicador de que os fatores abióticos e bióticos interferem de maneira suave na comunidade microbiana além de que os mesmos fatores que afetam refletem de maneira positiva para seleção de microambientes adaptados e que este pode ser utilizadas no processo de recuperação de áreas, visto a amplitude de substratos degradados na placa Biolog Ecoplate, bem como os altos valores dos índices de diversidade. Além disso, o cálculo do índice de riqueza também é sensível o suficiente para avaliar a comunidade microbiana. Alto valor do índice de riqueza indica um elevado número de substratos oxidados de carbono. A atividade de microrganismos em solos contaminados sob *stress* demonstra uma grande quantidade de microrganismos adaptados metabolicamente para uma possível aplicação para remoção de metais entre outros componentes (FERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2015).

5. CONCLUSÃO

Análises Biolog Ecoplate revelam que a microbiota das regiões de preservação mantidas pela Vale/SA, tem boa atividade metabólica sendo um indicativo importante para a saúde de ecossistemas, uma vez que esta tecnologia tem como objetivo central avaliar a saúde de ecossistemas que sofreram ação de fatores bióticos ou abióticos. Conclui-se que ecossistemas como mata floresta, capim, canga e cerrado de dois municípios importantes para a mineração no estado de Minas Gerais apresentaram microbiota semelhante quanto a preferência por compostos distribuídos pela placa, entretanto solos afetados pela ação da mineração e queimada apresentaram maior atividade metabólica bem como maior diversidade de compostos isto se deve possível manutenção da estabilidade da diversidade afetada pela atividade antropogênica, vale salientar que os microrganismos apresentam alta degradassão de aminoácidos sendo um indicativo para uma possível aplicação em biorremediação. As Biolog Ecoplate surgem como uma alternativa eficiente para entender as interações microbianas relacionando de maneira direta com manutenção da saúde dos ecossistemas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCESS, O. Biodegradation. v. 5, n. 3, p. 8–10, 2014.

ACID, B. et al. Microbial Community Analysis Microbial Community Analysis. p. 1–2, [s.d.].

ALEX, M. et al. O quadrilátero ferrífero e o norte de minas gerais: análise da história e importância econômica. p. 1–16, 2012.

ALTIMIRA, F. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC microbiology**, v. 12, p. 193, jan. 2012.

AMBIENTAL, T. et al. USO DE MICROORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS. n. 6, p. 995–1006, 2012.

ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biolixiviação: Utilização de Micro-organismos na Extração de Metais**. [s.l: s.n.].

ARORA, P. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, V. P. Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in Burkholderia sp. RKJ 800. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 3, p. 2298–304, fev. 2014.

AURÉLIO, M.; PINHO, C. DE; FILHO, P. Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado. p. 28, 2010.

BAI, J. et al. Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by Bacillus subtilis DBM in a multi-metal-contaminated soil. **Journal of environmental sciences (China)**, v. 26, n. 10, p. 2056–64, 1 out. 2014.

BALDRIAN, P. et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME journal**, v. 6, n. 2, p. 248–58, fev. 2012.

BICKEL, S.; TANG, K.; GROSSART, H. Structure and function of zooplankton-associated bacterial communities in a temperate estuary change more with time than with zooplankton species. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 72, n. 1, p. 1–15, 7 mar. 2014.

BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. TtMCO: A highly thermostable laccase-like multicopper oxidase from the thermophilic Thermobaculum terrenum. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 59–65, 2015.

CAMPBELL, C. D.; GRAYSTON, S. J.; HIRST, D. J. Methods Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. v. 30, p. 33–41, 1997.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura - pecuária sob intensidades de pastejo. n. 1, p. 1254–1261, 2011.

CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; MERLIN, G. Seasonal and Spatial Changes of Microorganism Communities in Constructed Wetlands: A Community Level Physiological Profiling Analysis. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

CHEN, S. et al. Influence of co-existed benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of Stenotrophomonas maltophilia during biodegradation and transformation. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 181–187, 2014.

CHIEN, C. et al. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 359–363, jan. 2008.

COSTA, P. S. et al. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119465, jan. 2015.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – An overview. v. 7, n. April, p. 159–169, 2008a.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008b.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1229–34, jul. 2008.

DE, N. Ufop – cetec – uemg. 2006.

FERNÁNDEZ-MONTIEL, I. et al. Short-term effects of simulated below-ground carbon dioxide leakage on a soil microbial community. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 36, p. 51–59, 2015.

FINN, R. D. et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 222–230, 2014.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource technology**, v. 160, p. 3–14, maio 2014.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271–279, 2000.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource technology**, v. 97, n. 13, p. 1484–9, set. 2006.

GRYTA, A.; FRĄC, M.; OSZUST, K. The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9–18, 2001.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. August 2006, p. 481–483, 2008.

HUNTER, S. et al. EBI metagenomics - A new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 600–606, 2014.

INÁCIO, L.; ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Presente**. [s.l: s.n.].

ISLAM, F. S. et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 68–71, 1 jul. 2004.

KANG, C.-H. et al. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. **Ecological Engineering**, v. 74, p. 402–407, jan. 2015.

KLAUS-JOERGER, T. et al. Bacteria as workers in the living factory: Metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2001.

KUMAR, R. et al. Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. v. 12, n. January, p. 115–119, 2013.

KUMARAN, N. S. R. I.; SUNDARAMANICKAM, A.; BRAGADEESWARAN, S. ABSORPTION STUDIES ON HEAVY METALS BY ISOLATED BACTERIAL STRAIN (PSEUDOMONAS Sp .) FROM UPPANAR ESTUARINE WATER , SOUTHEAST COAST OF INDIA. v. 6, n. 4, p. 471–476, 2011.

LASHEEN, M. R.; AMMAR, N. S.; IBRAHIM, H. S. Adsorption/desorption of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) using chemically modified orange peel: Equilibrium and kinetic studies. **Solid State Sciences**, v. 14, n. 2, p. 202–210, 2012.

LI, L.-G. et al. Potentially novel copper resistance genes in copper-enriched activated sludge revealed by metagenomic analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10255–66, dez. 2014.

LIU, X. et al. TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 271, 2008.

LIU, X. et al. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: A multi-medium analysis. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 530–540, 2013.

MAHRAJBNE, C.; MAHRAGBNE, C. RESISTANCE OF E N V I R O N M E N T A l . BACTERIA TO H E A V Y METALS. v. 64, p. 7–15, 1998.

MAIA, V. O. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS BANCO DE SEMENTES DO SOLO EM ÁREAS DE MINERAÇÃO E. 2014.

MARGESIN, R.; PŁAZA, G. A.; KASENBACHER, S. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1583–1588, 2011.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 208–IN1, 1961.

MÉNDEZ-GARCÍA, C. et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May, p. 1–17, 2015.

MORETTI, G. et al. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. **Annals of Microbiology**, 2015.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12 : Human Microbiome Analysis. v. 8, n. 12, 2012.

MYROLD, D. D.; ZEGLIN, L. H.; JANSSON, J. K. The Potential of Metagenomic Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 78, n. 1, p. 3, 2014.

NGUYEN, V. H.; SHIM, J.-J. Three-dimensional nickel foam/graphene/NiCo2O4 as high-performance electrodes for supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 273, p. 110–117, 2015.

ONLINE, V. A. Environmental Science Processes & Impacts bioremediation-based abolition of heavy metals. p. 180–193, 2014.

PANICKER, V. P.; GOPALAKRISHNAN, A. Mini Review Article Metagenomics : a Novel Tool to Unravel the Secrets of Nature. v. 2, n. 6, p. 312–315, 2014.

PERSPECTIVES, C.; MICROBIOLOGY, A. Vigna mungo. v. 1, n. 2, p. 1–10, 2012.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium. **Journal of microbiological methods**, v. 97, p. 20–4, fev. 2014.

POWELL, S. et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D231–D239, 2014.

RELACIONADOS, A. et al. O QUADRILÁTERO FERRÍFERO - MG , BRASIL : ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA , SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS. v. 18, n. 1, p. 33–37, 2010.

REZENDE, É. A.; AUGUSTO, A.; SALGADO, R. MAPEAMENTO DE UNIDADES DE RELEVO NA MÉDIA SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL - MG. p. 45–60, 2011.

SCHLOTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. . Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255–262, set. 2003.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions - A review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 9–19, 1996.

STUDIES, I.; AUTHOR, C. HEAVY METAL TOLERANCE OF THREE DIFFERENT BACTERIA ISOLATED FROM. v. 2, n. 2, p. 137–147, 2013.

SZYMAŃSKA, S.; PIERNIK, A.; HRYNKIEWICZ, K. Metabolic potential of microorganisms associated with the halophyte Aster tripolium L. in saline soils. **Ecological Questions**, v. 18, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2013.

TARTAGLIA, M. et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 75–79, 2007.

THIJS, S. et al. Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: isolation and characterization of a military soil. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 294–306, 2014.

TSEZOS, M. Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 241–243, fev. 2001.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–622, 2009.

URAKAWA, H. et al. Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. **ISRN Oceanography**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

VARAJAO, S. A. R. A. C. A QUESTÃO DA CORRELAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE EROSÃO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO , MINAS GERAIS. v. 21, n. 2, p. 138–145, 1991.

VELA-CANO, M.; CASTELLANO-HINOJOSA, A.; VIVAS, A. F. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. n. August, p. 644–655, 2014.

WANI, P. A.; AYOOLA, O. H. Bioreduction of Cr (VI) by Heavy Metal Resistant Pseudomonas Species. n. Vi, p. 1–9, 2015.

WEBER, K. P. et al. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 3, p. 461–9, jun. 2007.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 697–703, 1991.

WHITE, C.; SAYER, J. A; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 503–16, jul. 1997.

XIA, X. et al. On the role of surface diffusion in determining the shape or morphology of noble-metal nanocrystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6669–73, 2013.

ZOU, R. et al. Three-dimensional networked NiCo 2 O 4 /MnO 2 branched nanowire heterostructure arrays on nickel foam with enhanced supercapacitor performance. **J. Mater. Chem. A**, v. 3, n. 4, p. 1717–1723, 2015.

CAPÍTULO 3- Potencial de tolerância, bioacumulação e biossorção de isolados bacterianos de solos de região de mineração de ferro.

RESUMO- Os impactos ambientais causados por sucessivas extrações de minérios e resíduos tóxicos dessa atividade têm sido foco de preocupação dos ambientalistas. Grandes são esforço gerados para o desenvolvimento de metodologias eficientes e de baixo custo para remoção de metais pesados de solos e águas contaminadas. Os solos da Região de Minas Gerais no Perímetro do Quadrilátero Ferrífero apresentam diferentes ecossistemas como Campo Rupestre (Canga), Campo de Gramíneas (Capim), Mata Floresta, Mata Eucalipto e Cerrado, ambos com altas concentrações de ferro em seu solo com destaque para os solos de Canga e Capim, o que despertou interesse da setor de mineração. Este trabalho teve como objetivo isolar microrganismos, caracterizar e avaliar o potencial para aplicação na biorremediação e bioacumulação de metais como cobre, cromo e níquel. Na caracterização a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foram classificadas em gêneros como, *Burkolderia, Serratia, Bacillus, Stenotrophomonas e Artrobacter,* que apresentam potencial para biorremediação de metais do solo e água**.** Os isolados CP15, CP16, CE11,MF10, ME02 e CR05 apresentaram resistência a quantidades elevadas de metais (500 mg L^{-1}), em processos de remoção de metais em sobrenadante da célula os isolados CP15 e CE11 apresentaram boa capacidade de remover elevadas taxas de metais. Considerando a temática de reduzir, remover e reaproveitar, os microrganismos isolados destas áreas apresentam características e potencial para uma boa aplicação no contexto de biorremediação de metais. No entanto o próprio ambiente sob pressão antropogênica permite o desenvolvimento de mecanismos que possivelmente podem ser utilizados para recuperação do ambiente ,ou seja, a diversidade aplicada para sustentabilidade.

Palavras chave: *Biorremediação, biossorção, imobilização de metais e resistência a metal.*

CHAPTER 3 - Potential tolerance, bioaccumulation and biosorption bacterial isolates of iron mining region soils.

ABSTRACT- The environmental impacts caused by successive extractions of minerals and toxic waste of this activity have been the focus of concern for environmentalists. Great efforts are generated for the development of efficient and cost effective methods for removing heavy metals from contaminated soils and waters. The soils of the region of Minas Gerais in the perimeter of the Iron Quadrangle have different ecosystems as Cave Course (Canga) Grasses Field (grass), Forest Forest, Forest Eucalyptus and Cerrado, both with high concentrations of iron in its soil especially the Canga soil and grass, which aroused the interest of the mining sector. This study aimed to isolate microorganisms, characterize and evaluate the potential for use in bioremediation and bioaccumulation of metals such as copper, chromium and nickel. The characterization from the partial sequencing of the 16S rRNA gene, were classified into genres as Burkolderia, Serratia, Bacillus, Stenotrophomonas and Artrobacter, which have the potential for bioremediation of metals from soil and water. The CP15 isolated, CP16, EC11, MF10, ME02 and CR05 were resistant to high amounts of metal (500 mg L-1) in metal removal processes supernatant of the cell the CP15 and EC11 isolates showed good ability to remove high rates metals. Considering the theme of reduce, remove and reuse, the microorganisms isolated from these areas have characteristics and potential for a good application in the context of bioremediation of metals. However the actual pressure environment from anthropogenic allows the development of mechanisms that can possibly be used for environmental restoration, or diversity applied to sustainability.

Keywords: *bioremediation, bioremediation, immobilization of metals and metal resistance.*

1. INTRODUÇÃO

O grande crescimento populacional culminado com o crescimento industrial tem aumentado a liberação e à acumulação de metais pesados no solo em diversos biomas, como consequência das atividades de mineração, processamento industrial, a utilização de pesticidas e fertilizantes químicos (LIU et al., 2013).

A presença de metais pesados, mesmo em quantidades vestigiais é tóxico e prejudicial para a flora e fauna, tornando-se um grande problema ambiental (GADD, 2000). Processos naturais de remoção de metais, sendo eles por metabolismos bacteriano e em associação com plantas (fitorremediação), tem sido amplamente explorados e estudados (MARGESIN; PŁAZA; KASENBACHER, 2011).

Muitos gêneros bacterianos também encontrados no solo atuam nos processos de biomineração e biorremediação, principalmente os acidófilos com potencial oxirredutor, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus* sp. e *Acidithiobacillus caldus* Além destes, alguns gêneros como *Pseudomonas, Burkolderia, Bacillus e Rhizobium* (WANI; AYOOLA, 2015). Esses microrganismos apresentam metabolismo oxidativo de minerais atuando de maneira importante na biorremediação de cobre, cromo , níquel e zinco (SILVER, 1996).

Considerando a importância dos microrganismos na biorremediação de metais bem como outras aplicações biotecnológicas, os mesmos apresentam um papel significativo nos processos de redução, remoção e reutilização de metais (COSTA et al., 2015). Com isso o objetivo deste trabalho foi caracterizar microrganismos dos diferentes ecossistemas do quadrilátero ferrífero uma das maiores regiões do mundo de mineração, com possível potencial para biorremediação de Cobre bivalente (Cu^{2+}), Cromo hexavalente (Cr^{6+}) e Níquel (Ni^{2+}).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. As técnicas utilizadas neste trabalho não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

2.1. Região de estudo.

A região de estudos consiste em uma área de preservação ambiental mantida pela VALE S.A., conhecido como Centro de Conservação e Pesquisa em Biodiversidade (CEBIO), localizado na região de Sabará, MG, Brasil. Esta região ficou conhecida historicamente pela descoberta e exploração de minerais como ouro, esmeralda, diamante e outros, tornando-a nesse período, um dos importantes polos comerciais desses produtos. Posteriormente, esta área foi afetada por constantes extrações dos minerais e pela prática agrícola.

A região apresenta um clima que se enquadra, tipicamente tropical. Define-se por um pequeno período seco (4 a 5 meses) e outro úmido bem acentuado, marcado por chuvas concentradas na estação quente (verão). Regionalmente, o solo dominante da área em estudo pertence à classe Latossolo Vermelho-Amarelo, quase sempre associado ao Argissolo Vermelho-Amarelo, ambos de caráter distrófico, o que determina o predomínio da Floresta Estacional da região (Mata Atlântica) e outros quatro ecossistemas.

2.2. Coleta de material

A coleta dos solos foi realizada na cidade de Sabará-MG, Brasil em áreas destinadas a preservação sobre a supervisão do Centro de Biodiversidade da Vale (CEBIO). Essas amostras eram relacionadas a cinco diferentes ecossistemas de solo: 1) solo de Mata de Floresta Atlântica (MF); 2) solo de Mata de Eucalipto (ME); 3) solo de Capim (CP); 4) solo de Cerrado (CE) e 5) solo de Canga (CG). A amostragem foi realizada em quadruplicada com auxílio de trado

de 10 polegadas de diâmetro e comprimento de 20 centímetros, o qual foi esterilizado para o início das coletas nos diferentes solos (Figura 1). Para cada replica de solo, foram realizadas 12 extrações de 0-20cm, as quais foram reunidas em uma amostra composta.

Figura 1: Imagem das coordenadas geográficas dos locais amostrados recuperada com *Google Earth*. Estas áreas de coletas estão localizadas em Sabará-MG no Centro de Biodiversidade da Vale.

2.3. Isolamento e caracterização de culturas bacterianas

Considerando as características dos solos dos ecosssitemas do Centro de Diversidade (CEBIO) foram realizados isolamento de microrganismos visando a busca de isolados com potencial para biorremediação de metais. Alíquotas de 2,5g de solo dos quatro pontos coletados, dos diferentes ecossistemas, foram misturadas totalizando 10 g e posteriormente foram adicionadas à 190 mL de solução salina 0,85 % e colocada em agitador orbital por 30 min, 200 *xg* 30 °C. Posteriormente foram feitas diluições seriadas até 10^{-4} sendo transferido 100 µL da diluição 10^{-3} em placas de petri contendo meio sólido PGE (PERSPECTIVES; MICROBIOLOGY, 2012) com ciclohexamida 25 mg L^{-1}. Após 24 h, as colônias com aparência morfológica diferente foram coletadas e adicionadas em PGE líquido. Após o mesmo tempo de 24 h de desenvolvimento, as colônias foram coletadas e adicionadas em tubos SIGMA contendo 5mL de meio PGE e colocadas em agitador orbital por 24 h, 200 *xg* 30 °C. Posteriormente, alíquotas de 100 µL desta cultura foram adicionados em placas contendo meio PGE e

oram feitas colônias isoladas para avaliar pureza e a seguir feito solução estoque destas amostras seguindo a denominação Canga “CG”, Capim “CP”, Mata Eucalipto “ME”, Mata Floresta “MF” e Cerrado “CE”.

Os isolados foram cultivados em meio de cultivo PGE durante dois dias, sob agitação de 100 *xg*, 28 ºC. A suspenção bacteriana foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado foi utilizado para a extração de DNA genômico (MARMUR, 1961).

DNAs dos isolados foram extraídos segundo Marmur (1961), quantificados e posteriormente foram amplificados com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16SrRNA bacteriano pela reação contendo tampão PCR 1X (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl), 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, Taq DNA polimerase (Fermentas) e água ultra pura para completar um volume final de 20 µL. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por Weisburg (1991) (WEISBURG et al., 1991) fD1 (5’-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G – 3’) e o rD1 (5’-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC -3’). As amostras foram amplificadas em um termociclador (Eppendorf) seguindo o programa: 95 ºC, por 1 minuto; 39 ciclos de 95 ºC por 2 minutos, 36 ºC por 1 minuto, 7 2ºC por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72 ºC. As amostras foram posteriormente purificadas e submetidas ao sequenciamento para caracterização. As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas, no sequenciador 3100 (- Applied Biosystems), utilizando-se o volume final de 10 µL contendo: 1,0 µL de BigDye (ABI PRISM Big Dye Terminator kit - Applied Biosystems, EUA); 4,0 µL de tampão SaveMoney (200 mM Tris-HCl (pH 9,0); 5 mM $MgCl_2$) ; 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador FD1 ou RD1 e 2,0 µL do produto amplificado com FD1 e RD1 .

2.4. Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa “Phred/Phrap/Consed” (TARTAGLIA et al., 2007) com nível de exigência mínima de 400 bases com qualidade Phred acima de 20. As sequências foram

submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências do banco de dados do 'Ribosomal Database Project' (RDP) pela ferramenta 'Classifier' com Confidence threshold de 95 % .

2.5. Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi realizada em triplicata, a partir do preparo de um pré-inóculo inicial de cada um dos isolados. Para a redução dos efeitos de possíveis células mortas presentes na cultura, as bactérias cultivadas em PGE foram recuperadas durante a fase exponencial de crescimento, 5 dias após cultivo em placas de petri contendo meio PGE, através da transferência de uma massa bacteriana com auxílio da alça de Drigalsky. Uma massa bacteriana de 3 placas de cultivo foi diluída em 5mL de água milli-Ro estéril. A turbidez do "pré-inóculo" foi registrada através da leitura da absorbância em DO_{600nm} em espectrofotômetro Eppendorf. O pré-inóculo contendo uma DO_{600nm} de 0,6 foi adicionado em um erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura PGE e PGE suplementado com $Cu^{2+,}$ Cr^{6+} e Ni^{2+} de 300 mg L^{-1}de concentração inicial. Após o preparo das culturas bacterianas, os frascos foram mantidos sob agitação constante, em um agitador orbital a 140 x g por 192 h a 28 °C. O crescimento celular foi avaliado através da leitura de absorbância do meio de cultura nos momentos logo após a inoculação e a cada 12 horas de cultivo de bactérias. Os resultados foram tabulados e plotados em forma de gráficos com o software SIGMA plot.

2.6. Seleção de isolados e desafio de resistência a metais.

Com o objetivo de selecionar microrganismos que apresentassem resistência a metais cobre (Cu^{2+}), cromo (Cr^{6+}) e níquel (Ni^{+2}) foi realizado um *screening* dos isolados. Todos os isolados foram incialmente acrescidos em 5ml de meio PGE em tubos tipo sigmaware (Sigma CAT Nº 5916) por 48 h a 28°C, posteriormente 100 µL foi adicionado em 5 mL de meio PGE suplementado com os metais a 50mg L^{-1} e após 48 h de cultivo foram feitas leituras em espectrofotômetro Eppendorf (DO_{600nm}). Posteriormente os isolados que apresentaram DO_{600nm} entre 0,6 e 1 foram adicionados 10 µL em placas de petri contento meio PGE com cobre, cromo e níquel em uma concentração de 50 mg L^{-1}, os isolados que

apresentaram colônias após 48 h foram considerados positivos, no entanto, foi selecionado isolados que apresentaram colônia para os três metais. Os dados foram plotados em tabelas sendo positivo para presença de colônia e negativo para ausência.

Visando conhecer a toxicidade e a resistência dos metais cobre (Cu^{2+}), cromo (Cr^{6+}) e níquel (Ni^{+2}) para os isolados dos diferentes ecossistemas foram realizados testes para verificar a concentração em diferentes tipos de metais. Para isto, foram preparadas soluções estoque na concentração de 1,0 M de $CuSO_4.5H_2O$ e $K_2Cr_2O_7$. As soluções estoques foram preparados com água deionizada e esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm. durante 15 min. Os isolados foram incubados em 50 mL de meio líquido PGE à 28 °C e 150 ×*g*. Alíquotas das culturas correspondentes a 10% (v/v) foram transferidas para os tubos de vidro sigmaware (Sigma CAT Nº 5916), contendo 5,0 mL do meio líquido PGE adicionados dos metais pesados (Cu^{2+}, Cr^{6+} e Ni^{2+}), separadamente, em diferentes concentrações de 100, 150, 250 e 500 mg L^{-1}, seguindo como base concentrações adotadas na literatura (LASHEEN; AMMAR; IBRAHIM, 2012; XIA et al., 2013). Após o cultivo dos isolados em meio líquido, alíquota de 100 µL foi transferida para placas de Petri contendo meio PGE sólido com a respectiva concentração do metal.

2.7. Biorremoção e biossorção de metais

Para os ensaios de biorremoção os isolados selecionados como resistente a maior concentração de metal dos testes de concentrações mínima inibitória, 500 mg L^{-1} foram acrescidos em meio PGE suplementado com metais por uma concentração inicial de Cu^{2+} , Cr^{6+} e Ni^{2+} de 500 mg L^{-1}. Após 48 h, 96 h, 144 h e 192 h de cultivo as amostras foram centrifugadas a 12.000 *xg*, e as células foram lavadas e submetidas a digestão nitroperclórica, diluindo a digestão em 5x. Os íons residuais de Cu^{2+} , Cr^{6+} e Ni^{2+} no sobrenadante foram medidos por um espectrofotómetro de absorção atômica-AAS, após centrifugação a 10.000 *xg* durante 10 min.

Análises de biossorção foram constituídas por uma concentração inicial de Cu^{2+} , Cr^{6+} e Ni^{2+} de 500 mg L^{-1} com concentrações de células que variaram

0,1 g L^{-1} de peso seco. O pH foi ajustado para 5,0 para Cu^{2+}, 4,0 para Cr^{6+}e 5,0 para Ni^{2+}, as amostras foram agitadas a 150 × g a 28 °C por 48 h, 96 h, 144 h e 192 h (LASHEEN; AMMAR; IBRAHIM, 2012; XIA et al., 2013). Os íons residuais de Cu, Cr e Ni no sobrenadante foram medidos por um espectrofotômetro de absorção atômica-AAS, após centrifugação a 10.000 × g durante 10 min. Os valores da capacidade de biossorção e taxa de remoção de Cu^{2+},Cr^{6+} e Ni^{2+} foram avaliados da seguinte forma (CHEN et al., 2014).

$$qe = (C0 - Ce)$$

$$Taxa\ de\ Remoção\ (\%) = \frac{(C0 - Ce) * 100}{C0}$$

Onde qe é a capacidade de adsorção dos metais de Cu^{2+} e Cr^{6+} concentração no biossorvente (mg do metal g^{-1} de peso seco de bisorvente); C0 é a concentração inicial de íon metálico (mg L^{-1}), Ce é a concentração residual do metal na solução em equilíbrio com o biossorvente (mg L^{-1}).

2.8. Análise estatística

Os dados obtidos as análises de biossorção e remoção de metais forma analisados pelo Software R, submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre médias de tratamento.

3. RESULTADOS

3.4. Isolamento e seleção de isolados resistentes a metais.

Os solos da região do quadrilátero ferrífero apresentam boa diversidade microbiana. Totalizando 32 isolados, sendo: 08 isolados para Capim (CP), 02 Canga (CG), 03 Mata Eucalipto (ME), 08 Mata Floresta (MF) e 11 Cerrado (CE). Os 32 isolados dos diferentes ecossistemas foram submetidos a *screening* com concentrações vestigiais de metais para avaliar a tolerância destes isolados (Figura 2).

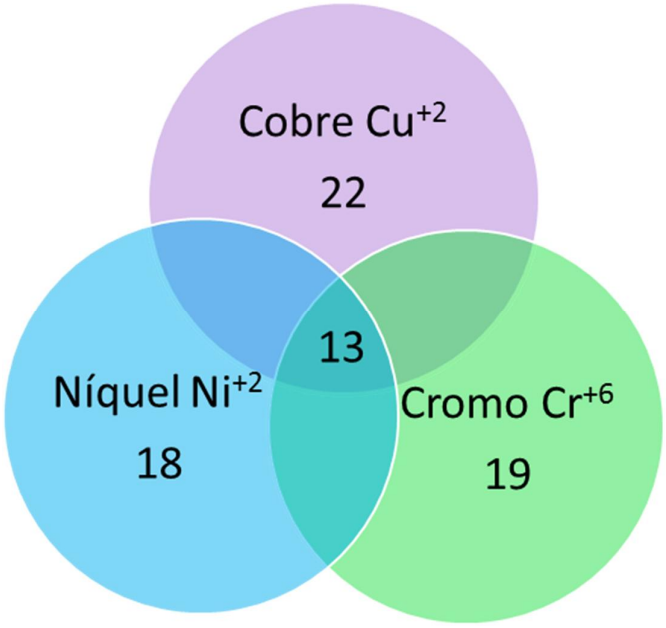

Figura 2: Diagrama de Venn, *screening* de isolados resistentes a metais nas concentrações de 50 mg L^{-1} de Cobre, Cromo e Níquel.

3.5. Desafio de resistência a metais

Microrganismos que se desenvolvem em concentrações de metais mesmo que vestigiais e diferentes metais, tem características susceptíveis para uma possível aplicação em biorremediação. Os 13 isolados que compartilharam resistência aos diferentes metais, cobre, cromo e níquel, foram desafiados a concentrações de 100 a 500 mg L^{-1}. Os resultados dos experimentos de desafio de resitencia a a metais destes isolados revelaram que apenas seis isolados (MF10, CR06, CR11, CP15, CP16 e ME02) apresentaram maior resistência 500mgL^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1: Desafio de resistência para cobre, cromo e níquel em concentrações variáveis de 100 a 500 mgL^{-1} para 13 isolados dos diferentes ecosssitemas Mata Floresta (MF), Cerrado (CE), Capim (CP), Mata Eucalipto (ME) e Canga (CG).

Desafio de Resistência a Metais												
	Cu^{+2} [mg L^{-1}]				Cr^{+3} [mg L^{-1}]				Ni^{+3} [mg L^{-1}]			
Isolados *	**100**	**150**	**250**	**500**	**100**	**150**	**250**	**500**	**100**	**150**	**250**	**500**
CE02	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
MF10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CE04	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
CE05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CE11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CP07	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
CP12	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
CP15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CP16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ME02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CG10	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
MF14	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
MF08	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

* + desenvolvimento bacteriano / - ausência de desenvolvimento bacteriano

3.6. Caracterização dos isolados por sequenciamento do gene 16S rDNA.

Os seis isolados resistentes para concentrações de até 500 mg L^{-1} de Cu^{+2}, Cr^{+3} e Ni^{+3} do ensaio de diferentes concentrações de metal foram selecionados pera amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Analisando o resultado do sequenciamento, averiguando a qualidade dos dados, onde foram cortadas bases com qualidade Phred inferior a 20, estes foram submetidos ao programa *Classifier* do banco RDPII.

Dentre os 6 isolados selecionados quanto a resistência aos metais cobre, cromo e níquel, o isolado CP15 quando analisado pelo *Classifier* mostrou resultado para *Serratia sp.*; o isolado MF10, para o gênero *Stenotrophomonas*, pertencente a classe Gammaproteobacteria. Os isolados ME02 e CP16

apresentou resultado para *Burkulderia sp*, e o isolado CE11 para o gênero *Artrobacter*,

3.7. Curva de crescimento bacteriano

Avaliou se a capacidade de desenvolvimento dos microrganismos nas duas condições de cultivo, considerando que o tempo de desenvolvimento é influenciado de maneira direta pela capacidade nutricional do meio bem, como, as condições físicas de incubação. Todos os isolados selecionados apresentam crescimento rápido, comum início da fase exponencial a aproximadamente 30h para os isolados MF10 e CP15, já para os isolados CE05, CP16 e ME02 esta fase tem início em torno de 18h (Figura 3). O isolado CE11 apresentou crescimento menos exponencial atingindo a fase exponencial próximo a 18h seguido por uma fase exponencial próxima a 48 h semelhante aos demais isolados, enquanto que o isolado CP15 apresentou fase exponencial próximo a 96h, devido ao meio PGE conter grande concentração de glicose que propiciaram bom desenvolvimento para as bactérias de crescimento lento e reduzindo a influência dos metais no desenvolvimento.

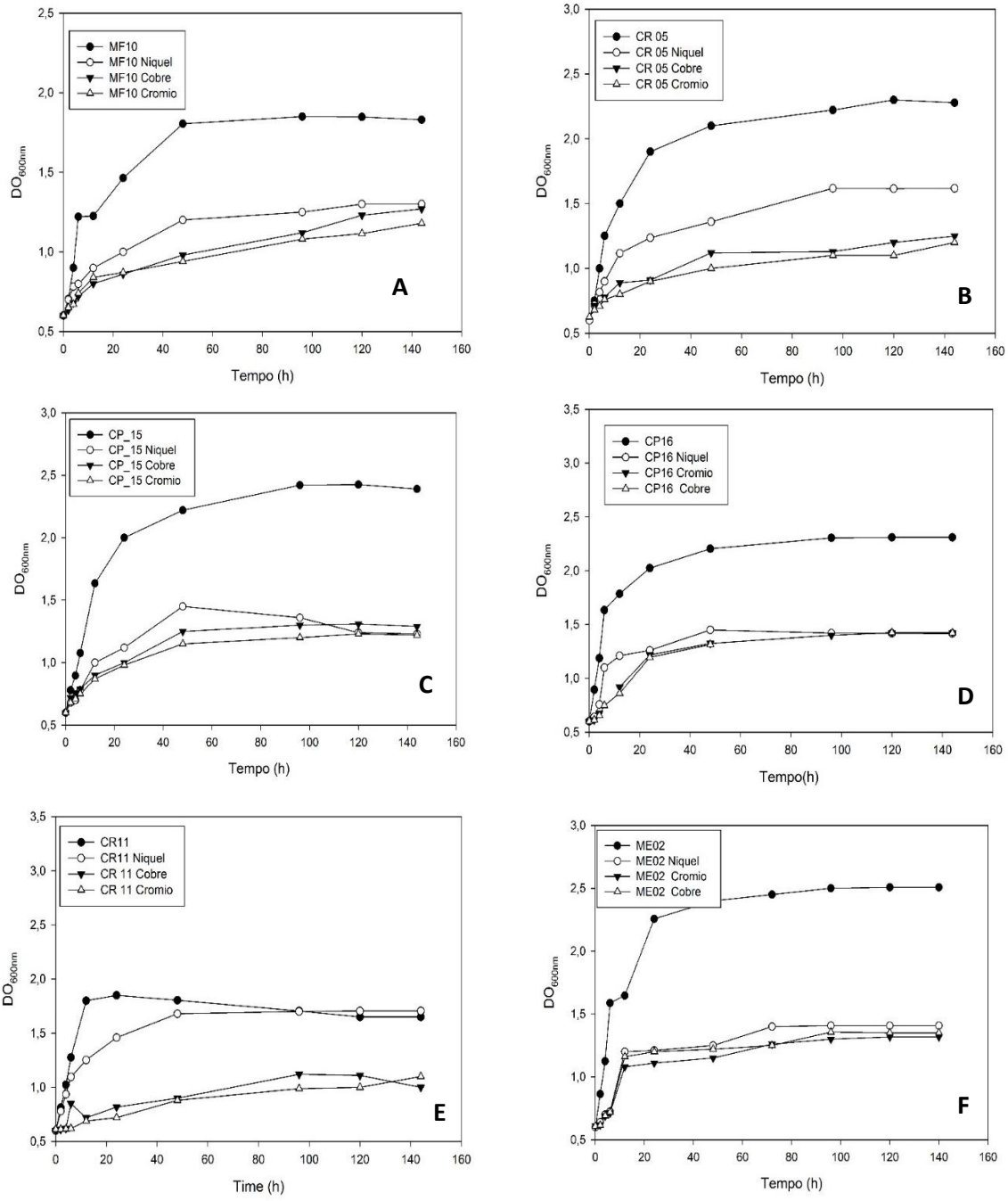

Figura 3: Curva de crescimento dos microrganismos, :(A) MF10, (B) CE05, (C) CP15, (D) CP16, (E) CE11 e (F) ME02, leituras em DO($_{600nm}$) em meios PGE, e meios PGE suplementado com 500 mg L^{-1}Cobre (Cu^{+2}), Cromo (Cr^{+6}), e Níquel (Ni^{+2}) as figuras foram geradas pelo programa *Sigmaplot*.

3.8. Imobilização de Metais

3.8.1. Biossorção de metais

Os seis isolados selecionados para o estudo MF10, CE05, CP15, CP16, CR11 e ME02 apresentaram capacidade de se desenvolver em concentrações consideradas altas (500 mg L^{-1}) sugerindo uma boa aplicação para biorremediação. Em testes de remoção de Cobre através dos 6 isolados expostos a 500 mg L^{-1} , pode se observar que quatro deles (CP16, CR11, ME02 e CR05), apresentaram boa porcentagem de biossorção de metais em tempos iniciais do cultivo (Figura 4), 48 h, 96 h e 144 h, com valores próximos há 96%. Desta maneira sendo bactérias com boa capacidade imobilizar íons metálicos em um pequeno período de tempo. Vale destacar o isolado CP15 que também possui grande potencial de biossorção nos diferentes tempos de exposição até mesmo no tempo 192 h, onde possivelmente deve ter uma saturação de sítios de ligação.

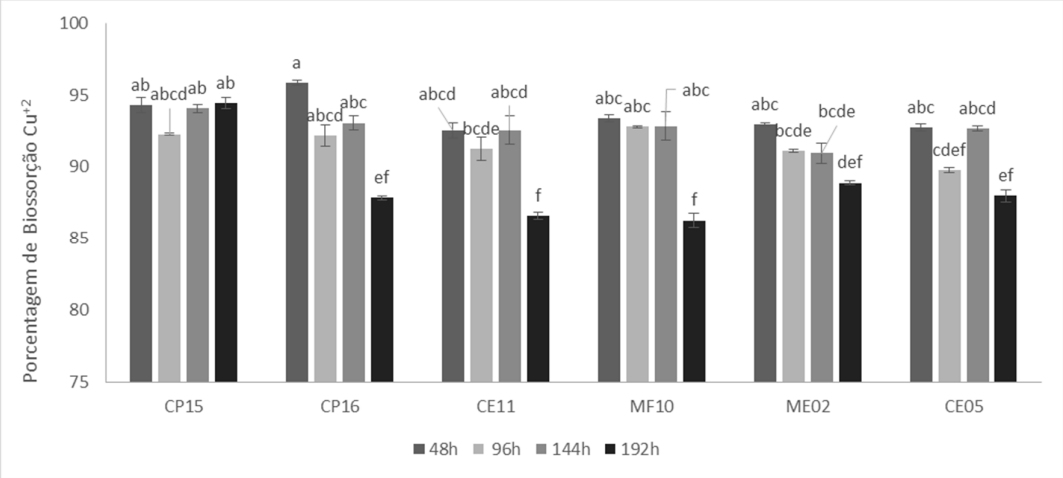

Figura 4: Porcentagem de biossorção de Cu^{2+} em sobrenadante dos cultivos dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h , com análise estatística ANOVA e Tuckey 0,5%.

Microrganismos isolados da região de mineração localizada em Sabará (MG) apresentaram taxas significativas para remoção de níquel (Figura 5). Os isolados CR11, ME02, CR05 e MF10 apresentaram valores próximos de 94% de

remoção de metais em tempos iniciais de desenvolvimento, vale destacar o isolado CP16 que apresentou 96% de taxa de remoção em 48 h de cultivo e valores próximos de 94% nos demais tempos, supondo um processo é rápido e de baixo gasto de energia. O isolado CP15 merece destaque para processos de biossorção de níquel ao londo de todos os tempos de desenvolvimento (Figura 4).

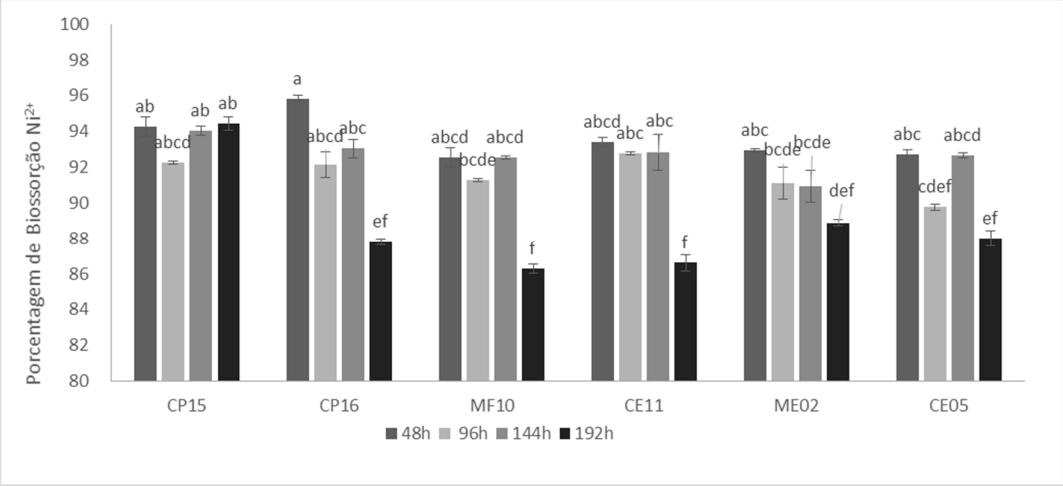

Figura 5: Porcentagem de biossorção de Ni^{2+} em sobrenadante dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h , com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%.*

Os microrganismos isolados e submetidos a testes de remoção de cromo destacaram-se pelos autos valores de remoção de metais em diferentes tempos de desenvolvimento, vale ressaltar a capacidade de remoção dos isolados CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 em tempos iniciais de desenvolvimento no período de 48 há 144 horas, com taxas de remoção próximas a 98%, apesar da boa biossorção este processo não é tão eficiente ao longo do tempo já o isolado CP15 apresenta taxas de 96% em diferentes tempos de desenvolvimento (Figura 6).

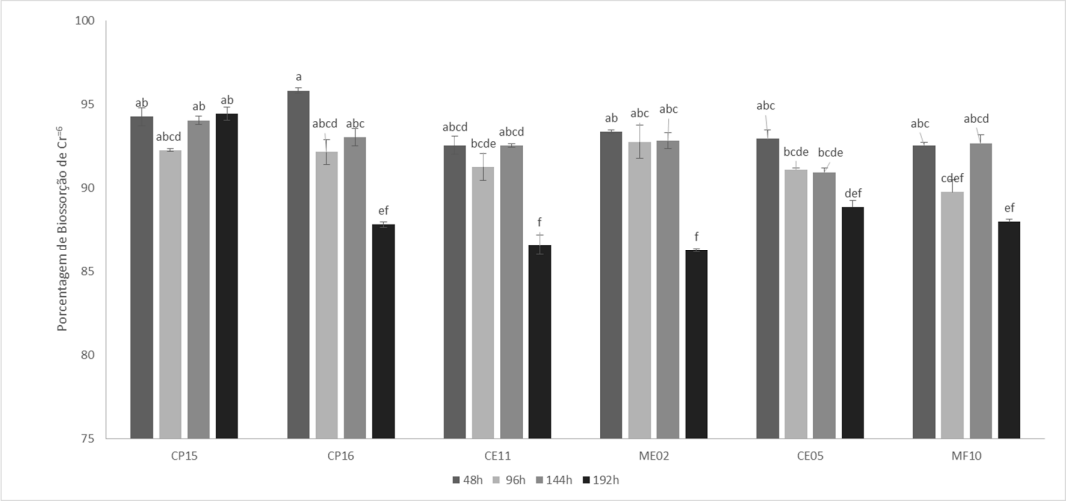

Figura 6: Porcentagem de biossorção de Cr^{6+} em sobrenadante dos cultivos dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 analisados nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h, com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%.*

3.8.2. Acumulação de metais por células

Em análises complementares e comparativas foram feitas análises de remoção ativa, estes ensaios foram feitos á partir de avaliações pelo *pellet* de células. Dentre os seis isolados estudos três deles merecem destaque CE11, CE05 e MF10, que apresentam valores elevados de acumulação de cobre e niquel a 192 h de desenvolviemnto (Figura 7 e 9), estes isolados responderam bem uma vez que este processo é caracterizado por ser lento e dependente do metabolismo. O isolado CP15 apresenta boa acumulação de metais conctante ao longo do tempo de exposição entretando com boa eficiência em tempos menores de exposição.

Os micorganismos apresentaram boas taxasr de bissorção para todoas os metais testatos, entetanto para acumulação os valores foram bem mais baixos uma vez que são processos dependnetes do metabolismo e mais lentos por isso os altos valores nos ultimos tempos de desenvolvimento. Entretanto o CP15 realiza processos ativos e passivos independentes do tempo de exposição sendo uma boa alterantiva pela rapidez com que realiza a remoção de metais.

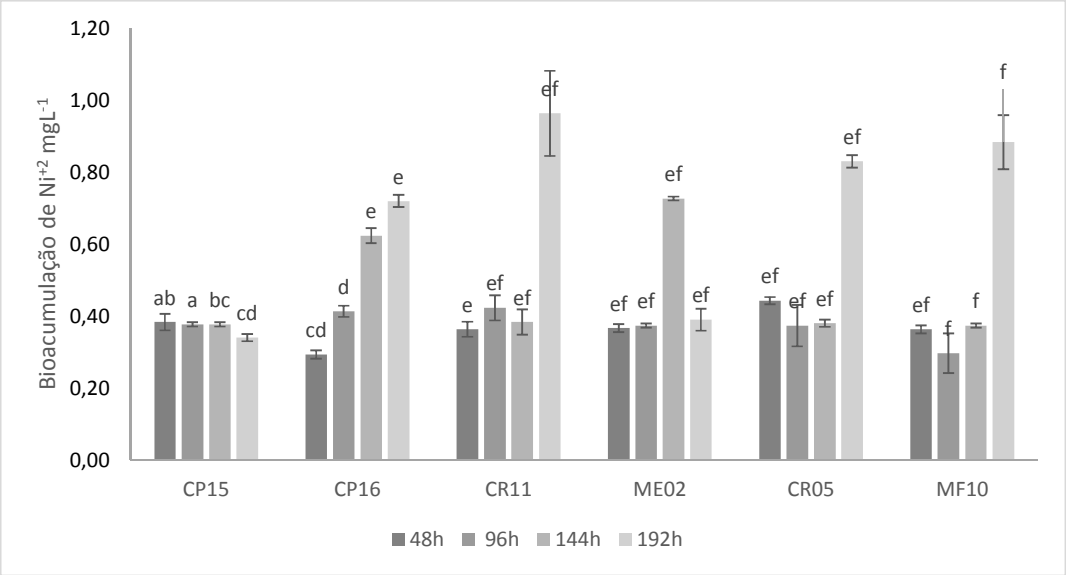

Figura 7: Bioacumulação em células bacterianas cultivados em meios suplementado com 500 mg L^{-1} de Ni^{2+f} para os isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192 , com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%*

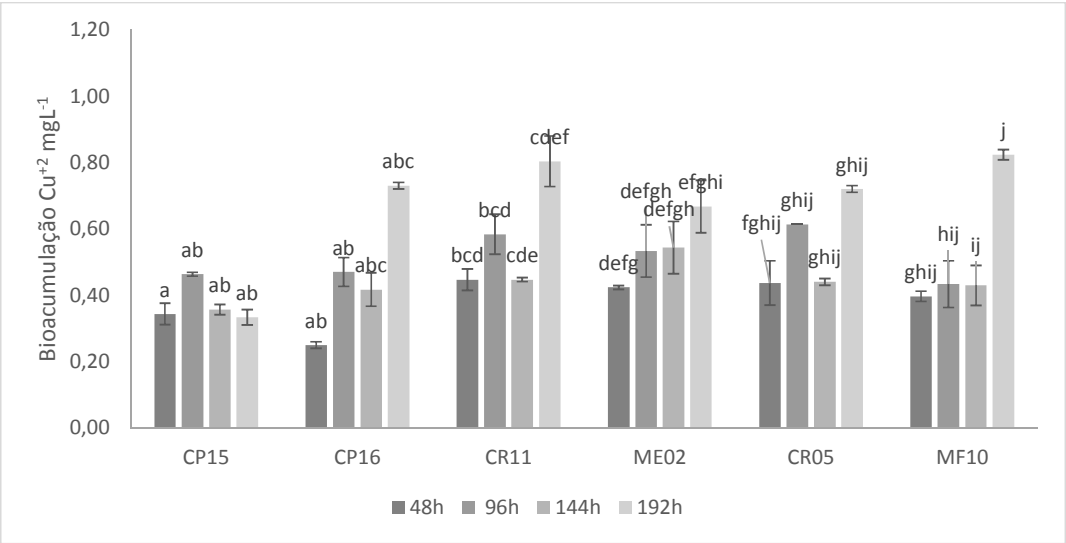

Figura 8: Bioacumulação em células bacterianas cultivados em meio suplementado com 500 mg L-1de Cu^{2+} dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h, com análise estatística ANOVA e Tuckey 0,5%.

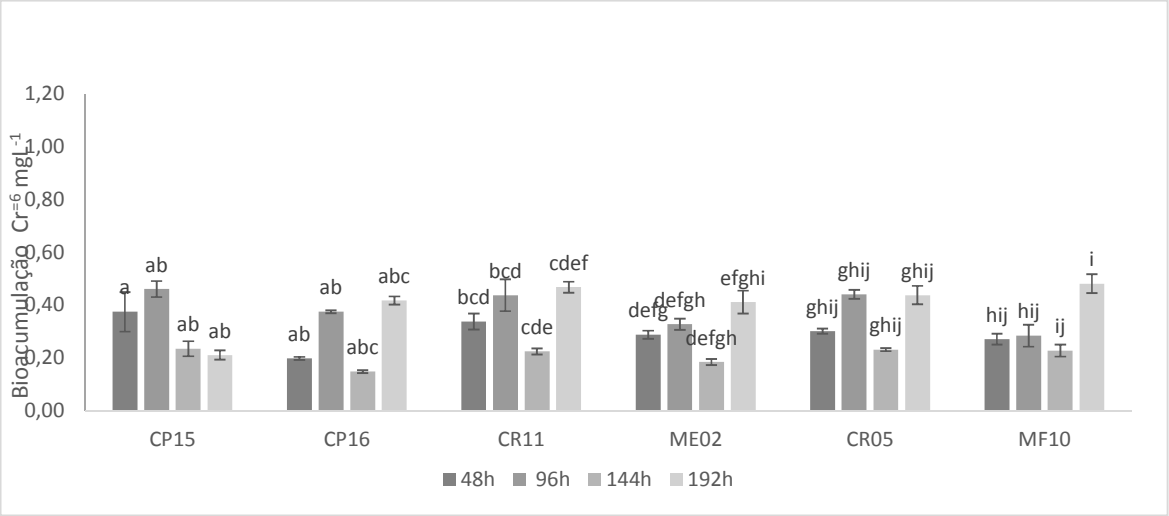

Figura 9: Bioacumulação em células bacterianas cultivados em meios suplementado com 500 mg L^{-1} de Cr^{6+} dos isolados CP15, CP16, CE11, ME02, CE05 e MF10 nos tempos 48h, 96h, 144h, 192h, com análise estatística ANOVA e *Tuckey 0,5%.*

4. DISCUSSÃO

O solos é um dos ambientes terrestres com maior riqueza de microrganismos cultiváveis com características biotecnológicas importantes (BALDRIAN et al., 2012). A diversidade microbiana do solo é uma característica importante para uma exploração biológica sustentável, uma vez que os microrganismos apresentam características biotecnológicas como enzimas para aplicação industrial, metabolismo intracelular para remoção de metais de ambientes afetados tanto por acidentes ambientais quanto por contaminação (BAI et al., 2014) .

A comunidade microbiana alocada em regiões com altas concentrações de metais apresenta uma série de características adaptativas. Genes que conferem resistência a metais como por exemplo *chrA, copA, copB, copC, nixA*, que também são genes importantes no processo de influxo e efluxo de metais pesados para uma possível aplicação na área de biorremediação (STUDIES; AUTHOR, 2013). Os microrganismos isolados dos diferentes ecossistemas de Sabará apresentaram capacidade de se desenvolver em meio de cultivo

contendo metais como cobre cromo e níquel, sendo assim um indicio para aplicação em processos de remoção e acumulação de metais(VELA-CANO; CASTELLANO-HINOJOSA; VIVAS, 2014).

Metais pesados em geral normalmente são tóxicos aos organismos vivos, alguns microrganismos apresentam mecanismos de membrana que conferem resistência a íons metálicos (DAS; VIMALA; KARTHIKA, 2008b). Os microrganismos isolados da região do perímetro do quadrilátero ferrífero apresentaram capacidade de se desenvolver 500 mg L^{-1} (Tabela 1) concentrações estas utilizadas em trabalhos para selecionar microrganismos com potencial para biossorção e biorremoção de metais (MAHRAJBNE; MAHRAGBNE, 1998). Microrganismos com essa alta sensibilidade apresentam mecanismos genotípicos e fenotípicos, como as proteínas de membrana que promovem resistência a metais e mediando o processo de entrada e saída dos metais, ou seja, regulam a porta de entrada para estes compostos que podem ser auxiliares a maquinaria metabólica das células (CHIEN et al., 2008).

Estudos de Chien e colaboradores (2013) com isolados de resíduos industriais e de águas contaminadas sugerem que bactérias tolerantes a concentrações de cobre apresentava potencial para biorremediação, pois utilizam o cobre como cofatores para o metabolismo (CHAZARENC; BRISSON; MERLIN, 2010; KUMARAN; SUNDARAMANICKAM; BRAGADEESWARAN, 2011). Contudo bactérias com capacidade de se desenvolver na presença de metais apresentam mecanismos metabólicos para manutenção celular que adicionalmente podem ser utilizados para biorremediação de metais.

Entretanto nem todos os microrganismos apresentam mecanismos de resistência a diferentes metais. Contudo microrganismos com mecanismos de resistência a diferentes metais tem possível aplicação no meio ambiente para recuperação de áreas degradas pela deposição de metais (KLAUS-JOERGER et al., 2001).

Entre essas características adaptativas desenvolvidas pelos microrganismos como mecanismos de sobrevivência existem fatores genotípicos como genes que codificam proteínas de membrana e são de extrema importância para vida em áreas em condições extremas, estas proteínas além

de conferirem resistência são proteínas que também são auxiliares nos mecanismos de influxo e efluxo de metais microrganismos com boa capacidade de imobilizar metais como o dos dados apresentados, podem sim apresentar genes importantes para o processo.

Considerando a temática de métodos alternativos para recuperação de áreas sob ação antropogênica ou até mesmo vítimas de acidentes ambientais a utilização de toda essa abundancia de diversidade microbiana do solo, técnicas tradicionais de isolamento são alternativas perspicazes para isolar e selecionar microrganismos, com maior tolerância aos metais pesado, para possíveis aplicações biotecnológicas.

5. CONCLUSÃO

Analisando os resultados do presente trabalho, os dados revelam que a microbiota do solo apresenta microrganismos com capacidade para aplicação nos processos de biorremediação íons metálicos cobre, cromo e níquel. A elevada taxa de remoção de metais, além dos altos valores de acumulação intracelular apresentado pelos isolados dando destaque para os gêneros *Burckholderia, Arthrobacter e Bacillus* que apresentaram boa remoção e boa interiorização de metais, tendo possíveis evidências de os microrganismos apresentam maquinaria metabólica necessária para uma possível aplicação ao processo de biorremediação de metais. Os dados apresentados neste trabalho juntamente com outros esforços para a preservação ambiental pode ser uma contribuição importante para a humanidade visando diminuir os impactos provocados por atividades antropogênicas, tornando possível o desenvolvimento com sustentabilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCESS, O. Biodegradation. v. 5, n. 3, p. 8–10, 2014.

ACID, B. et al. Microbial Community Analysis Microbial Community Analysis. p. 1–2, [s.d.].

ALEX, M. et al. O quadrilátero ferrífero e o norte de minas gerais: análise da história e importância econômica. p. 1–16, 2012.

ALTIMIRA, F. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC microbiology**, v. 12, p. 193, jan. 2012.

AMBIENTAL, T. et al. USO DE MICROORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS. n. 6, p. 995–1006, 2012.

ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biolixiviação: Utilização de Micro-organismos na Extração de Metais**. [s.l: s.n.].

ARORA, P. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, V. P. Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in Burkholderia sp. RKJ 800. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 3, p. 2298–304, fev. 2014.

AURÉLIO, M.; PINHO, C. DE; FILHO, P. Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado. p. 28, 2010.

BAI, J. et al. Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by Bacillus subtilis DBM in a multi-metal-contaminated soil. **Journal of environmental sciences (China)**, v. 26, n. 10, p. 2056–64, 1 out. 2014.

BALDRIAN, P. et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME journal**, v. 6, n. 2, p. 248–58, fev. 2012.

BICKEL, S.; TANG, K.; GROSSART, H. Structure and function of zooplankton-associated bacterial communities in a temperate estuary change more with time than with zooplankton species. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 72, n. 1, p. 1–15, 7 mar. 2014.

BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. TtMCO: A highly thermostable laccase-like multicopper oxidase from the thermophilic Thermobaculum terrenum. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 59–65, 2015.

CAMPBELL, C. D.; GRAYSTON, S. J.; HIRST, D. J. Methods Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. v. 30, p. 33–41, 1997.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura - pecuária sob intensidades de pastejo. n. 1, p. 1254–1261, 2011.

CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; MERLIN, G. Seasonal and Spatial Changes of Microorganism Communities in Constructed Wetlands: A Community Level Physiological Profiling Analysis. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

CHEN, S. et al. Influence of co-existed benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of Stenotrophomonas maltophilia during biodegradation and transformation. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 181–187, 2014.

CHIEN, C. et al. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 359–363, jan. 2008.

COSTA, P. S. et al. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119465, jan. 2015.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – An overview. v. 7, n. April, p. 159–169, 2008a.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008b.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1229–34, jul. 2008.

DE, N. Ufop – cetec – uemg. 2006.

FERNÁNDEZ-MONTIEL, I. et al. Short-term effects of simulated below-ground carbon dioxide leakage on a soil microbial community. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 36, p. 51–59, 2015.

FINN, R. D. et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 222–230, 2014.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource technology**, v. 160, p. 3–14, maio 2014.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271–279, 2000.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource technology**, v. 97, n. 13, p. 1484–9, set. 2006.

GRYTA, A.; FRĄC, M.; OSZUST, K. The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9–18, 2001.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. August 2006, p. 481–483, 2008.

HUNTER, S. et al. EBI metagenomics - A new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 600–606, 2014.

INÁCIO, L.; ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Presente**. [s.l: s.n.].

ISLAM, F. S. et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 68–71, 1 jul. 2004.

KANG, C.-H. et al. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. **Ecological Engineering**, v. 74, p. 402–407, jan. 2015.

KLAUS-JOERGER, T. et al. Bacteria as workers in the living factory: Metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2001.

KUMAR, R. et al. Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. v. 12, n. January, p. 115–119, 2013.

KUMARAN, N. S. R. I.; SUNDARAMANICKAM, A.; BRAGADEESWARAN, S. ABSORPTION STUDIES ON HEAVY METALS BY ISOLATED BACTERIAL STRAIN (PSEUDOMONAS Sp .) FROM UPPANAR ESTUARINE WATER , SOUTHEAST COAST OF INDIA. v. 6, n. 4, p. 471–476, 2011.

LASHEEN, M. R.; AMMAR, N. S.; IBRAHIM, H. S. Adsorption/desorption of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) using chemically modified orange peel: Equilibrium and kinetic studies. **Solid State Sciences**, v. 14, n. 2, p. 202–210, 2012.

LI, L.-G. et al. Potentially novel copper resistance genes in copper-enriched activated sludge revealed by metagenomic analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10255–66, dez. 2014.

LIU, X. et al. TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 271, 2008.

LIU, X. et al. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: A multi-medium analysis. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 530–540, 2013.

MAHRAJBNE, C.; MAHRAGBNE, C. RESISTANCE OF E N V I R O N M E N T A l . BACTERIA TO H E A V Y METALS. v. 64, p. 7–15, 1998.

MAIA, V. O. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS BANCO DE SEMENTES DO SOLO EM ÁREAS DE MINERAÇÃO E. 2014.

MARGESIN, R.; PŁAZA, G. A.; KASENBACHER, S. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1583–1588, 2011.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 208–IN1, 1961.

MÉNDEZ-GARCÍA, C. et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May, p. 1–17, 2015.

MORETTI, G. et al. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. **Annals of Microbiology**, 2015.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12 : Human Microbiome Analysis. v. 8, n. 12, 2012.

MYROLD, D. D.; ZEGLIN, L. H.; JANSSON, J. K. The Potential of Metagenomic Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 78, n. 1, p. 3, 2014.

NGUYEN, V. H.; SHIM, J.-J. Three-dimensional nickel foam/graphene/NiCo2O4 as high-performance electrodes for supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 273, p. 110–117, 2015.

ONLINE, V. A. Environmental Science Processes & Impacts bioremediation-based abolition of heavy metals. p. 180–193, 2014.

PANICKER, V. P.; GOPALAKRISHNAN, A. Mini Review Article Metagenomics : a Novel Tool to Unravel the Secrets of Nature. v. 2, n. 6, p. 312–315, 2014.

PERSPECTIVES, C.; MICROBIOLOGY, A. Vigna mungo. v. 1, n. 2, p. 1–10, 2012.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium. **Journal of microbiological methods**, v. 97, p. 20–4, fev. 2014.

POWELL, S. et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D231–D239, 2014.

RELACIONADOS, A. et al. O QUADRILÁTERO FERRÍFERO - MG , BRASIL : ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA , SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS. v. 18, n. 1, p. 33–37, 2010.

REZENDE, É. A.; AUGUSTO, A.; SALGADO, R. MAPEAMENTO DE UNIDADES DE RELEVO NA MÉDIA SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL - MG. p. 45–60, 2011.

SCHLOTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. . Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255–262, set. 2003.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions - A review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 9–19, 1996.

STUDIES, I.; AUTHOR, C. HEAVY METAL TOLERANCE OF THREE DIFFERENT BACTERIA ISOLATED FROM. v. 2, n. 2, p. 137–147, 2013.

SZYMAŃSKA, S.; PIERNIK, A.; HRYNKIEWICZ, K. Metabolic potential of microorganisms associated with the halophyte Aster tripolium L. in saline soils. **Ecological Questions**, v. 18, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2013.

TARTAGLIA, M. et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 75–79, 2007.

THIJS, S. et al. Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: isolation and characterization of a military soil. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 294–306, 2014.

TSEZOS, M. Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 241–243, fev. 2001.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–622, 2009.

URAKAWA, H. et al. Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. **ISRN Oceanography**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

VARAJAO, S. A. R. A. C. A QUESTÃO DA CORRELAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE EROSÃO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO , MINAS GERAIS. v. 21, n. 2, p. 138–145, 1991.

VELA-CANO, M.; CASTELLANO-HINOJOSA, A.; VIVAS, A. F. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. n. August, p. 644–655, 2014.

WANI, P. A.; AYOOLA, O. H. Bioreduction of Cr (VI) by Heavy Metal Resistant Pseudomonas Species. n. Vi, p. 1–9, 2015.

WEBER, K. P. et al. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 3, p. 461–9, jun. 2007.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 697–703, 1991.

WHITE, C.; SAYER, J. A; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 503–16, jul. 1997.

XIA, X. et al. On the role of surface diffusion in determining the shape or morphology of noble-metal nanocrystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6669–73, 2013.

ZOU, R. et al. Three-dimensional networked NiCo 2 O 4 /MnO 2 branched nanowire heterostructure arrays on nickel foam with enhanced supercapacitor performance. **J. Mater. Chem. A**, v. 3, n. 4, p. 1717–1723, 2015.

CAPÍTULO 4- Prospecção *in silico* de genes ortólogos envolvidos em processos de resistência e remoção de metais em metagenomas de ecossistemas da região de Sabará –MG.

RESUMO - Muito tem se investido em busca de alternativas para recuperação de áreas afetadas por fatores antropogênicos e desastres naturais, para tanto, este trabalho descreve a composição funcional de uma comunidade microbiana quanto a aplicação em biorremediação de metais, de solos do Centro de biodiversidade CEBIO – Sabará localizada no Quadrilátero Ferrífero, maior polo de mineração no Brasil. Solos de cinco ecossistemas, Campo Rupestre (Canga), Campo de Gramíneas (Capim), Cerrado, Mata Floresta e Mata Eucalipto, foram submetidos ao sequenciamento do DNA total, após todo o processamento e análise de bioinformática foi montado um banco de dados com informação gênica e funcional, onde foi realizado uma prospecção por busca de similaridade de genes ortólogos importantes em mecanismos de resistência e metabolismo de metais, uma vez que solos desta região apresentam grande quantidade de metal. Adicionalmente forma feitas a seleção de *contigs* para avliar a filiação taxonômica para os genes amplamente distribuídos nos dados de anotação. Nos diferentes ecossistemas foi possível encontrar ORFs de genes importantes envolvidos no processo de remoção de cobre, cromo, níquel entre outros metais. Vale salientas a presença de filos bacterianos importantes como proteobacterias, firmicutes, acidobateria entre outros, gêneros estes que englobam bactérias amplamente utilizadas em processos de imobilização de metais a partir de processos metabólicos ou independentes sendo assim os dados de anotação dos ecossistemas de Sabará apresentam grande potencial para prospecções mais profundas para aplicação em processos alternativos de recuperação de áreas.

Palavras chave: Genes, metagenoma, prospecção, metabolismo de metais e biorremediação.

CHAPTER 4 - Prospecting in silico of orthologous genes involved in processes of resistance and removal of metals in metagenomas of ecosystems in Sabara -MG.

ABSTRACT- Much has been invested in the search for alternatives for recovery of areas affected by anthropogenic factors and natural disasters, therefore, this work describes a functional composition of microbial community and the application in bioremediation of metals, the Biodiversity Centre CEBIO soil - Sabara located in the Iron Quadrangle, the largest mining pole in Brazil. Soils five ecosystems, Cave Course (Canga) Grasses Field (grass), Cerrado, Mata Forest and Forest Eucalyptus, were subjected to sequencing of the total DNA, after all processing and bioinformatics analysis was set up a database with information gene and functional where a survey was conducted by the search similarity of important gene orthologs resistance mechanisms and metabolism metals, since this region soils present a large amount of metal. Additionally way made the selection of contigs for avliar membership taxonomic genes distributed in the annotation data. In the different ecosystems ORFs were found important genes involved in the copper removal process, chromium, nickel and other metals. It salientas the presence of important bacterial phyla as Proteobacteria, Firmicutes, acidobateria among other genres these that include bacteria widely used in metal immobilization processes from metabolic or independent processes thus annotation data Sabara ecosystems present great potential for deeper prospects for application to alternative processes for recovery areas.

Keywords: Genes, metagenome, prospecting, bioremediation of metals and metabolism.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento econômico e industrial de muitos países em desenvolvimento, colaborou para o aumento na liberação de metais, devido alta toxicidade destes compostos se tornado um grave problema ambiental (GEGAN,2014). A liberação destes compostos nos solos pode ser de maneira natural, como por exemplo, tragédias naturais, alto nível de chuvas, entretanto a maior incidência destes compostos em solos e águas são resultado de atividades antrópicas(CAMPBELL; GRAYSTON; HIRST, 1997).

A busca por alternativas para recuperação destas áreas tem aumentado exponencialmente uma vez, que o próprio ecossistema oferece subsidio necessário para utilização nestes processos visto a ampla distribuição de espécies procarióticas em diferentes ambientes naturais, como solo, água, plantas e seres vivos (INÁCIO; ANTONIO; ELIAS, 2012) . Estas espécies bacterianas têm se revelado de grande importância para manutenção do equilíbrio ecológico destes ambientes. Devido a esta grande importância para manutenção da saúde ambiental bem como aplicação biotecnológica da funcionalidade da comunidade bacteriana, grandes esforços estão sendo dispensados para caracterizar a comunidade microbiana, dentre eles a metagenômica (KANG et al., 2015).

A metagenômica surge como ferramenta auxiliar para busca de genes envolvidos em processos de biorremediação, uma vez que é possível acessar toda a diversidade bacteriana e funcional de diferentes ecossistemas através do DNA total (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009). Esta técnica nos últimos tempos tornou-se ainda mais promissora com as tecnologias de sequenciamento de última geração, que por meio do DNA total pode se obter um elevado rendimento, ou seja um grande número de sequências, e assim acessar de maneira mais ampla e rápida toda a funcionalidade de ecossistemas (AURÉLIO; PINHO; FILHO, 2010).

Esta metodologia vence as limitações das abordagens tradicionais como PCR, isolamento entre outras, proporcionando maior visibilidade para avaliar a comunidade microbiana, através da diversidade como acessar toda a informação

funcional contida nos ecossistemas (PANICKER; GOPALAKRISHNAN, 2014). No presente trabalho, foi realizada a prospecção de genes de resistência e genes importantes no metabolismo de influxo de efluxo de metais, através de um banco de dados montados a partir de sequenciamento total de solos de cinco ecossistemas da região de Sabará. Os resultados revelados neste estudo irão proporcionar uma visão da funcionalidade da microbiota destes ecossistemas para uma possível aplicação em processos alternativos de remoção de metias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de sequências

Sequências de genes envolvido no metabolismo de metal, resistência a metais, (Figura1) foram extraídas do banco de dados NCBI, posteriormente as sequências foram submetidas no banco de ortólogos eggNOG (POWELL et al., 2014)

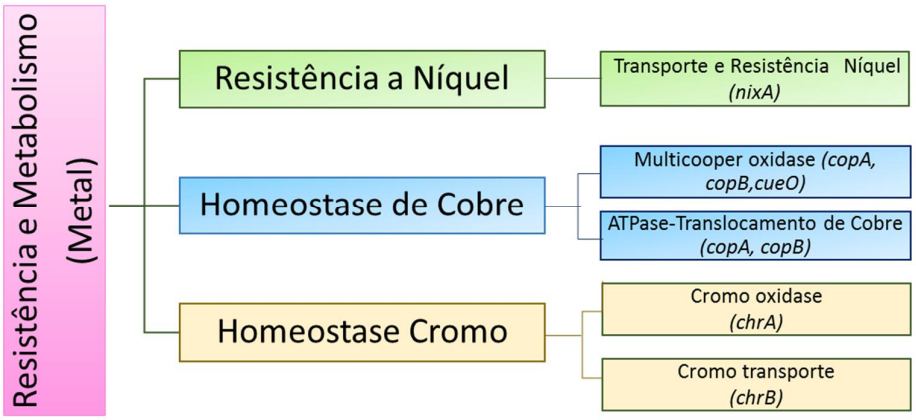

Figura 1: Genes envolvidos cem processos metabólicos e de resistência a metal.

2.2. Prospecção

As sequências foram prospectadas *in silico,* realizando uma busca por similaridade utilizando o programa Blast (Altschul et al., 1990), as ORFs (Open Reading Frames) que apresentaram similaridade com e-value -30 no banco de dados Metagenômico MVDB do Laboratório de Bioquímicas e Microrganismos

de Plantas – LBMP, contendo dados de sequenciamento, montagem e anotação do metagenoma total dos ecossistemas estudados. As ORFs com similaridade foram filtradas e selecionadas para que não houve-se repetição entre os ecossistemas, os valores obtidos foram normalizados por um fator de normalização que consiste na divisão do número de ORFs total de cada ecossistema pelo número de ORFs total do ecossistema mais significativo, o valor obtido multiplicado pelo número de ORFs encontradas para cada gene, posteriormente foram identificadas e selecionados dos diferentes ecossistemas e estas foram anotadas, verificando seus domínios no banco Pfam (FINN et al., 2014), após a verificação da anotação das ORFs, algumas foram escolhidas aleatoriamente para serem alinhadas pelo ClustalW para visualizar os motivos e domínios de acordo com o banco Pfam (FINN et al., 2014) e Tiger (LIU et al., 2008) (Figura 2).

2.3. Análise estatística

As ORFs identificadas foram analisadas com relação aos seus ecossistemas utilizando o programa Circos, realizando um agrupamento hierárquico pelo software R e análises estatísticas de análise de componentes principais (PCA) com a ferramenta PAST 3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

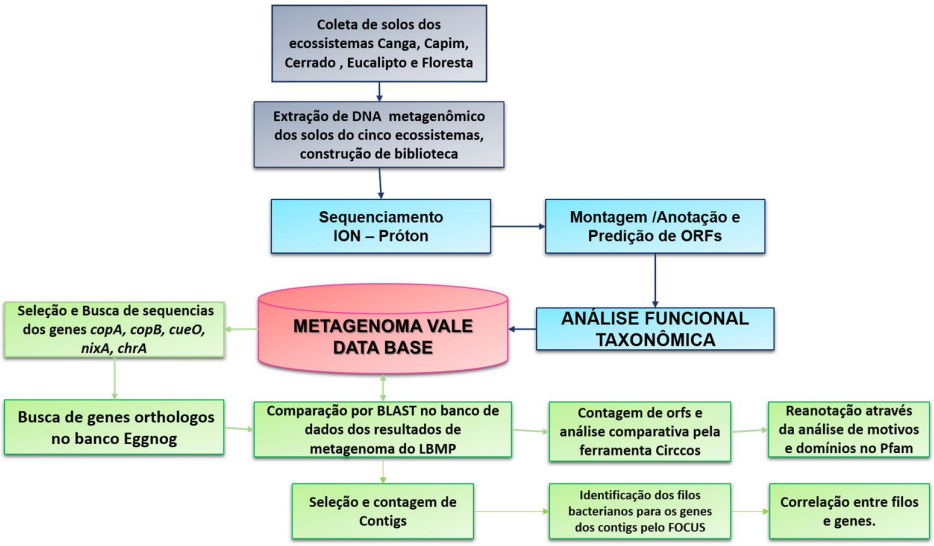

Figura 2 : Fluxograma metodológico

3. RESULTADOS

Os genes relacionados nas vias metabólicas para os metais como cobre cromo e níquel *(copA, copB, cueO, chrA, chrC, cusA, cusB e nixA*) foram prospectados *in silico* no banco metagenômico do LBMP, distribuídos entre os resultados de montagem/anotações dos ecossistemas: Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga. Da porcentagem total de ORFs anotadas para estes ecossistemas foi de 0,1 a 0,6%, correspondendo para ORFs relacionadas aos genes de resistência, onde no sequenciamento total para Mata Floresta houve uma maior porcentagem do total de ORFs para os genes estudados, seguido por Mata Eucalipto, Cerrrado, Canga e Capim (Figura 3).

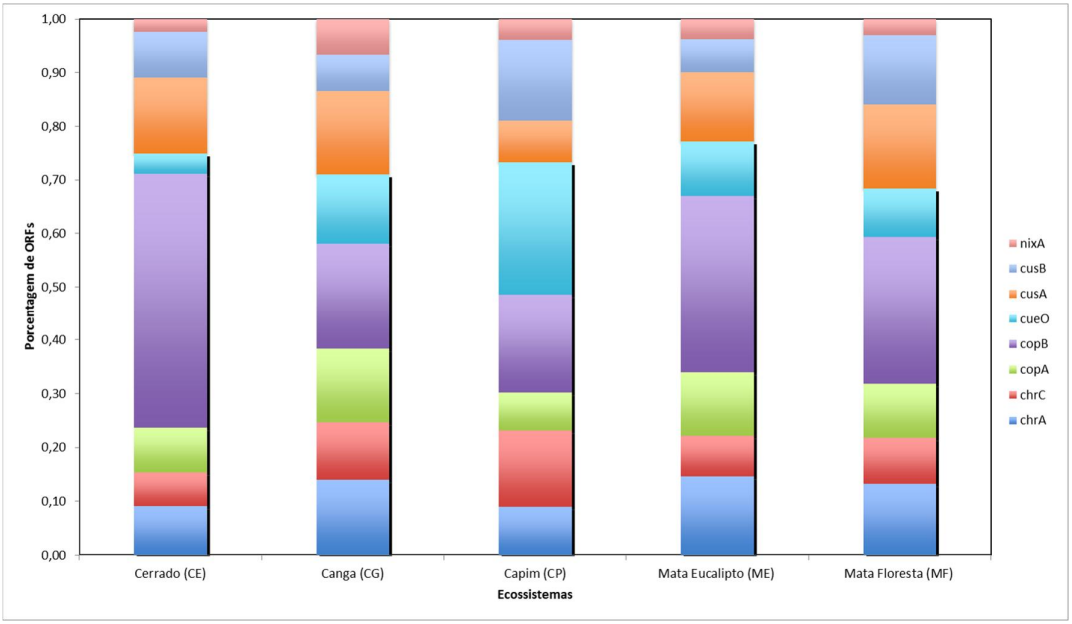

Figura 3: Porcentagem de ORFs do total de ORFs anotados para genes de resistência e de metabolismo de metal do banco Meteganômico MVDB - LBMP.

Na distribuição de ORFs relacionados as vias metabólicas para os genes em estudo, no metagenoma para Cerrado, seguido por Mata Floresta foi verificado a grande incidência de sequências relacionadas a homeostase (*cusA e cusB)* de metais em células e genes relacionados a resistência a metabolismo de cobre apresentaram distribuição semelhante, para o metagenoma para Mata

Floresta e Cerrado genes relacionados a metabolismo de crômio foram presentes nas análises *in silico* do banco Metagenômico MVDB - LBMP. (Tabela 1).

Tabela 1: Número de ORFs encontradas no banco Metagenômico MVDB do Laboratório de Bioquímica e Microrganismos de Planta para os genes de resistência a metais níquel oxidase *(nixA)*, multicooper oxidase ATPase *(copA)*, cromato oxidase *(chrA),* cooper oxidase *(cueO), multicooper* oxidase ATPase like *(copB).*

	Número de ORFS				
Genes	**Cerrado (CE)**	**Canga (CG)**	**Capim (CP)**	**Mata Eucalipto (ME)**	**Mata Floresta (MF)**
chrA	112	115	7	91	260
chrC	76	88	11	47	166
copA	101	112	5	73	197
copB	580	162	14	206	537
cueO	45	106	19	63	176
cusA	175	128	6	81	306
cusB	103	55	11	38	253
nixA	29	55	3	23	59

Os dados de anotação do metagenoma do banco Metagenômico MVDB - LBMP das regiões de Sabará – MG, para o gene *copB,* envolvido no processo de resistência e influxo e efluxo de metais foi amplamente distribuído na identificação de ORFs nos metagenomas de Cerrado e Mata Floresta, entretanto, para *copA* e *cueO,* que exerce uma função semelhante ao gene *copB*, as ORFs foram identificadas em números distribuídos entre Canga seguido por Mata Eucalipto (Figura 3). Para genes codificadores do cromato oxidase *crhA e* cromato transporter (*chrC)* as ORFs foram identificadas para os metagenomas de maneira bastante semelhantes para os ecossistemas Mata Floresta, Cerrado, Canga e Mata Eucalipto. O ecossistema campo rupestre, Canga e Mata Floresta apresentaram grande distribuição de ORFs*,* para genes que conferem resistência a níquel (Figura 4).

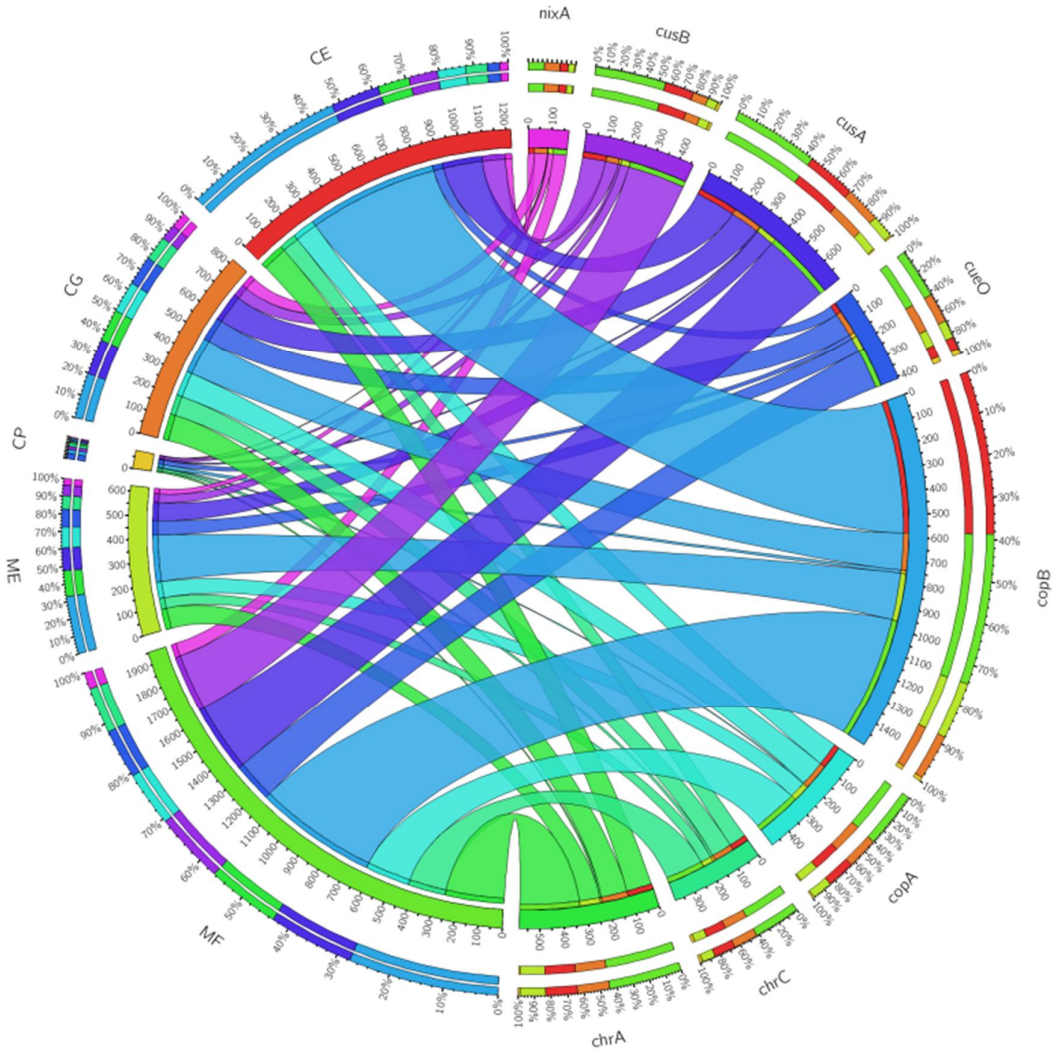

Figura 4: Distribuição de ORFs para os genes *copA, copB, cueO chrA, chrC, cusA, cusB* e *nixA* para o total de ORFs nos cinco ecossistemas Cerrado (CE), Capim (CP), Canga (CG), Mata Eucalipto (ME) Mata Floresta (MF). Os dados foram visualizados através do software Circos, o comprimento das barras, tal como no anel exterior foi representa na porcentagem de genes em cada ecossistema.

Na análise de componentes principais, ORFs relacionadas a resistência e homeostase de cromo (*chrC)*, níquel *(nixA)* e cobre *(copA),* foram agrupados e direcionados para o ecossistema campo rupestre (Canga), já para genes com característica funcional semelhante os agrupamentos apresentaram correlação ara Mata Eucalipto (Figura 4). Genes responsáveis pelo influxo e efluxo de

metais nas células se agruparam de maneira extrema e se correlacionam com diferentes ecossistemas sendo eles Mata Floresta (*cusB)* e Cerrado para *(cusA)* (Figura 5).

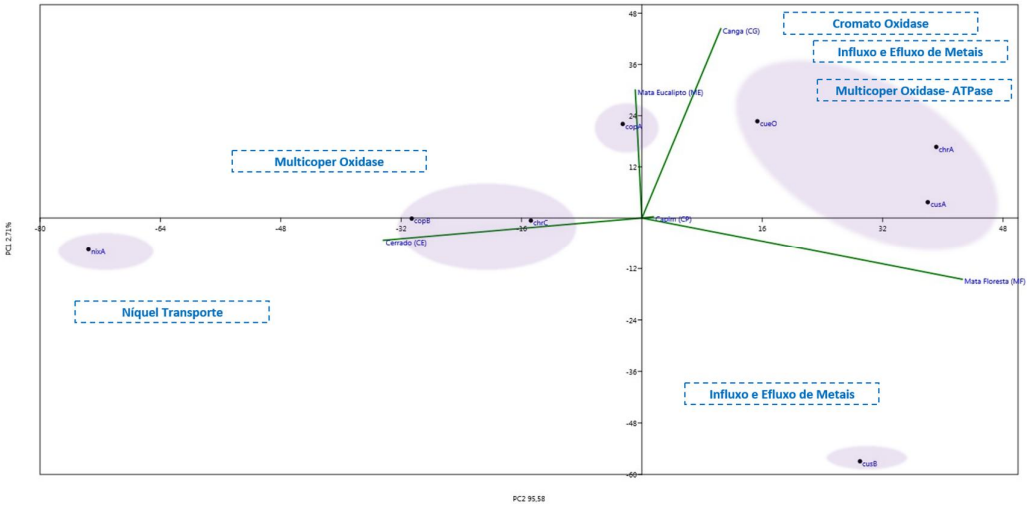

Figura 5: Análise de componentes principais de cinco ecossistemas.

As sequências das ORFs encontradas nos ecossistemas foram todas re-anotadas de acordo com o domínio do Pfam, pela plataforma WebMGA (Wu et al., 2011), sequências para as ORFs *copA* apresentaram domínios para multicooper oxidase do tipo ATPase, *copB e cueO* para multicooper oxidas (Tabela S1). Para genes envolvidos no processo de metabolismo e resistência a cromo apresentaram domínios para cromato oxidase e cromato transporte respectivamente.

Os *contigs* selecionados foram submetidos analise de filiação taxonômica dentre os filos bacterianos mais abundardes estão as Proteobacterias, seguido pela Actinobacteria, Acidobateria, Firmicutes e Planctomices. Os genes estão amplamente divididos pelos filos bacterianos, destacando-se para os genes *cusA, cusB, copA e copB.*

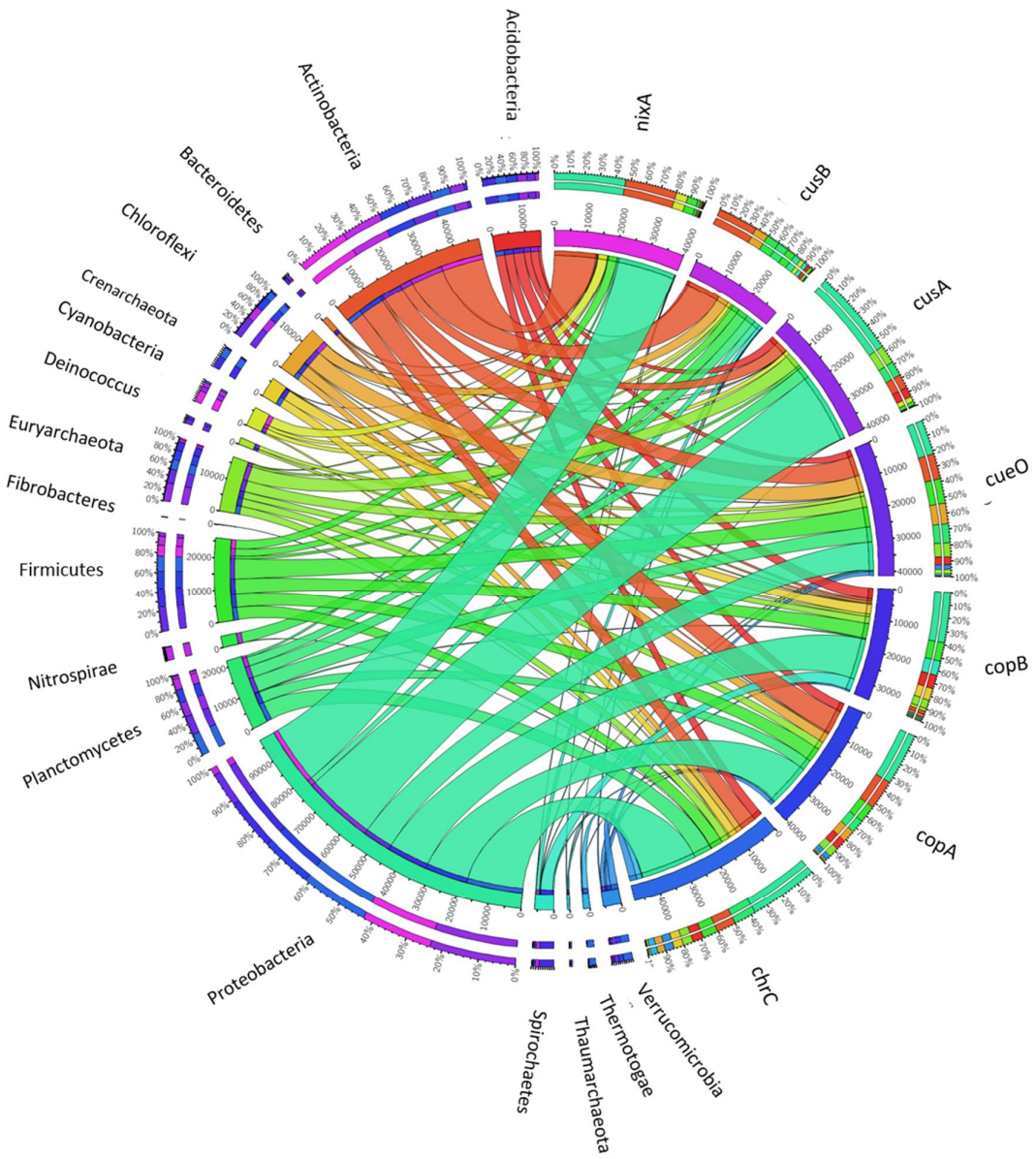

Figura 6: Distribuição de filo bacteriano para os genes *copA, copB, cueO chrA, chrC, cusA, cusB* e *nixA* para os contigs dos cinco ecossistemas Cerrado (CE), Capim (CP), Canga (CG), Mata Eucalipto (ME) Mata Floresta (MF). Os dados foram visualizados através do software Circos, o comprimento das barras, tal como no anel exterior foi representa na porcentagem de genes em cada ecossistema.

Algumas sequências foram selecionadas ao acaso e comparadas com banco de dados de proteína os genes *copA* de algumas sequências, de ecossistema como floresta, cerrado e eucalipto apresentaram regiões conservadas com uma cupredoxina redutase (Figura 5). Dentre as regiões conservadas é possível observar um sitio de ligação a cobre, e um deles é caracterizado pela presença de uma região conservada para as histidinas (H) e sitio de repetição (Figura 7).

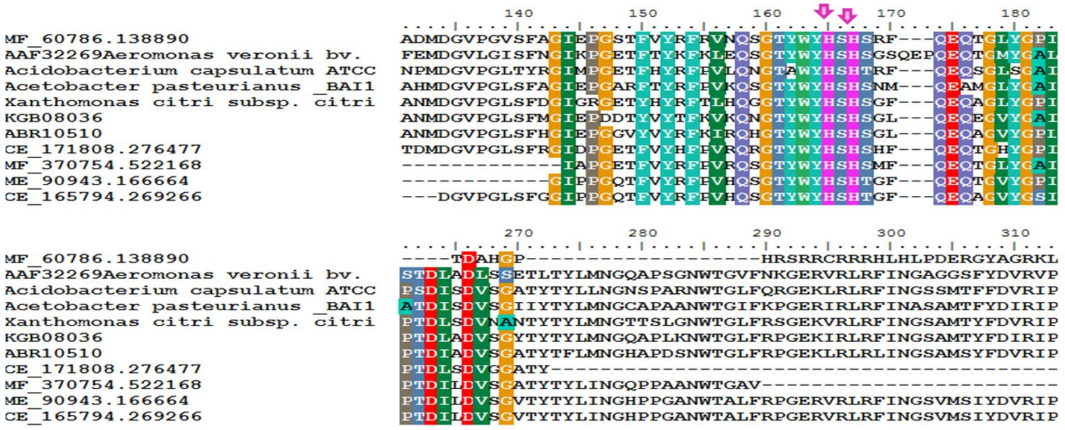

Figura 7 : Alinhamento múltiplos pelo software ClustalW de sequências do banco NCBI para o gene *copA* para resistência de cobre com ORFs do banco Metagenômico MVDB do LBMP dos cinco ecossistemas mata floresta, mata eucalipto, cerrado, capim e canga, sendo que as colunas em negrito demonstram as regiões conservadas de acordo com o banco PFAM, a seta indica o sítio de ligação ao cobre *Acidobacterium capsulatum* (ACO33430), *Acetobacter pasteurianus* (BAI12244) *Xanthomonas citri* (ADR70747), *Enterobacter cloacae (*KGB08036) e *Pseudomonas* sp. (ABR10510).

As ORFs para *copA,* em comparação aos resultados encontrados no banco Pfam, se dividiram em dois grupos, sendo reanotadas como cupredoxina redutase e como as multicooper ATPase, ambas representantes das famílias das lacases, apresentando característica quanto ao metabolismo de cobre, observando no alinhamento as regiões conservadas (Figura 8), sugerindo que este perfil descreve ATPases de tipo IB2, sendo proteínas com sitios de ligação de cadmio e cobre, responsável por processos de transporte de íons de ferro.

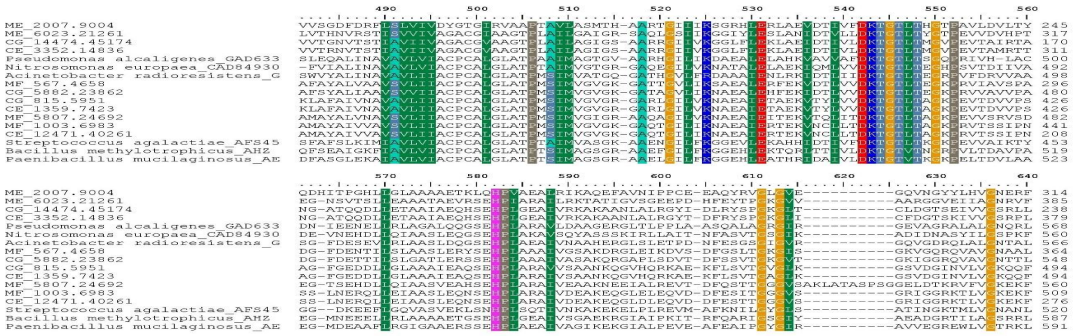

Figura 8: Alinhamento múltiplos pelo programa ClustalW com sequências do banco NCBI para o gene *copA,* para multi cooper oxidase ATPse, e com sequências de metagenoma dos cinco ecossistema, Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga, sendo que as coluna colorias demonstram as regiões conservadas de acordo com o banco de PFAM *Arthrobacter arilaitensis* (CBT74889), *Pseudomonas alcaligenes* (GAD63322), *Nitrosomonas europaea* (CAD84930), *Acinetobacter radioresistens* (GAB76331), *Streptococcus agalactiae* (CFV18308), *Bacillus amyloliquefaciens* (AHZ17356), *Paenibacillus mucilaginosus* (AEI44753) e *Bacillus licheniformis* (AGN37932) .

Dentre os genes que conferem resistência a metal e realizam metabolismo de metais estão os genes *chrA,* da cromato oxidas. Nas análises de similaridade foi possível encontrar regiões conservadas para cromo oxidase quando comparado com sequências do banco PFAM, para os motivos conservados FGG, motivos caracteristicos para este gene (Figura 9).

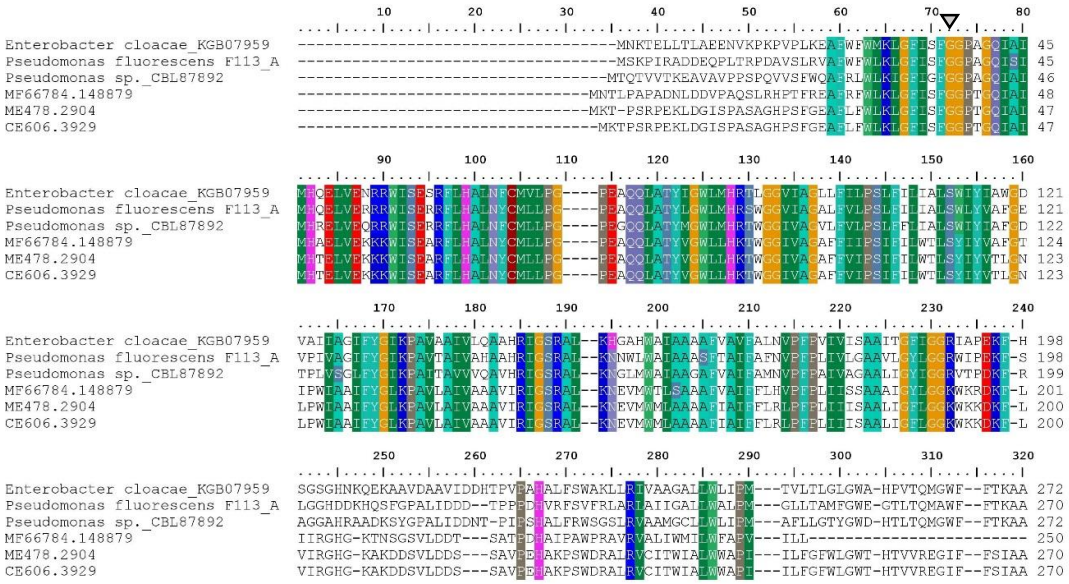

Figura 9: Alinhamento múltiplos pelo programa ClustalW de sequências do banco NCBI para o gene *chrA* cromato oxidase com sequencias de metagenoma dos cinco ecossistemas, Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga, sendo que as colunas coloridas demonstram as regiões conservadas de acordo com sequências do banco de dados PFAM, a seta indica o sitio de ligação ao cromo *Enterobacter cloacae* (KGB07959), *Pseudomonas fluorescens* (AEV63938), *Stenotrophomonas maltophilia* (CCH12056), *Paenibacillus mucilaginosus* (AEI41168) *Pseudomonas* sp. (CBL87892) e *Bradyrhizobium* sp. (EGP06243).

Foram encontradas ORFs para os genes *nixA* em comparação com os bancos de dados para proteína, observando-se que as sequências apresentam similaridade com as *nicO* (Figura 10), níquel transporte, que apresenta alta afinidade com transportadores de níquel (ZOU et al., 2015).

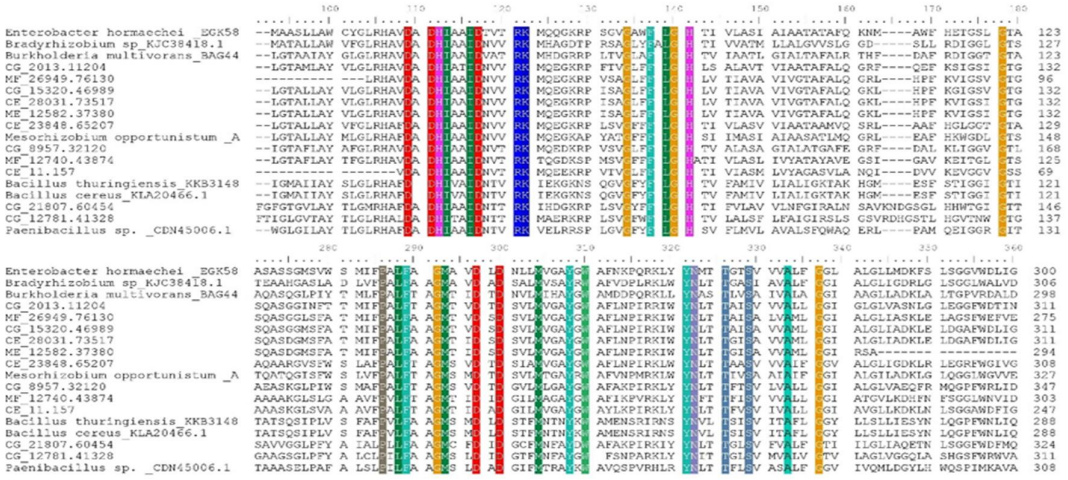

Figura 10: Alinhamento múltiplos pelo programa ClustalW de sequências do banco NCBI para o gene *nixA, nicO* e sequências de metagenoma dos cinco ecossistemas, Mata Floresta, Mata Eucalipto, Cerrado, Capim e Canga, sendo que as sequências em colorido demonstram as regiões conservadas de acordo com sequências do banco PFAM. *Enterobacter hormaechei* (EGK58005) *Bradyrhizobium* sp. (KJC38418) *Burkholderia multivorans* (BAG44386) *Mesorhizobium opportunistum* (AEH89926) *Bacillus thuringiensis* (KKB31485) *Bacillus cereus* (KLA20466) *Paenibacillus* sp. (CDN45006).

4. DISCUSSÃO

A comunidade microbiana dos solos desempenha um papel importante no solo, através das interações entre os microrganismos, atuando de maneira essencial nos ecossistemas visto a grande importância nos ciclos biogeoquímicos e em processos de recuperação ambiental (ACCESS, 2014; ACID et al.,2012). Solos de regiões localizadas no perímetro do Quadrilátero Ferrífero – MG, apresentam grande quantidade de metais, sendo regiões de grande interesse para a extração de metais. Estudos funcionais de sedimento de regiões localizadas em torno desta região apresentaram grande incidência de genes envolvido no metabolismo e resistência a metais (ALTIMIRA et al., 2012; AMBIENTAL et al., 2012; ARORA; SRIVASTAVA; SINGH, 2014).

Os solos de regiões localizadas no perímetro do quadrilátero ferrífero apresentam solos com grandes concentrações de metais como ferro, cobre, cromo, níquel, zinco, manganês entre outros, sendo uma região de grande potencial para extração de minérios(ALEX et al., 2012).A incidência de genes que conferem resistência e metabolismo de metal pode ser uma indicativa para microrganismos com potencial para biorremediação, bem como um potencial para prospecção de enzimas chaves que controlam o influxo e efluxo de metais pesados, visto que a microbiota presente neste solo, com características propicias para extração de diferentes metais e minérios, pode ter apresentado adaptações metabólicas para a sobrevivência na região.

Microrganismos envolvidos me processos de biorremediação atualmente tem ampla utilização uma pela capacidade metabólica destes organismos vivos, estes processos metabólicos são intermediados e rgulados por proteínas de membrana (FOMINA; GADD, 2014). Existem uma serie de relatos de microrganismos que relaizam processos de biorremediação dentre eles organismos dos filos das proteobacterias como Artrobacter, Enterobacter, Bradyrhizobium mezorrhizonium, bem como o filo Aciobacteria pelos Acidothiobacillus ferrodoxiam (KARTHIKA, 2008a), estes processos são regulados genes que estão amplamente devidos dentre os filos e nos dados de anotação metagenômica dos cinco ecossistemas.

Dentre os genes de resistência a cobre, encontra-se a *copA, copB e cueO* que se apresentam divididas como multicooper oxidase e multicooper oxidase ATPase-like e cupredoxina redutase. As cupredoxinas apresentam características estruturais com sete folhas betas. Estas proteínas estão amplamente divididas em famílias que permitem de três a seis sítios de ligação para cobre, característica peculiar para as lacases e que são de extrema importância para enzimas aplicadas a biorremediação, pois estes sítios de ligação a cobre e a outros metais determina um mecanismos de resistência por exportação que promove transporte de elétrons intercelulares (BRANDER; MIKKELSEN; KEPP, 2015).

As ATPases além de conferirem resistência a cobre estas enzimas são umas das principais responsáveis pelo transporte de cobre pelas membranas

biológicas, visto que são proteínas de membrana com características de proteínas tipo *like,* que são proteínas que fazem o transporte de substância para a célula. Estas proteínas transportadoras são encontradas em procariotos e eucariotos, e que estas ATPases se encaixam neste grupo sendo membro importantes na maquinaria metabólica de íons metálicos de cobre, na entrada, saída e armazenamento (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015).

O cromo se enquadra entre um dos metais pesados com maior ação tóxica para o meio ambiente, microrganismos com mecanismos de resistência e proteínas de membrana com capacidade de manter a homeostase de metais na célula. Os genes *chrA e chrC* codificam as enzimas cromato oxidase e cromato transporte, enzimas importantes na manutenção da homeostase na célula além de conferir resistência a cromo.

As proteínas da família das transportadoras de níquel são encontradas em bactérias tanto gram–negativas como gram-positivas. Estas proteínas tem a capacidade de incorporar e absorver níquel, sendo uma possível proteína de membrana integral com sete hélices transmembrana, além de um transportador de cobalto (NGUYEN; SHIM, 2015).

Os dados apresentados revelam que a comunidade microbiana de solos de ecossistemas de Sabará – MG, tem características sugestivas para uma possível aplicação na biorremediação de metais, visto que a anotação funcional revelou uma grande diversidade de genes de resistência a metal, sugerindo uma adaptação metabólica dos microrganismos que vivem em solos com alta concentrações de metais. Os resultados da prospecção *in silico* apresentados neste trabalho promove uma visão mais ampla da composição funcional *in silico* da microbiota dos solos com características para mineração de metais e assim aplicar esta comunidade microbiana como alternativa para recuperação ambiental.

5. CONCLUSÃO

Analisando os resultados do presente trabalho, os dados revelam que a microbiota dos solos dos ecossistemas de Sabará – MG apresenta microrganismos com características funcionais para uma possível aplicação em para biorremediação para os íons metálicos cobre, níquel e cromo. A busca de genes no banco de metagenoma total, contendo informações de anotação gênica, foi possível identificar genes de resistência aos metais além de genes envolvidos no metabolismo de influxo e efluxo de cobre, cromo e níquel. Este estudo fornece embasamento de um ecossistema quanto a sua microbiota indicando um possível papel para prospecção de enzimas e microrganismos aplicados no metabolismo e biorremoção de metais. Os resultados apresentados neste trabalho juntamente com os avanços biotecnológicos e aumento da busca de alternativas para recuperação de ecossistemas afetados por compostos tóxicos para preservação ambiental tornando possível o desenvolvimento biotecnológico e ecologicamente sustentável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCESS, O. Biodegradation. v. 5, n. 3, p. 8–10, 2014.

ACID, B. et al. Microbial Community Analysis Microbial Community Analysis. p. 1–2, [s.d.].

ALEX, M. et al. O quadrilátero ferrífero e o norte de minas gerais: análise da história e importância econômica. p. 1–16, 2012.

ALTIMIRA, F. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC microbiology**, v. 12, p. 193, jan. 2012.

AMBIENTAL, T. et al. USO DE MICROORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS. n. 6, p. 995–1006, 2012.

ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biolixiviação: Utilização de Micro-organismos na Extração de Metais**. [s.l: s.n.].

ARORA, P. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, V. P. Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in Burkholderia sp. RKJ 800. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 3, p. 2298–304, fev. 2014.

AURÉLIO, M.; PINHO, C. DE; FILHO, P. Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado. p. 28, 2010.

BAI, J. et al. Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by Bacillus subtilis DBM in a multi-metal-contaminated soil. **Journal of environmental sciences (China)**, v. 26, n. 10, p. 2056–64, 1 out. 2014.

BALDRIAN, P. et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME journal**, v. 6, n. 2, p. 248–58, fev. 2012.

BICKEL, S.; TANG, K.; GROSSART, H. Structure and function of zooplankton-associated bacterial communities in a temperate estuary change more with time than with zooplankton species. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 72, n. 1, p. 1–15, 7 mar. 2014.

BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. TtMCO: A highly thermostable laccase-like multicopper oxidase from the thermophilic Thermobaculum terrenum. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 59–65, 2015.

CAMPBELL, C. D.; GRAYSTON, S. J.; HIRST, D. J. Methods Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. v. 30, p. 33–41, 1997.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura - pecuária sob intensidades de pastejo. n. 1, p. 1254–1261, 2011.

CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; MERLIN, G. Seasonal and Spatial Changes of Microorganism Communities in Constructed Wetlands: A Community Level Physiological Profiling Analysis. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

CHEN, S. et al. Influence of co-existed benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of Stenotrophomonas maltophilia during biodegradation and transformation. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 181–187, 2014.

CHIEN, C. et al. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 359–363, jan. 2008.

COSTA, P. S. et al. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119465, jan. 2015.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – An overview. v. 7, n. April, p. 159–169, 2008a.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008b.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1229–34, jul. 2008.

DE, N. Ufop – cetec – uemg. 2006.

FERNÁNDEZ-MONTIEL, I. et al. Short-term effects of simulated below-ground carbon dioxide leakage on a soil microbial community. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 36, p. 51–59, 2015.

FINN, R. D. et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 222–230, 2014.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource technology**, v. 160, p. 3–14, maio 2014.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271–279, 2000.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource technology**, v. 97, n. 13, p. 1484–9, set. 2006.

GRYTA, A.; FRĄC, M.; OSZUST, K. The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9–18, 2001.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. August 2006, p. 481–483, 2008.

HUNTER, S. et al. EBI metagenomics - A new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 600–606, 2014.

INÁCIO, L.; ANTONIO, L.; ELIAS, R. **MBIENTAL Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Presente**. [s.l: s.n.].

ISLAM, F. S. et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 68–71, 1 jul. 2004.

KANG, C.-H. et al. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. **Ecological Engineering**, v. 74, p. 402–407, jan. 2015.

KLAUS-JOERGER, T. et al. Bacteria as workers in the living factory: Metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2001.

KUMAR, R. et al. Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. v. 12, n. January, p. 115–119, 2013.

KUMARAN, N. S. R. I.; SUNDARAMANICKAM, A.; BRAGADEESWARAN, S. ABSORPTION STUDIES ON HEAVY METALS BY ISOLATED BACTERIAL STRAIN (PSEUDOMONAS Sp .) FROM UPPANAR ESTUARINE WATER , SOUTHEAST COAST OF INDIA. v. 6, n. 4, p. 471–476, 2011.

LASHEEN, M. R.; AMMAR, N. S.; IBRAHIM, H. S. Adsorption/desorption of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) using chemically modified orange peel: Equilibrium and kinetic studies. **Solid State Sciences**, v. 14, n. 2, p. 202–210, 2012.

LI, L.-G. et al. Potentially novel copper resistance genes in copper-enriched activated sludge revealed by metagenomic analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10255–66, dez. 2014.

LIU, X. et al. TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 271, 2008.

LIU, X. et al. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: A multi-medium analysis. **Science of the Total Environment**, v. 463-464, p. 530–540, 2013.

MAHRAJBNE, C.; MAHRAGBNE, C. RESISTANCE OF E N V I R O N M E N T A l . BACTERIA TO H E A V Y METALS. v. 64, p. 7–15, 1998.

MAIA, V. O. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS BANCO DE SEMENTES DO SOLO EM ÁREAS DE MINERAÇÃO E. 2014.

MARGESIN, R.; PŁAZA, G. A.; KASENBACHER, S. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1583–1588, 2011.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 208–IN1, 1961.

MÉNDEZ-GARCÍA, C. et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May, p. 1–17, 2015.

MORETTI, G. et al. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. **Annals of Microbiology**, 2015.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12 : Human Microbiome Analysis. v. 8, n. 12, 2012.

MYROLD, D. D.; ZEGLIN, L. H.; JANSSON, J. K. The Potential of Metagenomic Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 78, n. 1, p. 3, 2014.

NGUYEN, V. H.; SHIM, J.-J. Three-dimensional nickel foam/graphene/NiCo2O4 as high-performance electrodes for supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 273, p. 110–117, 2015.

ONLINE, V. A. Environmental Science Processes & Impacts bioremediation-based abolition of heavy metals. p. 180–193, 2014.

PANICKER, V. P.; GOPALAKRISHNAN, A. Mini Review Article Metagenomics : a Novel Tool to Unravel the Secrets of Nature. v. 2, n. 6, p. 312–315, 2014.

PERSPECTIVES, C.; MICROBIOLOGY, A. Vigna mungo. v. 1, n. 2, p. 1–10, 2012.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium. **Journal of microbiological methods**, v. 97, p. 20–4, fev. 2014.

POWELL, S. et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D231–D239, 2014.

RELACIONADOS, A. et al. O QUADRILÁTERO FERRÍFERO - MG , BRASIL : ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA , SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS. v. 18, n. 1, p. 33–37, 2010.

REZENDE, É. A.; AUGUSTO, A.; SALGADO, R. MAPEAMENTO DE UNIDADES DE RELEVO NA MÉDIA SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL - MG. p. 45–60, 2011.

SCHLOTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. . Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255–262, set. 2003.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions - A review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 9–19, 1996.

STUDIES, I.; AUTHOR, C. HEAVY METAL TOLERANCE OF THREE DIFFERENT BACTERIA ISOLATED FROM. v. 2, n. 2, p. 137–147, 2013.

SZYMAŃSKA, S.; PIERNIK, A.; HRYNKIEWICZ, K. Metabolic potential of microorganisms associated with the halophyte Aster tripolium L. in saline soils. **Ecological Questions**, v. 18, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2013.

TARTAGLIA, M. et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 75–79, 2007.

THIJS, S. et al. Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: isolation and characterization of a military soil. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 294–306, 2014.

TSEZOS, M. Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 241–243, fev. 2001.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–622, 2009.

URAKAWA, H. et al. Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. **ISRN Oceanography**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

VARAJAO, S. A. R. A. C. A QUESTÃO DA CORRELAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE EROSÃO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO , MINAS GERAIS. v. 21, n. 2, p. 138–145, 1991.

VELA-CANO, M.; CASTELLANO-HINOJOSA, A.; VIVAS, A. F. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. n. August, p. 644–655, 2014.

WANI, P. A.; AYOOLA, O. H. Bioreduction of Cr (VI) by Heavy Metal Resistant Pseudomonas Species. n. Vi, p. 1–9, 2015.

WEBER, K. P. et al. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 3, p. 461–9, jun. 2007.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 697–703, 1991.

WHITE, C.; SAYER, J. A; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 503–16, jul. 1997.

XIA, X. et al. On the role of surface diffusion in determining the shape or morphology of noble-metal nanocrystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6669–73, 2013.

ZOU, R. et al. Three-dimensional networked NiCo 2 O 4 /MnO 2 branched nanowire heterostructure arrays on nickel foam with enhanced supercapacitor performance. **J. Mater. Chem. A**, v. 3, n. 4, p. 1717–1723, 2015.

CAPITULO 5- Considerações Finais

Analisando os resultados do presente trabalho, os dados revelam que a microbiota do solo apresenta microrganismos com capacidade para biorremediação. O Biolog EcoPlate forneceu informações necessárias quanto a atividade metabólica microbiana para alguns compostos uma vez que a placa apresenta 31 compostos diferentes relacionados a fontes de carbono importantes para a manutenção do ambiente e assim permitiu correlacionar os ecossistemas de Mata Floresta, Cerrado e Canga, exceto para Capim que sofreu tanto a ação antropogênica quanto de fatores naturais, onde sugere-se que a comunidade microbiana ainda sofre com a pressão seletiva para se estabelecer no local. Os microrganismos das regiões de estudos localizadas no Quadrilátero Ferrífero têm alta atividade metabólica e também metabolismo de metais, portanto o Biolog EcoPlate consiste em uma ferramenta de grande importância para entender as ações naturais e antropogênicas sobre a comunidade microbiana e os fatores que regulam a ação de microrganismos na comunidade microbiana sendo uma ferramenta inicial para prospecção de genes e enzimas importantes para aplicação biotecnológica.

Os solos da região de Sabará – MG, além de altamente diversos quanto a degradação de compostos metabólicos também apresentaram microrganismos com grande potencial para a serem aplicados em processos alternativos de remoção de metais, uma vez que os microrganismos isolados dos solos dos ecossistemas desta região apresentaram resistência a altas concentrações de metais pesados, cobre, cromo e níquel, sugerindo que estes mesmo microrganismos apresentam boa capacidade de remoção de metais por técnicas de imobilização de íons metálicos. Os isolados apresentaram alta taxa de imobilização de metais por processos de acumulação e remoção dando destaque para os gêneros *Burckholderia, Arthrobacter e Bacillus* que apresentaram boa remoção e boa interiorização de metais, mostrando possíveis evidências que os microrganismos apresentam características genotípicas e fenotípicas para metabolismo de metais e uma possível aplicação em biorremediação.

As técnicas tradicionais microbiológicas fornecem informações variadas, entretanto não permite acessar toda a riqueza da microbiota dos solos devido sua grande riqueza, com advento da metagenômica e do sequenciamento de nova geração o acesso quase que total se torna possível, e assim buscar nessa riqueza alternativas para uma aplicação biotecnológica em biorremediação, por exemplo. Os dados de prospecção de genes de resistência a metal no banco metagenoma MVDB – LBMP, contendo sequenciamento total e anotação gênica dos ecossistemas de Sabará – MG, evidenciaram não só genes importantes para mecanismos de resistência bem como importantes para o metabolismo de influxo e efluxo de íons metálicos cobre, cromo e níquel. Os resultados deste trabalho fornecem informações para uma prospecção de enzimas e microrganismos aplicados em biorremediação de metais.

Os resultados apresentados em todas as abordagens utilizadas neste trabalho juntamente com os avanços biotecnológicos e o aumento na busca por alternativas para a recuperação de ecossistemas afetados por compostos tóxicos, seja por ação antropogênica ou natural, para preservação ambiental tornando assim possível o desenvolvimento ecologicamente sustentável.