
TESE DE DOUTORADO

**Metais em áreas portuárias e sua influência na dinâmica microbiana: da
caracterização do problema à busca de soluções**

Bruna Del Busso Zampieri

**RIO CLARO / SP
2020**

TESE DE DOUTORADO

Bruna Del Busso Zampieri

**Metais em áreas portuárias e sua influência na dinâmica microbiana: da
caracterização do problema à busca de soluções**

**Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora
em Microbiologia Aplicada.**

**Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira
Co-orientador: Gunther Brucha**

**RIO CLARO / SP
2020**

Z26m Zampieri, Bruna Del Busso
Metais em áreas portuárias e sua influência na dinâmica
microbiana: da caracterização do problema à busca de soluções /
Bruna Del Busso Zampieri. -- Rio Claro, 2020
188 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira
Coorientadora: Gunther Brucha

1. metais pesados. 2. diversidade. 3. comunidade microbiana. 4.
bactérias redutoras de sulfato. 5. biorremediação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Metais em áreas portuárias e sua influência na dinâmica microbiana: da caracterização do problema à tentativa de encontrar soluções

AUTORA: BRUNA DEL BUSO ZAMPIERI

ORIENTADORA: ANA JULIA FERNANDES

COORIENTADOR: GUNTHER BRUCHA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES
Instituto de Biociências / UNESP - Campus do Litoral Paulista



Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA
Instituto de Biociências / UNESP - Campus do Litoral Paulista

Profa. Dra. FLÁVIA MARISA PRADO SALDANHA
Instituto Oceanográfico / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. EDISON BARBIERI
Divisão de Maricultura / Instituto de Pesca - Cananéia/SP



Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar

Rio Claro, 12 de março de 2020

Dedico esse trabalho à minha família que sempre me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer cada um daqueles que se fizeram presentes e contribuíram de alguma maneira para realização desse trabalho durante esses quatro anos. Então, não tem como esse agradecimento ser conciso e direto porque foi gente demais durante essa jornada acadêmica.

O meu primeiro “muito obrigada” vai para minhas companheiras de trabalho durante muitos e muitos anos, desde a iniciação científica e mestrado. Minhas queridas do MICROMAR, Vanessa, Roberta, Mirella, Raphaela e Aline (e todos os integrantes que passaram pelo laboratório). Estivemos juntas em muitas coletas, trabalhos de campo, congressos, por horas e horas processando amostra no laboratório que ficava apertado, mas sempre dávamos nosso jeitinho para caber todo mundo, porque foi sempre assim que gostamos de trabalhar: ouvindo música, dando risada e se ajudando. Foram tantas histórias juntas que seria pretensão demais minha tentar resumir tudo aqui para demonstrar o quanto vocês são importantes para mim e como me ajudaram em todo esse processo. Com certeza, vocês fizeram do laboratório minha segunda casa e os experimentos e processamento de amostra muito mais divertidos. Obrigada Rô e Tops por me acolherem na casa de vocês todas as vezes que precisei de abrigo em São Vicente, por serem amigas tão presentes e por me aguentarem uns dias como inquilina.

Durante o doutorado comecei a fazer partes dos meus experimentos na Unifal em Poços e por lá também fui sortuda em encontrar pessoas que além de ajudar também deixavam leve todo esse processo de experimentos e análises. Elis, Frécia, Juliana, Rafael, Livia e todo pessoal do “Biotech”, muito obrigada por vocês fazerem parte também desse período, além da amizade, mas também por sempre estarem prontos para ajudar com dúvidas na análise de sulfato e sulfeto, análise de metais, curvas de calibração, ou naquelas conferências de cálculos de concentrações intermináveis. Obrigada também por compartilharem das aflições do mundo acadêmico e também das pausas para comer amora no pé. Com certeza vocês foram um presente desse doutorado que vou levar para a vida.

Gostaria de agradecer o pessoal da pós-graduação de Rio Claro, especialmente a Lúcia e a Sheeva, que me abrigaram quando precisei fazer as disciplinas em Rio Claro. Obrigada Van, Lú e Jelena pela companhia durante as disciplinas e pela amizade e

parceria para tomar café, cervejinha ou ir na feirinha de Rio Claro. Vocês foram amigas incríveis que sempre tenho muita saudade.

Gostaria de agradecer muito a Profa Dra Irene Sánchez-Andrea por aceitar me receber em seu laboratório na Wageningen University and Research para realização do meu doutorado sanduíche. Foi uma das melhores experiências da minha vida, onde pude ter a oportunidade de trabalhar em uma das melhores universidades do mundo com muitos recursos, onde eu pude desenvolver grande parte dos dados apresentados nessa tese. Através da sua orientação tive um amadurecimento científico muito grande e com certeza você é um espelho de mulher e pesquisadora que vou me espelhar sempre na continuação da minha carreira profissional. Além disso, me deu a oportunidade de fazer bons amigos no “MicFis”. É tão difícil atravessar o oceano sozinha e sem saber o que encontrar e ser acolhida por pessoas como Iame, Nohemi, Anna, Ivete, Lot, Daan, Peter, Tom. Obrigada por me ajudarem e terem paciência para tantas perguntas no laboratório. Obrigada pelas companhias nos finais de semana, vocês fizeram dos meus dias na Holanda muito mais divertidos.

Gostaria de fazer um agradecimento ao meu marido, Gabriel. Ele que mesmo não entendendo nada de microbiologia sempre teve paciência de me escutar falar sobre bactérias, análises, meus experimentos que deram errado, minhas aflições, meus medos e preocupações. Obrigada por ser a pessoa que sempre insistiu para que eu fizesse o doutorado mesmo quando aquela comodidade bateu e as dificuldades apareceram. Obrigada por ser a pessoa que me apoiou quando eu disse que queria fazer o intercâmbio na Holanda, mesmo que isso significasse uma “separação” de 6 meses. Obrigada por ser esse companheiro que sempre confiou no meu potencial e na minha capacidade.

Meus pais, Cláudio e Rosana, acho que todo o agradecimento do mundo não seria o suficiente para expressar o quanto sou grata a vocês. Vocês que nunca mediram esforços para dar o melhor para mim e para meus irmãos. Vocês que foram os pais que me deram todo o apoio quando eu disse que queria ser Bióloga Marinha lá da UNESP de São Vicente. E que apesar da profissão extremamente “não tradicional” e em uma cidade à 7h de distância da nossa, vocês abriram o sorriso e disseram sim para todas as minhas decisões. Obrigada por me apoiarem na carreira acadêmica, desde o mestrado até agora no final de mais uma etapa. Vocês são meus maiores exemplos e um dos motivos para que eu me dedique em tudo que faço. Muito obrigada! Também agradeço aos meus irmãos Fernanda e Leonardo, meus companheiros de uma vida toda que sempre estão ao meu lado para o que for preciso. Tenho mesmo muito sorte de ter essa família.

Gostaria de agradecer as duas pessoas responsáveis pelos resultados dessa tese e pela profissional que venho me tornando durante esse processo de doutorado. Gostaria de agradecer meu co-orientador, Prof. Dr. Gunther Brucha, por ter me recebido tão bem quando bati em sua porta pedindo sua co-orientação para que eu pudesse trabalhar com as anaeróbias em Poços de Caldas. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório e ter ensinado um pouco desse mundo das anaeróbias para mim. Você também é um exemplo de profissional e pesquisador para mim. Obrigada pela amizade e parceria durante esses anos.

Obrigada querida Profa. Dra. Ana Julia Fernandes, ao todo é quase uma década dessa relação orientada-orientadora, e quanto aprendizado. Lembro quando eu ficava ensaiando para bater na sua porta e pedir um estágio no laboratório, pois te admirava tanto que morria de vergonha e medo de você me falar não. Nos tornamos mais do que orientada-orientadora, nos tornamos amigas. Muito obrigada por todo o conhecimento, por todas as oportunidades que você me deu, por todos os conselhos e puxões de orelha. Com certeza tem muito de você em mim. Você também é um exemplo de mulher forte e determinada que eu quero ser na ciência.

Por fim, gostaria de agradecer as instituições por onde eu passei e que ofereceram a infraestrutura para realização desse trabalho: UNESP – Campus de São Vicente, UNESP – Campus de Rio Claro, UNIFAL – Campus de Poços de Caldas e Wageningen University and Research (WUR). Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que por meio do processo nº 2015/21020-5 liderado pela Profa. Ana Julia, financiou algumas análises moleculares presentes nessa tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADA!

“Don’t stop me now...”
Freddie Mercury

RESUMO

Atividades portuárias são consideradas fontes de contaminação por metais, que em altas concentrações são tóxicos aos microrganismos, podendo mudar o tamanho, a composição e a atividade da comunidade microbiana. Essa pressão seletiva faz com que bactérias desenvolvam mecanismos para combater o estresse causado por eles. Diversos grupos de microrganismos que desenvolvem sistemas de tolerância a metais podem fazer sua biorremediação. Bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem, devido ao seu metabolismo, precipitar metais facilitando sua remoção. A hipótese é que em áreas portuárias exista uma alteração na comunidade microbiana onde são favorecidos microrganismos resistentes, aumentando a chance do isolamento de bactérias resistentes com potencial biotecnológico.

Portanto o objetivo dessa tese foi avaliar a influência da contaminação de metais na comunidade microbiana em áreas portuárias e na seleção de cepas resistentes, e isolar cepas de BRS com potencial biotecnológico. Para isso, foram coletados sedimentos de 2 áreas portuárias (Santos e São Sebastião) e uma área pristina (Ubatuba). Foram caracterizadas variáveis ambientais do sedimento (como pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, porcentagem de matéria orgânica, concentrações de Cr, Cu, Cd e Zn). Foi extraído DNA total do sedimento para caracterização da comunidade utilizando sequenciamento Mi-Seq. Os sedimentos serviram como inóculo para isolamento de cepas que foram submetidas a testes de resistência aos metais. Os sedimentos mais contaminados também serviram como inóculo para enriquecimento de BRS em diferentes concentrações de Cr, Cd, Cu e Zn. Esses enriquecimentos foram monitorados através da redução de sulfato, produção de sulfeto e precipitação de metais. Os enriquecimentos onde houve crescimento de BRS em concentrações altas de metais foram utilizados para isolamento de BRS. As cepas isoladas foram identificadas, caracterizadas quanto as suas exigências nutricionais, resistência aos metais, seu genoma foi sequenciado e os genes envolvidos na resistência aos metais analisados.

Houve diferença significativa na composição microbiana das áreas portuárias com a área pristina. A diversidade foi menor nas áreas portuárias. Alguns grupos demonstraram ser mais sensíveis ao Cu, Zn e Cr como *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* e *Saprospiraceae*; ou filo como *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Plactomyces*. Os metais apresentaram forte influência no

metabolismo nos enriquecimentos de BRS, onde havia maior concentração de metal ocorreu menor porcentagem de remoção de sulfato. Cd e Cu foram os metais que mais influenciaram na atividade de BRS. *Desulfovibrio* foi o gênero de BRS encontrado em maior abundância. Foi isolada a cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, uma nova espécie altamente resistente aos metais testados. A cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, apresenta crescimento rápido e fácil em laboratório. Seu crescimento ótimo ocorre em pH neutro e à 30°C. Apresenta grande versatilidade de crescimento pois utiliza diversos tipos de aceptores e doadores de elétrons.

Portanto, em áreas portuárias existe uma alteração na comunidade microbiana devido a presença de metais onde são favorecidos microrganismos resistentes e onde a diversidade microbiana pode ser comprometida. Nessas áreas foi possível o isolamento de uma cepa de BRS altamente resistente, capaz de realizar a precipitação de metais mesmo em concentrações tóxicas desse componente fazendo com que seu uso futuro para tratamento de efluentes contaminados seja eficiente.

Palavras-chave: metais, comunidade microbiana, diversidade, bactérias redutoras de sulfato, biorremediação.

ABSTRACT

Port activities are considered sources of metal contamination, which in high concentrations are toxic to microorganisms, and can change the size, composition and activity of the microbial community. This selective pressure forces bacteria to develop resistance mechanisms. Several microorganisms groups that develop metal tolerance systems can perform their bioremediation. One example is Sulfate-reducing bacteria (SRB). Because of their metabolism, this group can precipitate metals facilitating their removal. In this way, the hypothesis is that in port areas there is a change in the microbial community where resistant microorganisms are favored, increasing the chance of isolation of resistant bacteria with biotechnological potential.

Therefore, the objective of this thesis was evaluate the influence of metal contamination in the microbial community in port areas and in the selection of resistant strains, and to isolate strains of SRB with biotechnological potential. For this, sediments were collected from two port areas (Santos and São Sebastião) and one pristine area (Ubatuba). Sediment environmental variables were characterized (such as pH, salinity, temperature, dissolved oxygen, percentage of organic matter, concentrations of Cr, Cu, Cd and Zn). Total DNA was extracted from the sediment for community characterization using Mi-Seq sequencing. The sediments was used as inoculum for strain isolation, and the metal resistance was checked. The most contaminated sediments also was used as inoculum for SRB enrichments in different concentrations of Cr, Cd, Cu and Zn. The enrichments were monitored through the measurements of sulfate reduction, sulfide production, and metals precipitation. The enrichments where there was SRB growth even at high metal concentrations were used for isolation of SRB strains. The isolated strains were identified, characterized by their nutritional requirements, resistance to metals, their genome was sequenced and the genes involved in resistance to metals analyzed.

There was a difference in the microbial composition of the port areas in comparison with the pristine area. Diversity was lower in the port areas. Some groups were more sensitive to Cu, Zn and Cr such as *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* and *Saprospiraceae*; or phylum like *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, and *Planctomyces*. The metals had a strong influence on the BRS metabolism presents is the enrichments. The higher was metal concentration in the enrichments, the lower was the percentage of sulfate removal. Cd and Cu were the metals that most influenced SRB activity. *Desulfovibrio* was the SRB genus found in higher

abundance. The strain *Desulfovibrio* sp Fe33 was isolated, a new species highly resistant to the metals tested. This strain presents fast and easy growth in laboratory. Its optimal growth occurs at neutral pH and at 30° C. The strain has growth versatility because it uses several types of electron acceptors and donors.

Therefore, in port areas there is a change in the microbial community due to the presence of metals where resistant microorganisms are favored and where the microbial diversity can be compromised. In these areas, it was possible to isolate a highly resistant SRB strain, capable of precipitating metals even in toxic concentrations of this component. This ability makes its future use, for the treatment of contaminated effluents efficient.

Keywords: metals, microbial community, diversity, sulfate reducing bacteria, bioremediation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fluxograma do projeto durante os 4 anos de execução (M.O. – matéria orgânica; C.O.T. – carbono orgânico total; O.D.- oxigênio dissolvido).....	29
Figura 2 – Zona costeira brasileira.....	30
Figura 3 – Mapa da divisão de acordo com as características socioambientais da zona costeira do estado de São Paulo.....	32
Figura 4- Esquema do gene 16rRNA com suas regiões hipervariáveis de V1a V9.....	40
Figura 5 – Metodologias para análise de comunidades microbianas.....	40
Figura 6 - Metodologia de Sanger esquematizada: 1) Reação: Mistura de iniciadores, DNA molde, DNA polimerase, ddNTPs com fluorocromos; 2) Elongação e terminação da cadeia de DNA; 3) Eletroforese em gel capilar para separação dos fragmentos de DNA; 4) Detecção por laser dos fluorocromos e análise computacional da sequência.....	42
Figura 7- Resumo ilustrativo do sequenciamento na plataforma 454. (a) Preparo da amostra: O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em suas extremidades. Os fragmentos A/B são selecionados para o sequenciamento. (b) PCR em emulsão: Os fragmentos são ligados às microesferas magnéticas por meio do pareamento com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera. Apenas um único tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera. As microesferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas onde a PCR em emulsão ocorre. Milhares de cópias do fragmento alvo são produzidas nessa fase. (c) Sequenciamento: As microesferas ligadas às sequências alvo fita simples são capturadas individualmente em poços no suporte de sequenciamento. São fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento, e o sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada, em cada poço de sequenciamento.....	47
Figura 8- Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina. O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento (C), no	

primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como primer (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada cluster (L).....45

Figura 9 – Principais processos de biorremediação de metais desenvolvidos por microrganismos: a) Esquema simplificado do mecanismo de resistência por detoxificação enzimática de metais para formas menos tóxicas onde o mercúrio é transformado a través de ação enzimática para sua forma menos tóxica; b) Precipitação de metais por bactérias redutoras de sulfato, onde o sulfato é utilizado como aceptor de elétrons para quebra de lactato e produz sulfeto, o sulfeto quando combinado, por exemplo, ao mercúrio se transforma em sulfeto de mercúrio que é insolúvel e acaba precipitando. Fonte: da autora.....50

Figura 10– Esquema demonstram o metabolismo de BRS. Elas utilizam sulfato (S_4^{-2}) como aceptor final de elétrons para realizar a degradação da matéria orgânica $(CH_2O)_N$, o que resulta na produção de sulfeto (H_2S). O sulfeto no ambiente pode se combinar com diferentes tipos de metais (Cobre (Cu); Mercúrio (Hg); Zinco (Zn); Cromo (Cr); cádmio (Cd)) formando diferentes tipos de sulfeto metálico (CuS ; ZnS ; Cr_2S_3 ; CdS ; HgS) que são insolúveis e precipitam.....51

Figura 11 - Mapa do Brasil mostrando a localização do estado de São Paulo e, em detalhe as 3 áreas de estudo: zona estuarina de Santos – São Vicente (A); zona costeira de São Sebastião (B) e a Praia da Fazenda localizado no município de Ubatuba.....57

Figura 12 – Imagens aéreas do Porto de Santos.....58

Figura 13 – Fotos áreas do porto de São Sebastião.....	59
Figura 14 – Imagem da Praia da Fazenda, Ubatuba (SP).....	60
Figura 15- Imagem do kit de filtração utilizado para realização da contagem de bactérias heterotróficas.....	63
Figura 16 – Imagem capturada no microscópio de epifluorescência das células bacterianas florescendo em azul sob luz ultravioleta.....	64
Figura 17 – Crescimento de colônias após o processo de esgotamento.....	65
Figura 18 – Teste de resistência aos diferentes metais.....	66
Figura 19 – Temperatura (°C) encontrada nas áreas de coleta durante o verão e o inverno.....	72
Figura 20 – Porcentagem de matéria orgânica (M.O.) nas três áreas de coleta.....	73
Figura 21 – Análise granulométrica das três áreas de estudo (Ubatuba (a); São Sebastião (b); Santos (c)), mostrando a composição (%) do sedimento em grânulos, areia muito grossa, areia grossa, areia média, areia fina, areia muito fina, silte e argila.....	73
Figura 22 – Boxplot com as porcentagens de carbono orgânico total (COT) para as três áreas de amostragem (São Sebastião, Santos e Ubatuba).....	74
Figura 23 – Densidade de <i>Enterococcus</i> sp nos pontos de coleta no verão em Ubatuba (UBA V); inverno em Ubatuba (UBA I); verão em São Sebastião (SS V); inverno em São Sebastião (SS I); e verão em Santos (S V) e inverno em Santos (S I). Os valores estão expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de sedimento.....	76
Figura 24 – Densidade bacteriana média em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de sedimento, em Ubatuba (a), São Sebastião (b) e Santos (c).....	77
Figura 25 – Médias de bactérias heterotróficas (células x 10 ⁶ por grama de sedimento) encontradas para as áreas de Ubatuba (a), São Sebastião (b) e Santos (c) no verão e no inverno.....	78

Figura 26 - Gráfico de colunas empilhadas a 100% das abundâncias relativas das bactérias dominantes e dos filos de archaea derivadas dos genes 16SrRNA dos três locais de amostragem (Ubatuba, São Sebastião e Santos).....	79
Figura 27 - Dendograma mostrando um agrupamento hierárquico de amostras com base em classificações de nível familiar. O gráfico de barras abaixo de cada amostra mostra a abundância relativa de suas classificações de nível familiar nas três regiões de coleta (Ubatuba - U; São Sebastião - S; Santos - P) durante o verão (V) e inverno (I).....	81
Figura 28- Análise de correspondência canônica mostrando a correlação entre composição bacteriana em nível de gênero (sequenciados através do gene 16S rRNA) e variáveis ambientais (COT, MO, temperatura, contaminação orgânica, salinidade), concentrações de metais (Cd, Cu, Cr e Zn) e características das comunidades (densidade de bactérias, índice de riqueza e diversidade) em cada local (Santos (ponto); São Sebastião (praça) e Ubatuba (triângulo)) durante o inverno (cor azul) e verão (cor vermelha).....	82
Figura 29- Análise LefSe da abundância de bactérias entre diferentes regiões (São Sebastião-SS; Santos-SA; Ubatuba-UBA).....	83
Figura 30 – Mapa de calor com os valores de correlação de Spearman dos principais filos encontrados com as concentrações dos metais (cobre (Cu), cromo (Cr), zinco (Zn) e cádmio (Cd) e valores de contaminação orgânica encontrados.....	84
Figura 31 – Análise de componente principal mostrando a relação entre variáveis ambientais (COT, MO, temperatura, contaminação orgânica, salinidade), concentrações de metais (Cd, Cu, Cr e Zn) e tipos importantes de fisiologia microbiana em cada local (Santos (ponto preto); Sebastião , (quadrado azul) e Ubatuba (triângulo verde).....	85
Figura 32 – Porcentagem de espécies de cepas resistentes isoladas e identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	86
Figura 33 – Pluma de contaminantes no Porto de Santos visualizada durante coleta de sedimento.....	96
Figura 34 – Terminais portuários exclusivos de indústrias localizadas nos arredores do Porto de Santos.....	97

Figura 35 – Mapa da região de coleta mostrando os 5 pontos ao longo do Porto de Santos –SP (Brasil).....	98
Figura 36 – Design experimental do enriquecimento com diferentes concentrações de cádmio, cobre, cromo e zinco.....	100
Figura 37 - Espectrômetro de absorção atômica com chama utilizado no presente trabalho.....	102
Figura 38 - Gráficos de remoção de sulfato (%) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d), durante 49 dias.....	105
Figura 39 – Gráficos de produção de sulfeto (mg/L) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d).....	105
Figura 40 – Gráficos de remoção de sulfato (%) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d).....	106
Figura 41 – Gráficos de produção de sulfeto (mg/L) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d).....	107
Figura 42 – Porcentagem relativa de ácidos produzidos ao final do experimento de 28 dias, nos enriquecimentos com diferentes concentrações de Zn (Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM), Cr (Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM), Cu (Cu1- 0,3 mM; Cu2; 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM; Cu4- 5,0 mM) e Cd (Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3; 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM).....	109
Figura 43– Porcentagem de precipitação dos metais nos enriquecimentos de Cd (1- 0,2mM; 2-0,3mM, 3- 0,4mM e 4 -0,5mM), Cr (1-0,4mM; 2- 4mM, 3- 7mM e 4 -13 mM), Zn (1-0,3 mM; 2-0,8 mM, 3- 6mM e 4 - 10mM) e Cu (1-0,2mM; 2- 1,3mM, 3- 3mM e 4 -5mM).....	110
Figura 44 – Abundância de filos e famílias no sedimento do porto de Santos utilizado como inóculo nos enriquecimentos.....	111
Figura 45 – Porcentagem dos grupos de bactérias redutoras de sulfato presentes no sedimento do Porto de Santos que serviram de inóculo para enriquecimento com metais nas triplicatas (Sed1, Sed2 e Sed3).....	111

Figura 46 - Mapa de calor mostrando a abundância de diferentes gêneros encontrados nas amostras de cada um dos enriquecimentos (As legendas dos enriquecimentos indicam as concentrações iniciais de cada metal: Cu1- 0,3 mM; Cu2; 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM; Cu4- 5,0 mM; Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3; 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM; Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM; Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM). As cores verdes escuras indicam maiores abundâncias.....112

Figura 47 – Análise de agrupamento de comunidades bacterianas encontrada nos diferentes enriquecimentos (em cada triplicata) com base na matriz de dissimilaridade "Bray-Curtis". As legendas dos enriquecimentos indicam as concentrações iniciais de cada metal: Cu1- 0,3 mM; Cu2; 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM. Cu4- 5,0 mM; Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3; 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM; Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM; Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM.....113

Figura 48 – Design experimental do processo de isolamento.....126

Figura 49 – Placa com crescimento de BRS que tem como característica a coloração preta devido a reação do sulfeto (produzido pelas BRS) com o FeCl_2 adicionado ao meio de cultura.....127

Figura 50 – Porcentagem de remoção de sulfato nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de Cr (a), Cd (b), Cu (c) e Zn (d). CP indica o controle positivo (meio somente com inóculo e sem adição de metais) e CN o controle negativo (meio sem inóculo com adição de metais).....131

Figura 51 – Árvore filogenética baseada na análise da sequência 16S rDNA, mostrando a localização filogenética das cepas isoladas no presente estudo. A árvore foi construída pelo método estatístico “Neighbor-joining”, e *Methanlobus bombayensis* foi usado como grupo externo.....131

Figura 52 - Padrões dos clones após serem cortados pelas enzimas de restrição ECOR I e KPNL (1A, 1H, 2B, 4F, 4H, 7H, 8C, 9D, 9A, 9E, 4H e 6F foram os clones que apresentaram padrões diferentes e foram sequenciados para certificação que o DNA presente era da cepa isolada).....133

Figura 53 – Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de zinco (0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0). É possível visualizar o precipitado preto devido a produção

de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado

escuro.....134

Figura 54 - Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de cromo (0,1; 0,5; 1,5; 3,0 mM). É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro..135

Figura 55 - Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de cobre. É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro.....136

Figura 56 - Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de cádmio. É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro.....137

Figura 57 – Concentração de piruvato, sulfato e dos metais (Zn, Cr, Cd e Cu) durante os ensaios de 28 dias de fermentação.....138

Figura 58 – Gráfico realizado com os dados da anotação genômica mostrando as porcentagens das principais categorias de genes encontrados no genoma da *Desulfovibrio* sp Fe33. No detalhe estão as porcentagens de grupos genes encontrados dentro da categoria dos subsistemas envolvidos na Defesa e Virulência da célula.....140

Figura 59 – Imagem da cultura de *Desulfovibrio* sp Fe33 sob microscópio de luz em aumento de 100x.....152

Figura 60 – Curva de crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, com o consumo de sulfato e lactato e produção de sulfeto e acetato.....153

Figura 61- Curva do crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 em faixas de temperaturas que variaram de 15 à 45°C durante 200h.....156

Figura 62 - Curva do crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 em diferentes condições de pH (5,0 – 9,0) durante 180h.....157

Figura 63 - Curva do crescimento da cepa <i>Desulfovibrio</i> sp Fe33 em faixas de salinidade que variaram de 0 à 5% durante 180h.....	158
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de metais em $\mu\text{g g}^{-1}$ em diferentes regiões portuárias.....	34
Tabela 2 – Lista de estudos utilizando métodos independente de cultura em ambientes marinhos.....	37
Tabela 3 – Coordenadas dos pontos de coletas nas três áreas de amostragem (São Sebastião, Ubatuba e Santos) georreferenciados por GPS.....	61
Tabela 4 – Dados físico-químicos de São Sebastião, Ubatuba e Santos durante as coletas de verão e inverno.....	71
Tabela 5 – Concentrações medias encontradas nos pontos de amostragem parra Zinco, Cromo, Cobre e Cadmio expressos em mg/kg de sedimento.....	75
Tabela 6 - Índice de diversidade alfa (Simpson, Shannon, Chao-I e Dominância), número de sequências e OTUs para as três áreas de estudo: Ubatuba, São Sebastião e Santos, durante o verão (V) e inverno (I).....	79
Tabela 7 - Porcentagens de cepas resistentes em cada uma das áreas de coleta.....	85
Tabela 8 – Porcentagem de tolerância das cepas testadas em diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr e Zn.....	86
Tabela 9 – Dados físico-químicos nos 5 pontos de amostragem durante a coleta de amostras.....	104
Tabela 10 – Concentração de metais (Zn, Cr, Cd e Cu) em $\mu\text{g/mg}$ de sedimento para cada um dos pontos de amostragem.....	104
Tabela 11 – Ácidos produzidos (mg/L) nos enriquecimentos com diferentes concentrações de Zn (Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM), Cr (Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM), Cu (Cu1- 0,3 mM; Cu2; 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM; Cu4- 5,0 mM) e Cd (Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3; 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM).	108

Tabela 12 – Porcentagem de similaridade através do método de distância Neighbor-Joining.....	132
Tabela 13 – Comparação da sequência completa do genoma da cepa <i>Desulfovibrio</i> sp FE33 com a espécie filogeneticamente mais próxima (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>)....	132
Tabela 14 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de zinco.....	134
Tabela 15 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de cromo.....	135
Tabela 16 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de cobre.....	136
Tabela 17 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de cádmio.....	137
Tabela 18 – Concentrações tóxicas de metais (mM) que inibem o crescimento de BRS, encontrados na literatura.....	138
Tabela 19 – Genes envolvidos na resistência a metais da cepa <i>Desulfovibrio</i> sp Fe33 e a comparação da presença desses genes em outras bactérias redutoras de sulfato.....	141
Tabela 20 – Caracterização do novo isolado <i>Desulfovibrio</i> sp Fe33, em comparação com espécies filogeneticamente mais próximas (<i>D. desulfuricans</i> , <i>D. dechloracetivorans</i> , <i>D. caledoniensis</i>).....	154

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ANI – Average nucleotide identity

ARDRA – Análise de Restrição do rDNA amplificado

As- Arsênio

BRS – Bactérias redutoras de sulfato

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CdSO₄ – Sulfato de cádmio

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CEGH-CEL – Centro de Estudos do Genoma Humani e Células-tronco

CIRM- Comissão Interministerial para Recursos do Mar

CMI – Concentração Mínima Inibitória

Co- Cobalto

CO₂ – Gás carbônico

COT – Carbono Orgânico Total

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr – Cromo

CrSO₄ – Sulfato de cromo

Cu – Cobre

CuSO₄ – Sulfato de cobre

DDH – Hibridização DNA-DNA

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DsDech – *Desulfovibrio dechloroacetivorans*

DsDesu – *Desulfovibrio desulfuricans*

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

FAME – Ácido graxo metil ester

Fe – Ferro

FID – Detector de ionização em chama

GGCD – Calculadora de distância de genoma para genoma

H⁺ - Íon hidrogênio

HAP – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Hg – Mercúrio

H₂O – água

HS⁻ - Sulfeto de hidrogênio

ICP-AES - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

KH_2PO_4 – Fosfato monopotássico

LEFse – LDA effect size

MgCl_2 – Cloreto de magnésio

N_2 - Nitrogênio

Mn- Manganês

MO – Matéria Orgânica

NaCl – Cloreto de sódio

Na_2PO_4 – Fosfato dissódico

NCBI – National Center of Biotechnology Information

NH_4Cl – Cloreto de amônio

Ni – Níquel

NMP - Número mais provável

OD – Oxigênio Dissolvido

OTU – Operational Taxonomic Unit

Pb- Chumbo

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PLFA – Perfil dos ácidos graxos fosfolipídicos

PNUMA – Programa das Nações Unidas pelo Meio Ambiente

RAPD – Amplificação aleatória de DNA polimórfico

RISA – Análise do espaço ribossomal intergênico

RMBS – Região Metropolitana da Baixada Santista

SA – Santos

S^{2-} - Íons enxofre

Se – Selênio

SO_4^{2-} - Íons sulfato

SS – São Sebastião

SSCP – Polimorfismo conformacional de fita simples

TAE – tampão TRIS- Acetato- EDTA

TE – tampão TRIS - EDTA

TEBAR – Terminal Marítimo Almirante Barroso

TEB – Tampão TRIS/EDTA/Borato

TGGE – Eletroforese em gel de gradiente de temperatura

UBA - Ubatuba

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Zn – Zinco

ZnSO₄ – Sulfato de zinco

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Estruturação da tese.....	25
1.1 Introdução.....	25
1.2.Objetivos.....	28
1.2.1. Objetivos geral.....	28
1.2.2. Objetivo específico.....	28
1.3.Fluxograma.....	29
 Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica.....	30
2.1.Panorama sobre a área costeira e portuária.....	30
2.1.1. Áreas Costeiras Brasileiras.....	30
2.1.2. Zonas portuárias e a contaminação por metais.....	33
2.2.Diversidade bacteriana.....	35
2.2.1. Diversidade de microrganismos em áreas costeiras.....	35
2.2.2. Estudo sobre a diversidade bacteriana no ambiente marinho brasileiro.....	36
2.2.3. Metodologias para acessar a diversidade microbiana.....	38
2.3.Impacto da poluição por metais na comunidade microbiana.....	47
2.4.Resistência bacteriana a metais e suas aplicações.....	48
2.5.Bactérias redutoras de sulfato.....	51
 Capítulo 3 - Contaminação por metais em áreas portuária e sua relação com a comunidade microbiana: a poluição dessas áreas pode mudar a comunidade microbiana?.....	53
3.1. Resumo.....	53
3.2. Abstract.....	54
3.3. Introdução.....	55
3.4. Material e Métodos.....	56
3.4.1. Área de Estudo.....	56
3.4.2. Coleta de amostras.....	60
3.4.3. Análises físico-químicas do sedimento.....	61
3.4.4. Determinação da contaminação orgânica.....	62
3.4.5. Determinação da concentração de metais.....	62

3.4.6. Contagem direta por epifluorescência.....	63
3.4.7. Processamento de amostras para isolamento de bactérias heterotróficas – análise das cultiváveis.....	64
3.4.8. Teste de resistência a metais.....	65
3.4.9. Identificação molecular das cepas isoladas.....	66
3.4.10. Análise da comunidade microbiana.....	68
3.4.11. Análise dos resultados.....	69
3.4.12. Análise estatística.....	70
3.4.13. Armazenamento das cepas isoladas com potencial biotecnológico.....	70
3.5. Resultados.....	71
3.5.1. Variáveis ambientais.....	71
3.5.2. Contaminação orgânica.....	75
3.5.3. Análise da comunidade microbiana.....	76
3.5.4. Resistência aos metais.....	85
3.5.5. Identificação das cepas isoladas.....	86
3.6. Discussão.....	87
3.7. Conclusão.....	91

Capítulo 4 - Efeito dos Metais em Enriquecimentos de Bactérias Redutoras de

Sulfato.....	92
4.1. Resumo.....	92
4.2. Abstract.....	93
4.3. Introdução.....	94
4.4. Material e métodos.....	96
4.4.1. Área de estudo.....	96
4.4.2. Coleta de amostras.....	98
4.4.3. Variáveis ambientais.....	98
4.4.4. Quantificação de bactérias redutoras de sulfato.....	99
4.4.5. Enriquecimento de bactérias redutoras de sulfato resistente a metais.....	100
4.4.6. Análise de metais.....	101
4.4.7. Análise dos ácidos orgânicos.....	102
4.4.8. Análise da comunidade microbiana.....	102

4.5. Resultados	103
4.5.1. Dados físico-químicos.....	103
4.5.2. Quantificação de bactérias redutoras de sulfato e análise do enriquecimento.....	104
4.5.3. Análise da comunidade bacteriana.....	110
4.6. Discussão.....	113
4.7. Conclusão.....	118

Capítulo 5 - Uma Nova Espécie de *Desulfovibrio* Altamente Resistente a Metais: Nível de Tolerância e Genes Envolvidos na Resistência.....

5.1. Resumo.....	120
5.2. Abstract.....	121
5.3. Introdução.....	122
5.4. Material e Métodos.....	124
5.4.1. Enriquecimento.....	124
5.4.2. Monitoramento da atividade de BRS.....	124
5.4.3. Isolamento de BRS.....	126
5.4.4. Identificação das cepas isoladas e reconstrução filogenética.....	127
5.4.5. Sequenciamento e análise do genoma.....	128
5.4.6. Teste de resistência a metais da cepa isolada.....	129
5.5. Resultados.....	130
5.5.1. Redução de sulfato nos enriquecimentos.....	130
5.5.2. Filogenia e identificação dos isolados.....	131
5.5.3. Análise de resistência aos metais.....	133
5.5.4. Análise do genoma e dos genes de resistência encontrados.....	140
5.6. Discussão.....	142
5.7. Conclusão.....	146

Capítulo 6 - Caracterização da *Desulfovibrio* Sp Fe33– Uma Bactéria Redutora de Sulfato Resistente a Metais.....

6.1. Resumo.....	147
6.2. Abstract.....	148
6.3. Introdução.....	149
6.4. Material e Métodos.....	150

6.4.1. Caracterização morfológica e bioquímica.....	150
6.4.2. Caracterização fisiológica.....	150
6.5. Resultados e Discussão.....	152
6.6. Conclusão.....	158
Capítulo 7 – Considerações Finais.....	160
8. Referências.....	163
ANEXO 1.....	186
ANEXO 2.....	187
ANEXO 3.....	188

CAPÍTULO 1

Estruturação da tese

1.1 INTRODUÇÃO

A poluição nos ecossistemas costeiros se tornou um sério problema ambiental em várias partes do mundo, afetando diversos países (ELOFSSON *et al.*, 2003).

Em geral toda a orla marítima está sujeita a vetores de desenvolvimento em franco processo de expansão, dentre os quais destacam-se o turismo, a aquicultura, a implantação de parques eólicos, as grandes estruturas industriais, portuárias e logísticas, ligadas, sobretudo, à exploração petrolífera “offshore”, e seus efeitos multiplicadores, como os produzidos pela descoberta e exploração da Formação Pré-Sal. Tais atividades, tem contribuído para acelerar a expansão urbana irregular, com todos os problemas e impactos dela decorrentes, como o lançamento de esgotos e efluentes industriais (MMA, 2017).

Atividades portuárias são consideradas fonte importante de contaminação para o ambiente marinho, devido ao lançamento de hidrocarbonetos e derivados, poluição por substâncias tóxicas decorrentes de tintas anti-incrustantes, perdas durante operações de carga e descarga de “containers”. Além do tráfego constante de navios que também faz com que exista a necessidade de dragagens contínuas de sedimentos para manter a profundidade do canal, causando a ressuspensão de contaminantes depositados nesses sedimentos (ABESSA *et al.*, 2008).

Dentre os contaminantes mais sérios e persistentes estão os metais (DUFFUS, 2002). Os metais ocorrem naturalmente nos solos e alguns deles, tais como cobre (Cu), zinco (Zn) e cobalto (Co), desempenham importante papel na nutrição de plantas e animais, enquanto outros, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As) e selênio (Se), exercem efeitos deletérios sobre vários componentes da biosfera (ALLOWAY, 1995). Os aumentos nas concentrações de metais no ambiente devido às atividades poluidoras vêm se destacando mundialmente no cenário de poluição ambiental.

O compartimento marinho mais afetado em relação a essa contaminação é o sedimento. Os metais são retidos nos sedimentos por causa das condições anaeróbicas aliadas a outras condicionantes (granulometria fina, pH ácido, entre outros), além de serem tipicamente redutores, aprisionando metais (TAM & WONG, 2000).

Metais podem influenciar toda a biota presente nesse compartimento, inclusive microrganismos, que estão presentes em grandes densidades, e que acabam sendo o

primeiro passo de transferência de substâncias tóxicas para níveis tróficos superiores (POOLE & GADD, 1989).

Metais apresentam papel importante nos processos que envolvem microrganismos. Metais como cálcio, zinco, níquel, ferro, potássio, magnésio, manganês, cobalto são nutrientes essenciais em baixas concentrações. Esses elementos participam de reações bioquímicas de catálise, estabilizadores de proteínas e da parede celular bacteriana, além de manter o balanço osmótico da célula (HUGHES & POOLE, 1980; POOLE & GADD, 1989; JI & SILVER, 1995). Em contrapartida, metais em altas concentrações são tóxicos aos microrganismos pois podem causar alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas, além de interferir na fosforilação oxidativa e balanço osmótico (POOLE & GAD, 1989).

Portanto, metais podem mudar o tamanho, a composição e a atividade da comunidade microbiana (GILLER, 1998). O estresse abiótico causado por metais, nas suas formas orgânica e inorgânica, pode afetar o crescimento, a morfologia e o metabolismo de bactérias (IMCHEN *et al.*, 2018; HUA *et al.*, 2017). O impacto dos metais na diversidade microbiana tem sido um tópico de crescente preocupação ambiental, uma vez que os microrganismos são grandes responsáveis pelos ciclos biogeoquímicos e, dessa maneira, pelo bom funcionamento do ecossistema (DASH *et al.*, 2013). E especialmente no Brasil, se tem pouco conhecimento do quanto essas comunidades microbianas são afetadas pelo impacto e poluição antrópica quando comparado a áreas ainda preservadas.

Além disso, a presença de metais no ambiente causam pressão seletiva em bactérias que acabam desenvolvendo mecanismos para combater o estresse causado por eles. Esses mecanismos incluem a formação e fixação desses metais em complexos, redução de um metal a uma espécie menos tóxica ou efluxo direto de metais para fora da célula (NIES, 1999; OUTTEN *et al.*, 2000). Portanto, bactérias que crescem em ambiente contaminado por esses poluentes desenvolvem sistemas de tolerância, podendo ser utilizadas como indicadoras de contaminação por metais (DIAZ-RAVINA & BAATH, 1996).

Existem diversos grupos de microrganismos que, quando desenvolvem esses sistemas de tolerância a metais, podem ser aliados na descontaminação de áreas afetadas por esse tipo de poluição. Como exemplo temos as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (MUYSER & STAMS, 2008).

As bactérias redutoras de sulfato compreendem um grupo de microrganismos anaeróbios que através de seu metabolismo usam sulfato como aceptor de elétrons no processo de oxidação de compostos orgânicos, gerando sulfeto. Em locais com concentrações altas de metais, o sulfeto se liga aos mesmos formando sulfeto metálico. Sulfetos metálicos são insolúveis e precipitam naturalmente, facilitando assim sua separação e retirada de efluentes ou resíduos contaminados (CASTRO *et al.*, 2000).

Muitos estudos têm sido realizados para empregar o uso de BRS em reatores com o objetivo de precipitar metais em efluentes industriais (BIJMANS *et al.*, 2011; PAULO *et al.*, 2015). Entretanto, muitas vezes o processo é prejudicado pois esses microrganismos acabam não sendo tão tolerantes a concentrações tóxicas de metais presentes nesses efluentes (FANG & HUI, 1994).

Dessa maneira, encontrar microrganismos resistentes se torna ainda mais relevante nessa busca de solução para esse problema ambiental. As áreas portuárias são áreas onde, geralmente, existe uma contaminação a longo prazo e onde a comunidade microbiana como um todo foi exposta a esse tipo de toxicidade. Dessa maneira, existe a hipótese de que nessas áreas seja possível visualizar como a comunidade microbiana se adapta e muda sua composição para sobreviver a esse tipo de estresse ambiental e também no qual são favorecidos microrganismos resistentes aumentando a chance do isolamento de bactérias potenciais para serem usadas em aplicações biotecnológicas para a remediação de locais e efluentes contaminados por metais.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da contaminação de metais na composição e na dinâmica da comunidade bacteriana em áreas costeiras e na seleção de cepas resistentes a metais, podendo isolar cepas com potencial biotecnológico.

1.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as áreas de estudo (Porto de Santos, porto de São Sebastião e praia da Fazenda em Ubatuba) em relação aos parâmetros físico-químicos, ambientais e de contaminação orgânica e inorgânica;
- Analisar a abundância e diversidade bacteriana em diferentes níveis de contaminação por metais, isolando e identificando, através de testes bioquímicos e moleculares, bactérias cultiváveis e não cultiváveis, presentes nas áreas de estudo;
- Verificar a resistência a metais com as cepas de bactérias isoladas nas áreas de estudos;
- Identificar fatores que contribuem para seleção, através da correlação dos dados encontrados com variáveis ambientais e com os níveis de contaminação orgânica e por metais;
- Enriquecer e isolar espécies de bactérias redutoras de sulfato (BRS) resistente a metais e com potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação;

1.3. FLUXOGRAMA

A figura 1 apresenta o fluxograma das atividades realizadas durante o doutorado para atender os objetivos mencionados anteriormente. Após a coleta de dados e caracterização do sedimento o projeto foi dividido em duas partes, uma com intuito de analisar *in situ* como a comunidade microbiana muda de acordo com concentração de metais em áreas portuárias assim como seu perfil de resistência e uma segunda parte que utiliza o sedimento contaminado de áreas portuárias para tentar isolar grupos de bactérias importantes para processos biotecnológicos de remoção dos metais.

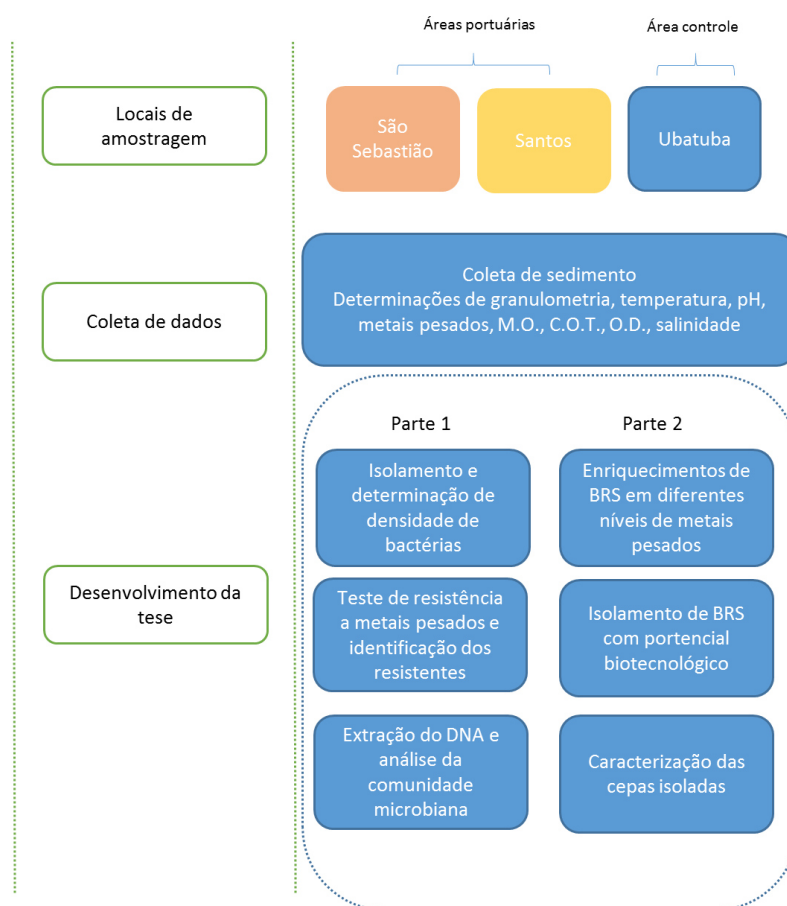


Figura 1- Fluxograma do projeto durante os 4 anos de execução (M.O. – matéria orgânica; C.O.T. – carbono orgânico total; O.D.- oxigênio dissolvido).

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PANORAMA SOBRE ÁREAS COSTEIRAS E PORTUÁRIAS

2.1.1. Áreas Costeiras Brasileiras

A zona costeira brasileira apresenta-se com mais de 8500 km de extensão (Figura 2). A região abrange 17 estados, e sua faixa continental abriga 13 das 27 capitais brasileiras, incluindo algumas das principais regiões metropolitanas, onde vivem milhões de pessoas (MMA, 2017).



Figura 2 – Zona costeira brasileira

(Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Litoral_do_Brasil#/media/File:Br%C3%A9sil_-_ZEE_et_plateau_continental_.jpeg)

Ao longo dessa faixa litorânea é possível identificar uma grande diversidade de paisagens como dunas, ilhas, recifes, costões rochosos, baías, estuários, brejos e falésias. Dependendo da região, o aspecto é totalmente diferente do encontrado a poucos quilômetros de distância. Mesmo os ecossistemas que se repetem ao longo do litoral - como praias, restingas, lagunas e manguezais - apresentam diferentes espécies animais e vegetais. Isso se deve, basicamente, às diferenças climáticas e geológicas (WWF, 2017).

A concentração populacional indica alto grau de intervenção humana (ou antrópica) nos recursos naturais do bioma. Segundo dados da Comissão Interministerial para Recursos do Mar (CIRM), aproximadamente um quarto da população brasileira vive na zona costeira, somando 50 milhões de habitantes. Esse fator já traz indícios de que as áreas costeiras sofrem inúmeros impactos ambientais. Apesar disso, a zona costeira brasileira constitui uma região de transição ecológica e desempenha importante papel no desenvolvimento e reprodução de espécies, bem como nas trocas genéticas entre os ecossistemas terrestres e marinhos (MMA, 2017).

De acordo com o documento Panorama Global da Biodiversidade, lançado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), ecossistemas costeiros e marinhos continuam sofrendo a redução de sua extensão, ameaçando uma de suas funções básicas imprescindíveis, a absorção de dióxido de carbono (CO_2) da atmosfera, fundamental na mitigação das mudanças climáticas globais.

Além de acolher uma ampla variedade de seres vivos, esses ecossistemas proporcionam serviços essenciais à sobrevivência humana, como alimentos, manutenção do clima, purificação da água, controle das inundações e proteção costeira, bem como o turismo e lazer.

No Estado de São Paulo, a Zona Costeira apresenta uma extensão de 700 km e uma área de cerca de 27.000 km², incluindo 36 municípios e abrigando a maior parte da Mata Atlântica existente no Estado. De acordo com as características socioambientais, a zona costeira paulista foi dividida em quatro setores: Litoral Norte, Baixada Santista, Complexo Estuarino-Lagunar de Iguape-Cananéia e Vale do Ribeira (SMA, 2017) (Figura 3).

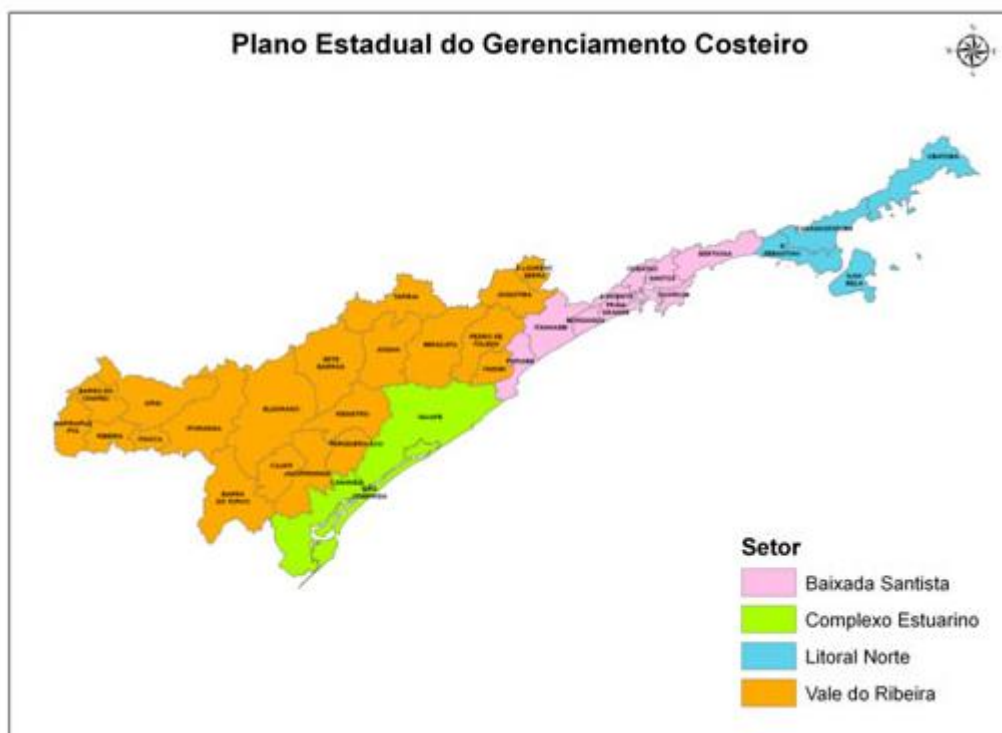


Figura 3 – Mapa da divisão de acordo com as características socioambientais da zona costeira do estado de São Paulo (<http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/zoneamento/gerenciamento-costeiro/>)

A Baixada Santista abrange os municípios de Bertioga, Guarujá, Santos, São Vicente, Cubatão, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe. Concentra o parque industrial de Cubatão e o complexo portuário de Santos, e se caracteriza pela grande diversidade de funções presentes nos municípios que a compõem – seja no campo produtivo, no de consumo ou no de habitação. Em nível estadual, destaca-se no setor industrial e de turismo e, em nível regional, nas atividades relativas à construção civil, à pesca, aos comércios atacadista e varejista, ao atendimento à saúde, educação e transporte e ao sistema financeiro. As atividades de suporte ao comércio de exportação, originadas pela proximidade do complexo portuário, também têm presença marcante na região (SMA, 2017).

O Litoral Norte abrange os municípios de São Sebastião, Ilhabela, Caraguatatuba e Ubatuba e caracteriza-se pela diversidade de recursos naturais e elevado potencial turístico, que podem ser ameaçados em decorrência da intensa especulação imobiliária, do parcelamento irregular do solo, da pesca predatória e das estruturas náuticas e atividades portuárias em desconformidade com relação à conservação dos recursos marinhos (SMA, 2017).

Portanto, é evidente, que essas áreas costeiras se apresentam como prioritárias para realização de estudos técnicos e científicos devido a sua importância ecológica e econômica e ao mesmo tempo, por sofrerem inúmeros impactos ambientais e ameaças ao seu ecossistema e biodiversidade (MMA, 2010).

2.1.2. Zonas Portuárias e contaminação por metais

As áreas portuárias são áreas extremamente importantes do ponto de vista econômico. Através delas, escoam-se grande parte da produção da indústria e da agropecuária de um país. Dessa maneira, estas áreas apresentam grande movimentação de embarcações e proximidade a grandes adensamentos populacionais e de indústrias (DEGRASSI, 2001).

Os portos marítimos são sempre fontes significativas de poluição ambiental devido ao fato de que suas atividades estão associadas a uma contaminação particular dos ambientes aquáticos, especialmente o sedimento. Os contaminantes entram no meio aquático através do tráfego de embarcações, carregamento de “containers”, reparos e dragagem, além do escoamento da água da chuva, descarga de efluentes, entre outros (GUERRA-GARCIA, 2005). Além disso, o movimento contínuo de navios e o intenso tráfego em uma área confinada aumentam a frequência de acidentes, muitas vezes causando risco de liberação de materiais perigosos na área portuária (TROZZI, 2000).

Estudos recentes tentam avaliar a qualidade ambiental de áreas portuárias para regulação e manejo dessas áreas uma vez que sustentabilidade ecológica e a produtividade biológica dos ecossistemas costeiros e marinhos dependem em grande parte da qualidade da água costeira. Acredita-se que as regiões costeiras tenham uma biodiversidade mais rica do que as regiões oceânicas abertas (JAHAN & STREZOV, 2017).

Ao redor do mundo todas as áreas portuárias sofrem com contaminação. Diversos estudos mostram que áreas portuárias são frequentemente associadas a poluição aquática e servem como dispersores de contaminação para diversos contaminantes (RIBA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007; BURUAEM, 2012).

De todos os contaminantes, os metais têm sido considerados dos mais preocupantes, devido às suas toxicidades e à capacidade de se acumular no ambiente. Buruaem *et al.* (2012) demonstraram em várias regiões portuárias ao redor do mundo os níveis de metais encontrados e é possível encontrar altos níveis para vários metais em vários dos portos estudados (tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes regiões portuárias.

Localização	Hg	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Autor
Porto de Victoria	-	2,61-3,333	57,5-601,2	45-3789,5	23,6-177,1	47,4-138,1	97,9-610,4	A
Porto de Rotterdam	<0,2-0,8	<0,5-1,8	-	<5-40	<5-20	<10-60	15-190	B
Porto de Montevideo	0,6-1,3	<1,0-1,6	79-253	59-135	26,34	44-128	174-491	C
Porto de Barcelona	-	4-1,4	45-95	70-195	18-27	85-130	180-300	D
Porto de Ceuta	-	-	13-381	5-865	8-671	10-516	29-696	E
Sistema Estuarino de Santos	<0,03-0,92	<0,5-1,49	<5,0-97,5	-	1,3-44,2	<2,0-204,8	6,0-312,0	F
Sistema Estuarino de Vitoria	0,03-0,82	-	35-280	5-660	6-245	5-292	27-812	G
Sistema Estuarino de Paranagua	-	<0,001	14,5-58,0	<0,04-16,20	6,65-21,90	<0,30-29,75	26,95-80,50	H
Porto de Santos	0,04-0,64	<0,6	26,31-42,74	9,01-27,28	10,88-22,28	7,57-16,7	509,08-1077-33	I
Porto de Mucuripe	<0,03-0,04	<0,60-1,41	3,33-50,13	0-19,76	<2,0-21,49	<2,00-3,58	25,05-583,51	I
Porto de Pecém	<0,03-0,04	<0,60-1,28	17,68-63,13	5,49-18,77	11,48-24,71	<2,00-3,55	215,03-639,95	I

A – Wong et al. (1995); B– Van den Hurk et al. (1997); C– Muniz et al. (2004); D– Guevara-Riba et al. (2004); E– Guerra-García and García-Gómez (2005); F– Hortellani et al. (2008); G– Jesus et al. (2004); H– Choueri et al. (2009a); I – Buruaem et al. (2012). (Fonte: BURUAEM et al., 2012).

No Brasil essa realidade não é diferente. No porto de Santos muitos tipos de fontes poluidoras são observadas. No município de Cubatão foram instaladas, a partir da década de 1950, importantes indústrias petroquímicas, metalúrgicas, fertilizantes, entre outras, aproveitando-se das facilidades do maior porto marítimo do País, o Porto de Santos. O material poluente lançado na região por essas indústrias levou a um processo de degradação ambiental intenso na região (VIRGA & GERALDO, 2008).

Um estudo realizado pela CETESB (2001) demonstrou que toda a região estuarina Santos-São Vicente se caracteriza como uma região altamente impactada pela contaminação por metais e outros compostos. Uma série de outros estudos também analisaram a concentração de metais no porto de Santos e também demonstraram concentrações de metais como Zn, Cr, Cd, Cu, Hg apresentam-se acima de valores aceitáveis (PINTO *et al.*, 2015; ABESSA *et al.*, 2008; BURUAEM *et al.*, 2012).

No porto de São Sebastião, segundo a DDS System (2013), o Terminal Aquaviário Almirante Barroso (TEBAR), localizado em São Sebastião (SP) é o maior terminal aquaviário da América do Sul, sendo responsável pela movimentação diária de 600 mil barris ou 4 bilhões de litros de petróleo por mês, que representam 50% de todo o petróleo consumido no Brasil. Com 40 tanques que armazenam um total de 1,2 bilhão de litros de petróleo e derivados ou o equivalente a 8 milhões de barris, o Tebar também é a unidade que possui a maior tancagem entre todos os terminais da Petrobras.

Dessa maneira, nessas regiões é possível estudar o impacto de metais no ecossistema e na biota como um todo. Os microrganismos acabam sendo o primeiro nível trófico afetado pela toxicidade de certos poluentes.

2.2. DIVERSIDADE BACTERIANA

Os microorganismos tem habitado a Terra por mais de 3,7 bilhões de anos e ainda dominam em termos de biomassa e diversidade. Comunidades bacterianas complexas são encontradas em essencialmente todos os ecossistemas naturais, incluindo solos, plantas e águas superficiais e subterrâneas (ØVREÅS, 2000).

A comunidade microbiana apresenta grande importância na manutenção das funções dos diferentes ecossistemas, que incluem: ciclagem de nutrientes, produção primária, decomposição da matéria orgânica e regulação do clima (QUERO *et al.*, 2015; BRUCE *et al.*, 2012).

2.2.1. Diversidade de microrganismos em áreas costeiras

Diversos estudos mostram que populações bacterianas marinhas são complexas, de ampla distribuição e geralmente apresentam uma variedade de grupos ainda não identificados ou não cultivados. Muitos avanços tecnológicos têm contribuído para melhorar a compreensão dos processos mediados por bactérias nos ambientes marinhos (VITORINO & BESSA, 2018).

Embora grandes populações de bactérias estejam bem documentadas em águas costeiras e sedimentos, sua diversidade e variações espaço-temporais permanecem amplamente inexploradas (BRUCE *et al.*, 2012).

Estimativas recentes revelam que especialmente sedimentos costeiros abrigam os maiores valores de abundância e diversidade microbiana no ambiente marinho. Esse fator, se deve em parte às heterogeneidades presentes nesse compartimento como a estratificação do potencial redox e disponibilidade de nutrientes que acabam por moldar a comunidade (HUA *et al.*, 2017).

Outro fator que demonstra a grande importância nos estudos de diversidade microbiana, é que os ambientes costeiros sofrem muitas alterações por consequência da atividade antrópica (JAHAN & STREZOV, 2017). Essas alterações podem levar a consequências graves a comunidade microbiana e consequentemente a todo o ecossistema, uma vez que microrganismos tem um papel fundamental na ciclagem

dos nutrientes. Além disso, microrganismos são extremamente sensíveis a mudanças em seus ambientes devido ao seu tamanho, rápido crescimento e plasticidade genômica (QUERO *et al.*, 2015). Dessa maneira, o estudo da diversidade microbiana e suas variações acaba sendo ferramenta importante para avaliar a consequência do impacto antrópico na saúde do ambiente marinho (AGER *et al.*, 2010).

2.2.2. Estudo sobre diversidade bacteriana no ambiente marinho Brasileiro

Estima-se que o Brasil abrigue aproximadamente 20% do total diversidade biológica de macrorganismos do mundo. Além disso é um dos 17 países que compartilham quase 70% dos animais e plantas catalogados e é reconhecido como um dos países mais megadiversos (LANDIM *et al.*, 2010; CDB, 2013; MITTERMIER *et al.*, 2004). Esta biodiversidade é frequentemente relacionada à grande variabilidade climática e geomorfologia.

A diversidade biológica é um importante recurso, não só para os serviços ambientais que fornece, mas também para o seu potencial como um recurso no desenvolvimento de uma gestão sustentável de ecossistemas e oportunidades para bioprospecção (PYLRO *et al.*, 2014; THOMPSON *et al.*, 2018).

Apesar de sua importância, a diversidade microbiana brasileira ainda é considerada em grande parte desconhecida. Estudos da diversidade microbiana são comparativamente muito mais escassos. Por exemplo, apenas recentemente a diversidade microbiana dos solos da Amazônia, do Cerrado e do ambiente marinho foram estudados de forma sistemática (BRUCE *et al.*, 2012).

De acordo com uma revisão feita por Bruce *et al.* (2012) Os primeiros estudos independentes de cultura realizados no Brasil para acessar a diversidade microbiana datam do final da década de 1990 (BORNEMAN & TRIPLET, 1997). Sequenciamento pelo método de Sanger foi usado extensivamente até poucos anos atrás para determinar a diversidade genética após a clonagem de DNA diretamente de uma amostra ambiental (PACE *et al.*, 1985; SCHMIDT *et al.*, 1991). Essa abordagem foi amplamente aplicada para o estudo de diferentes biomas. Os primeiros estudos usando pirosequenciamento para estudar a diversidade microbiana começaram a ser feitos há pouco mais de uma década atrás (THOMPSON *et al.*, 2011; ROESCH *et al.*, 2007).

A tabela 2 mostra pesquisas realizadas no Brasil com o intuito de estudar a diversidade bacteriana em diferentes ambientes marinhos. Pode-se perceber que esses estudos ficam restritos aos estados do São Paulo e Rio de Janeiro e apenas o Ceará como representante da região nordeste. Além disso, as áreas de manguezal e corais são os ambientes mais estudados.

Tabela 2 – Lista de estudos utilizando métodos independente de cultura em ambientes marinhos.

BIOMA	LOCAL	TÉCNICA MOLECULAR	AMOSTRA	REFERÊNCIA
Manguezal	Rio de Janeiro	Sequenciamento do gene 16S rRNA e T-RFLP	sedimento	(Brito et al. 2006)
Manguezal	Rio de Janeiro	Sequenciamento do gene 16S rRNA	rizosfera	(Maciel-Souza et al. 2006
Manguezal	Ceára	Análise de PCR do gene 16S rRNA e DGGE	água	(Sousa et al., 2006)
Estuário da Baía de Guanabara	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR, DGGE, e biblioteca de clones	água	(Vieira et al. 2007)
Baía de Guanabara	Rio de Janeiro	ITS rRNA DGGE e biblioteca de clones do gene 16S rRNA	água	(Clementino et a., 2007)
Rio de Itanhaém	São Paulo	16S rRNA PCR e biblioteca de clones	água	(Carvalho et al. 2007)
Manguezal	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR, DGGE, e biblioteca de clones	sedimento	(Gomes et al., 2008)
Baía de Guanabara	Rio de Janeiro	Biblioteca de clones do gene 16S rRNA	água	(Vieira et al., 2008)
Baía de Guanabara	Rio de Janeiro	Biblioteca de clones do gene 16S rRNA	água, sedimento e esponja	(Turque et al. 2008)
Banco de Abrolhos	Bahia	16S rRNA PCR e biblioteca de clones	coral	(Reis et al., 2009)
Ilha do Caboclo e Praia da Tartaruga	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR, DGGE, e biblioteca de clones	Esponja	(Hardoim et al. 2009)
Baía de Sepetiba	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR e biblioteca de clones	água	(Almeida et al., 2009)
Baía de Guanabara e de Sepetiba	Rio de Janeiro	16S rRNA e biblioteca de clones	água e esponja	(Turque et al. 2010)
Aquipélago de Cagarras e Praia Vermelha	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR e sequenciamento	esponja	(Fontana et al. 2010
Praia de Guaeca, Ilhota da Prainha e Ilha de Toque-Toque	São Paulo	ITS rRNA PCR, ARDRA, e sequenciamento	esponja, ascídias e algas	(Menezes et al. 2010)
Praia da Tartaruga	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR e biblioteca de clones	coral	(Lins-de-Barros et al. 2010)
Banco de Abrolhos	Bahia	16S rRNA PCR e biblioteca de clones	coral	(de Castro et al. 2010)
Baía de Guanabara	Rio de Janeiro	Pirosequenciamento do gene 16S rRNA	água	(Thompson et al. 2011)

BIOMA	LOCAL	TÉCNICA MOLECULAR	AMOSTRA	REFERÊNCIA
Cabo Frio	Rio de Janeiro	16S rRNA PCR, DGGE, e biblioteca de clones	água	(Cury et al. 2011)
manguezal de Cananéia e Bertioga	São Paulo	Pirosequenciamento do gene 16S rRNA	sedimento	(Andreotte et al., 2012)
São Sebastião channel and Buzios Island	São Paulo and Rio de Janeiro	Construção de biblioteca 16S e pirosequenciamento	água, sedimento e muco (coral)	(Carlos et al., 2013)
Ilha do Cardoso	São Paulo	T-RFLP e pirosequenciamento do gene 16S rRNA	sedimento	(Mendes e Tsai, 2014)
Barra Grande mangrove	Ceará	T-RFLP	sedimento	(Rocha et al., 2016)
Baía de Camamu	Bahia	Sequenciamento MiSeq	água	(Effe et al., 2018)

* Modificado de Bruce et al., 2012.

Dessa maneira fica visível como o Brasil ainda precisa de estudos mais aprofundados e que abrajam mais regiões para que possamos preencher as lacunas quando levamos em consideração a grande diversidade brasileira.

Apesar da escassez de trabalhos, alguns estudos já documentaram regiões com populações bacterianas altamente diversas (ROCHA *et al.*, 2016; HUA *et al.*, 2017) e com microbioma muito específico (HUA *et al.*, 2017). Entretanto, ainda precisamos entender como os diversos tipo de contaminantes influenciam na diversidade e na composição da comunidade, quais são os grupos que resistem a essas condições adversas e quais grupos tem sua população diminuída.

Além disso, ainda é necessário estudar quais as implicações que essas mudanças de composição podem trazer ao ecossistema, uma vez que muitos grupos bacterianos são extremamente importantes na ciclagem de nutrientes. Poucos estudos conseguiram demonstrar essas correlações e ainda muito pouco se sabe (QUERO *et al.*, 2015). Esse fator se torna mais importante quando leva-se em consideração que o Brasil sofre muitos impactos antrópicos especialmente na zona costeira.

2.2.3. Metodologias para avaliar a diversidade bacteriana

Em grande parte do século 20, cientistas do mundo todo avaliavam as comunidades microbianas através de métodos dependentes de cultivo (ATLAS & BARTHA, 1993), utilizando, dessa maneira, métodos tradicionais de isolamento seletivo

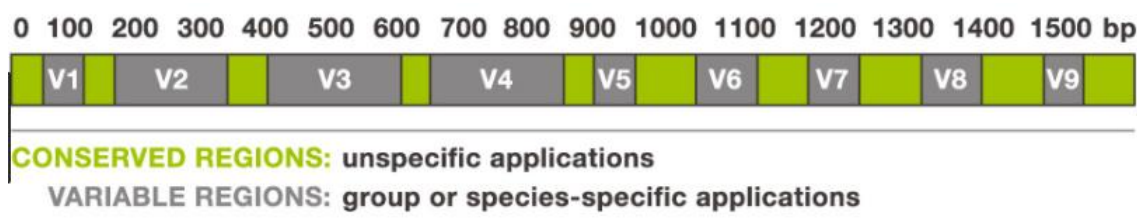
e cultivo para, assim, identificar espécies ou grupos funcionais, estimar abundância relativa e determinar estrutura das comunidades (AMANN *et al.*, 2001).

Esses métodos tradicionais foram amplamente utilizados durante muito tempo como única forma para se conseguir acessar informações sobre a comunidade de procariotos nos mais diversos ambientes (RASCHE *et al.*, 2006).

Com o passar do tempo foi se observando que esses métodos apresentavam grandes limitações. As principais dificuldades encontradas foram a falta de representatividade observada na comparação entre as comunidades criadas e cultivadas no seu próprio nicho ecológico com as comunidades microbianas que são obtidas em meios de cultivo (FELSKE *et al.*, 1999). Muito disso se deve ao fato da incapacidade em se mimetizar as condições ambientais em meios de cultivo. Dessa maneira, uma grande parte de microrganismos não são capazes de crescer em cultivos *in vitro*. Portanto, métodos dependentes de cultivo utilizados para avaliar a comunidade microbiana acabam por subestimar a riqueza, abundância e diversidade de espécies (TYSON & BANFIELD, 2005).

Esse cenário começou a mudar a partir de 1980 quando Torsvik (1980) publicou o primeiro protocolo de extração de DNA de amostra de solo. Esse procedimento necessitava de 60-90 g de solo e demorava 3 dias para ser executado. Desde essa época muitos avanços foram realizados e hoje com apenas 1 g de amostra o DNA pode ser extraído em menos de 30 minutos. Com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988) e sequenciamento de DNA (SANGER *et al.*, 1977), os métodos moleculares têm sido extremamente importantes na identificação e estudo na comunidade de microrganismos.

Estas técnicas se baseiam na amplificação de uma região do DNA específica de um grupo de microrganismo (para bactérias a região 16S rDNA) por PCR e posterior caracterização por clonagem e sequenciamento. A região codificadora do 16S rRNA apresenta diversas porções, dentre elas algumas conservadas e outras hipervariáveis numeradas de 1 a 9 (V1 a V9) e estas são diversificadas entre as espécies bacterianas (Figura 4). Assim, essas sequências se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (LIU & STAHL, 2002).



Fonte: sueishaqlab.org/tag/16s-rrna/

Figura 4- Esquema do gene 16rRNA com suas regiões hipervariáveis de V1a V9.

Outros métodos para estudo da comunidade global consistem na análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA), no polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (TRFLP), na amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), na análise do espaço ribossomal inter gênico (RISA), na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), na eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) e no polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) (TORSVIK & ØVREAS, 2002). Existem ainda métodos que se baseiam no perfil dos ácidos graxos Fosfolipídico (PLFA) e ácido graxo Metil Éster (FAME) para obter um perfil da comunidade bacteriana (KOZDRÓJ & van ELSAS, 2001). Uma visão geral das técnicas e de suas aplicações é apresentada na Figura 5.

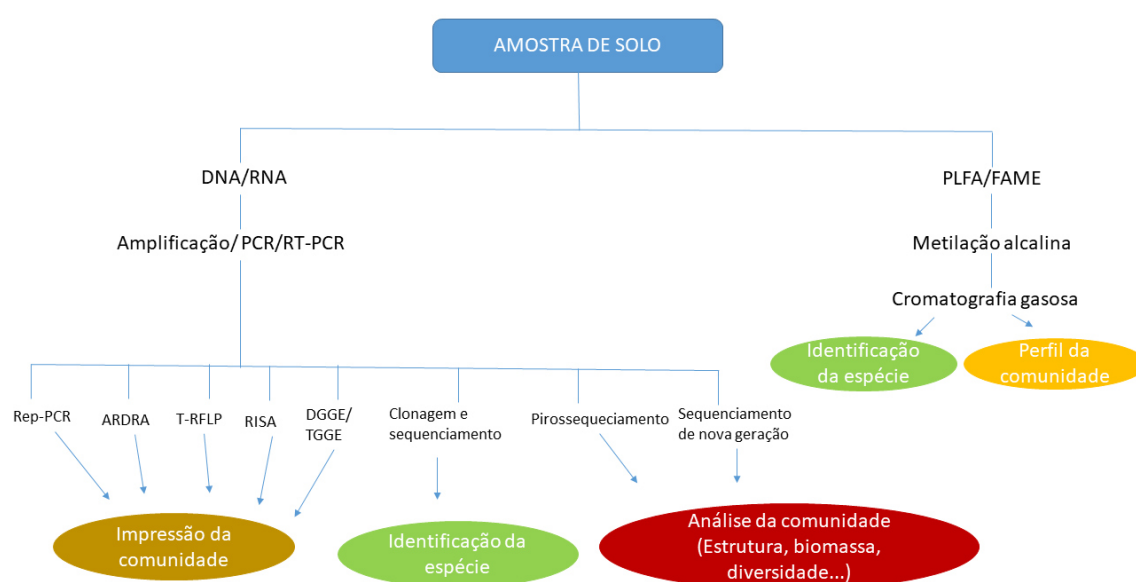


Figura 5 – Metodologias para análise de comunidades microbianas (Adaptado de Kozdrój & van Elsas, 2001).

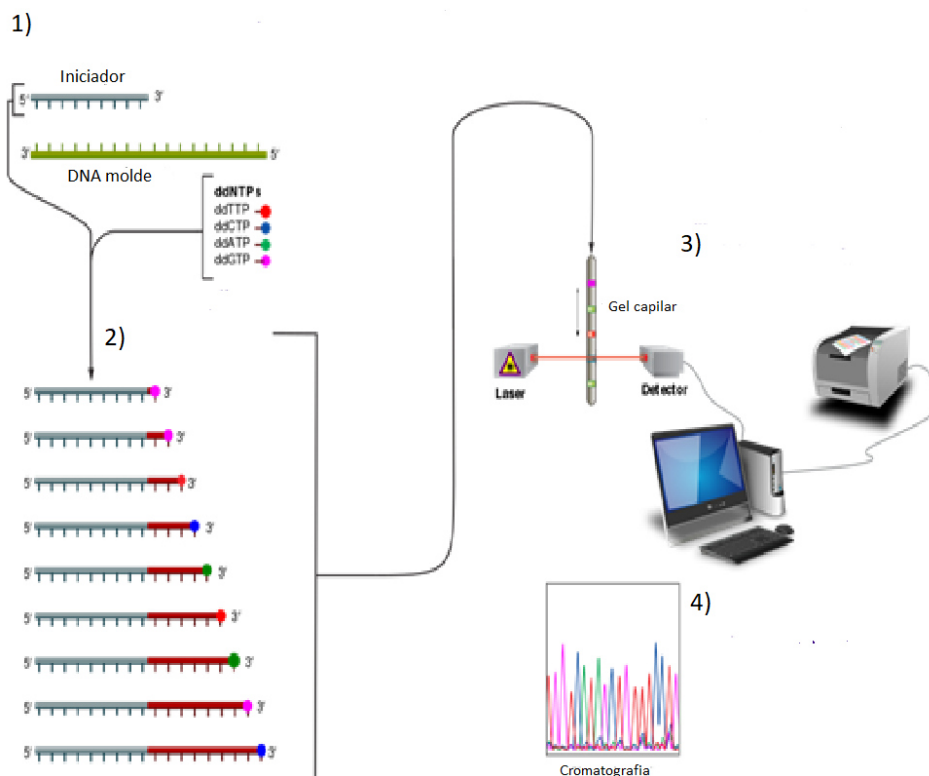
Dentre as técnicas idealizadas para se ter acesso à fisiologia e à genética de microrganismos não cultiváveis, a metagenômica desempenha papel central. O desenvolvimento da metagenômica, na verdade, é considerado o evento mais marcante no campo da ecologia microbiana nos últimos dez anos (THOMAS *et al.* 2012). Trata-se da análise genômica de uma comunidade de organismos baseada no isolamento direto de fragmentos de DNA oriundos de amostras ambientais, suprimindo a necessidade de isolamento e cultivo de espécies individuais. Este termo foi proposto por Handelsman e colaboradores (1998) e trouxe novas perspectivas ao estudo da Ecologia Microbiana ao tornar possível análises de amostras ambientais de solo, de água ou mesmo associadas a hospedeiros eucariontes (HANDELSMAN, 2004), colocando sob foco de estudo os aproximadamente 99% das espécies microbianas que não podem ser cultivadas. Outros termos também são utilizados para descrever essa metodologia, como: genômica ambiental, ecogenômica, genômica de comunidades e metagenômica, todos intercambiáveis (CHISTOSERDOVA, 2010).

A metagenômica só pode ser desenvolvida através do desenvolvimento de técnicas de sequenciamento mais modernas, capazes de sequenciar um grande número de sequências de uma vez, em um curto espaço de tempo e com um baixo custo para sua realização.

Atualmente, as técnicas de sequenciamento são amplamente aplicadas ao estudo da diversidade microbiana. O desenvolvimento e aprimoramento dos sequenciadores de primeira geração (baseado no método de Sanger), e mais recentemente, os de segunda (piro sequenciamento) e terceira (íon sequenciamento) gerações permitem o sequenciamento massivo dessas amostras ambientais.

O método de Sanger é procedimento tradicional de sequenciamento de DNA (Figura 6), foi desenvolvido por Frederick Sanger e colaboradores na década de 70 e consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxiribonucleotídeos. Quando os ddNTP's tentam se ligar com a fita de DNA, com a ausência do OH, os próximos nucleotídeos não têm onde se ligar e a replicação para. Assim é possível obter fitas do mesmo DNA com número de resíduos diferentes (SANGER *et al.*, 1977). Mas para sequenciar grandes quantidades de DNA ou então o genoma inteiro, essa metodologia começou a ter muitas desvantagens. Era necessária fragmentação do DNA e construção de clones, fazendo com que essa metodologia, para esse objetivo se tornasse

cara, dependesse de muito tempo de preparação de amostras e com maior quantidade de erros.



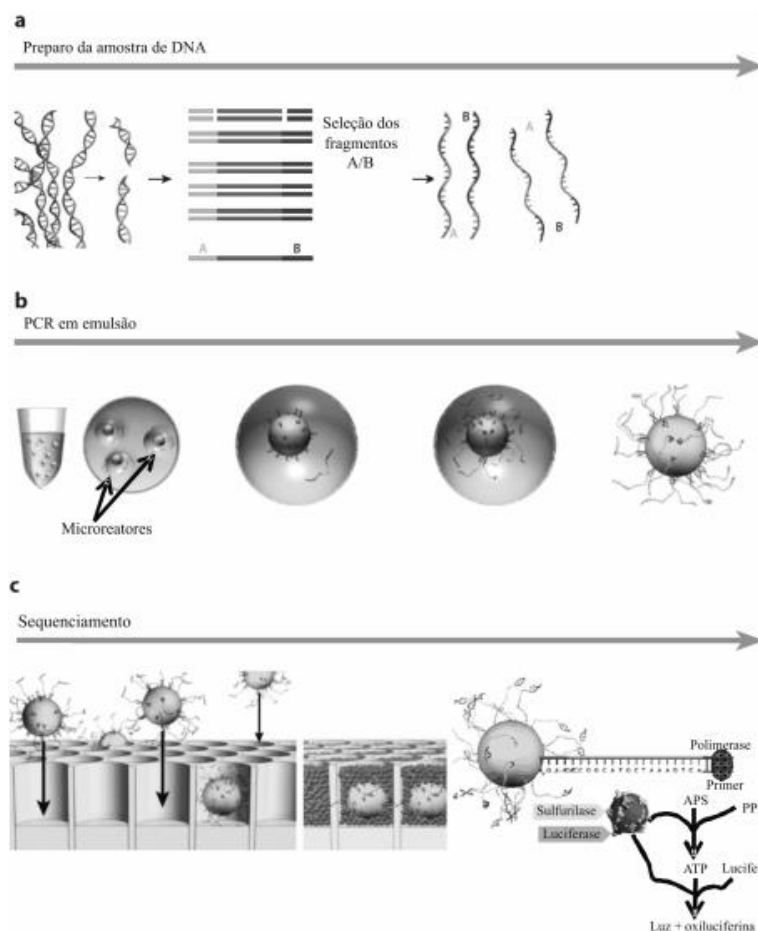
Fonte: Adaptado de Estevezj (CC BY-SA 3.0).

Figura 6 - Metodologia de Sanger esquematizada: 1) Reação: Mistura de iniciadores, DNA molde, DNA polimerase, ddNTPs com fluorocromos; 2) Elongação e terminação da cadeia de DNA; 3) Eletroforese em gel capilar para separação dos fragmentos de DNA; 4) Detecção por laser dos fluorocromos e análise computacional da sequência.

O sequenciamento de segunda geração apareceu para sanar alguns desses problemas. Essas novas metodologias possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Isso porque o sequenciamento de segunda geração faz uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis (CARVALHO & SILVA, 2010).

Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. A plataforma 454 utiliza um método conhecido como piro sequenciamento e foi o primeiro grande substituto do sequenciamento de primeira geração (RONAGHI *et al.*, 1998). A leitura da sequência nesse sistema é realizada a partir de uma combinação de reações

enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz (Figura 7) capturado por uma câmera CCD (charge-coupled device) acoplada ao sistema

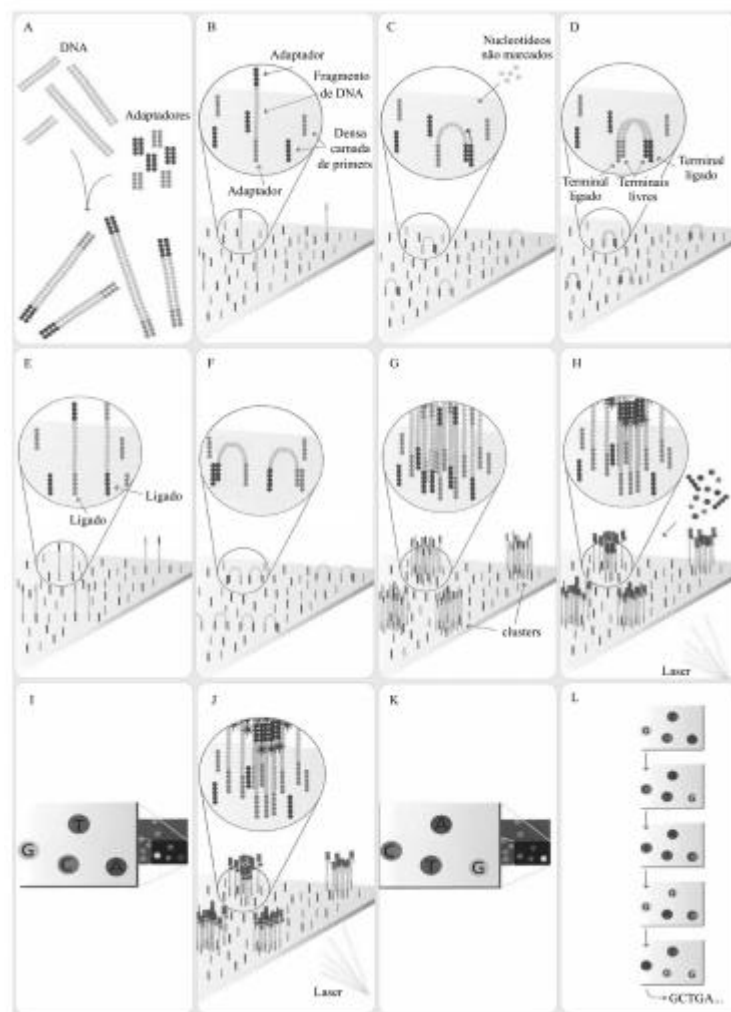


Fonte: CARVALHO & SILVA, 2010.

Figura 7- Resumo ilustrativo do sequenciamento na plataforma 454. (a) Preparo da amostra: O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em suas extremidades. Os fragmentos A/B são selecionados para o sequenciamento. (b) PCR em emulsão: Os fragmentos são ligados às microesferas magnéticas por meio do pareamento com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera. Apenas um único tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera. As microesferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas onde a PCR em emulsão ocorre. Milhares de cópias do fragmento alvo são produzidas nessa fase. (c) Sequenciamento: As microesferas ligadas às sequências alvo fita simples são capturadas individualmente em poços no suporte de sequenciamento. São fornecidos os reagentes para a reação de piro sequenciamento, e o sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada, em cada poço de sequenciamento.

A plataforma Illumina/Solexa realiza seu sequenciamento, assim como no método de Sanger, pela síntese através da enzima DNA polimerase e de nucleotídeos

terminadores marcados com diferentes fluoróforos (Figura 8). A diferença inovadora consiste no fato da execução do método de clonagem dos fragmentos *in vitro* ser realizada em uma plataforma sólida de vidro (PCR de fase sólida) (FEDURCO *et al.*, 2006). Primeiramente, realiza-se a fragmentação de forma aleatória e, esses fragmentos serão, posteriormente, ligados a adaptadores localizados nas duas extremidades. A adesão das moléculas de DNA fita simples ocorre por afinidade ao suporte sólido, local onde se encontram os oligonucleotídeos complementares a esses adaptadores. Na fase de anelamento, o adaptador da extremidade da molécula que se encontra livre, se une ao seu oligonucleotídeo complementar no suporte e forma uma estrutura em ponte, logo dá-se início a PCR, fazendo uso da extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como primer. Já durante a etapa de desnaturação, essa ponte é desfeita através do uso de altas temperaturas. Posteriormente, a etapa de anelamento é repetida, dando origem a novas estruturas em ponte, iniciando um novo ciclo de amplificação. É importante destacar que nesta plataforma podem ser gerados fragmentos tanto paired-end quanto single-read para a preparação de bibliotecas de DNA. No momento em que ocorrer uma quantidade suficiente desses ciclos, serão obtidos clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte e, através da incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e da excitação a laser, é gerado sinal, que será captado por um aparelho que realizará a leitura e a interpretação dos possíveis nucleotídeos componentes da cadeia. O procedimento de leitura é feito de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada um dos clusters gerados (Figura 8) (TURCATTI *et al.*, 2008).



Fonte: CARVALHO & SILVA (2010)

Figura 8- Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina. O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como primer (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada cluster (L).

Além dessas plataformas apresentadas ainda existem a ABI Solid e o Ion Torrent. E atualmente já existem sequenciadores de terceira geração, que são capazes de sequenciar uma única molécula de DNA sem a necessidade de amplificação.

O mais importante é que essas metodologias são capazes, de através de amostras ambientais, obter sequências dos procariotos presentes. Aliados a bioinformática é possível analisar esse imenso conjunto de dados, obtendo-se assim informações sobre abundância, diversidade, riqueza de espécies entre outros. Fazendo assim uma análise completa da comunidade microbiana com custos relativamente baixos.

Um volume de dados gigantesco vem sendo gerado, o que requer o desenvolvimento de ferramentas de análise mais eficientes e capazes de incluir a grande parcela da comunidade científica com recursos computacionais limitados (WILKE et al., 2012). Para estudar tais dados, um passo crucial é a classificação das sequências, feitas em geral através de buscas por similaridade (WILKE et al., 2012). Para tanto, as sequências obtidas são comparadas com sequências pertencentes a uma variedade de bancos de dados. Estes são repositórios biológicos digitais compostos de sequências de ácidos nucleicos, proteínas ou outro polímero, armazenadas em um computador.

Considerando que nenhum banco de dados é capaz de cobrir todas as funções biológicas, a habilidade de visualizar e compilar informações obtidas em diferentes bancos de dados em um único local é essencial e foi implementada nas versões mais recentes de algumas plataformas de comparação de metagenomas (THOMAS *et al.*, 2012). Tais plataformas tornam possível depositar, processar e analisar conjuntos de dados de metagenomas, sendo o MG-RAST (GLASS *et al.*, 2010), o IMG/M (MARKOWITZ *et al.*, 2008) e o CAMERA (SUN *et al.*, 2011) os três sistemas proeminentes.

O MEGAN (do inglês, MEtaGenome ANalyzer – Analisador de metagenomas) é outra ferramenta utilizada para comparar todas as sequências obtidas no sequenciamento com um ou mais bancos de dados de referência utilizando BLAST. O programa utiliza o resultado da comparação como a entrada e gera dendogramas taxonômicos ou funcionais (HUSON *et al.*, 2007), o que torna a comparação de diferentes grupos taxonômicos e funcionais visualmente mais fácil, contribuindo para a interpretação dos dados (THOMAS *et al.*, 2012).

Também foi necessário o desenvolvimento de programas de análises estatística para análise de tais dados. Por muito tempo, o aspecto estatístico foi uma questão que preocupou muitos ecólogos microbianos por não se saber se os métodos disponíveis eram

adequados para analisar comunidades microbianas. A razão para tal incerteza é que tais comunidades constituíram por muito tempo uma grande caixa preta para a ecologia, de tal forma que grande parte dos modelos estatísticos foi desenhada originalmente para macro-organismos. Contudo, atualmente, sabe-se que muitas abordagens e estratégias derivados de décadas de pesquisas de ecologia quantitativa com macro-organismos podem ser utilizadas com sucesso para a análise de micro-organismos (THOMAS *et al.*, 2012). Primeiramente, como os demais dados de Ecologia quantitativa, os dados de sequenciamento de metagenomas podem ser reduzidos a tabelas, onde as colunas representam amostras; as linhas, grupos taxonômicos ou funcionais; e os campos contêm dados de abundância ou presença/ausência. Portanto, muitas das ferramentas estatísticas disponíveis para identificar correlações e padrões estatisticamente significantes se mostraram transferíveis para a análise de micro-organismos. Entretanto, como as matrizes de espécie-amostra de metagenomas normalmente contêm mais grupos taxonômicos ou funcionais que amostras obtidas, é preciso que correções apropriadas para testes de hipóteses múltiplas sejam implementadas, como, por exemplo, correção de Bonferroni para análises baseadas no teste-t (THOMAS *et al.*, 2012). Outra consequência do volume de dados é a necessidade de avaliá-los através de estatísticas multivariadas.

Dessa maneira, está sendo possível a realização de estudos e cientistas começaram a encontrar resposta para questões ecológicas que ainda estavam obscuras. O desenvolvimento de todas essas tecnologias proporcionou um avanço no estudo de ecologia microbiana e o real entendimento do tamanho e importância dessa comunidade.

2.3.IMPACTO DA POLUIÇÃO POR METAIS PESADO NA COMUNIDADE MICROBIANA

A poluição por metais vem crescendo ao redor do mundo. Muitas atividades antrópicas contribuem para esse crescimento, como indústrias de diversos setores, agricultura, mineração e atividades portuárias.

Metais são poluentes extremamente tóxicos quando em maiores concentrações. Além disso sofrem magnificação na cadeia trófica e são difíceis de serem removidos do ambiente.

Microrganismos são diretamente influenciados por essa toxicidade. Poluição por metais pode levar a mudanças severas na estrutura e composição da comunidade (YAO

et al., 2017). Estudos mostram que a contaminação de solos por metais a longo prazo tem efeitos prejudiciais sobre a atividade microbiana do solo, especialmente a respiração microbiana (SOBOLEV & BEGONIA, 2008). Além de mudanças mediadas por metais a longo prazo nas atividades enzimáticas do solo, muitos relatórios mostram grandes reduções na atividade microbiana devido à exposição a metais tóxicos em curtos espaços de tempo.

Um estudo de Imchen *et al.* (2018) mostrou que áreas costeiras do Brasil, Índia e Arábia Saudita apresentam porcentagens significativas de genes de resistência na comunidade microbiana, especialmente o gene CupA que consiste em um sistema de efluxo que confere a bactéria resistência a metais como cobre e prata.

Outro estudo realizado por Quero *et al.* (2015) em áreas da costa italiana poluídas por metais e hidrocarbonetos demonstrou que a contaminação por múltiplos contaminantes alterou significativamente a diversidade de procariotos bentônicos. O estudo mostrou que metais como Cu, Zn, Hg, Cr e As podiam interferir na composição da comunidade.

Através desse levantamento bibliográfico foi possível perceber que existem inúmeros trabalhos demonstrando que a poluição por metais pode alterar a diversidade bacteriana e influenciar a composição da comunidade. Entretanto, são raros os estudos que conseguem demonstrar quais os grupos que acabam sendo favorecidos e aqueles que diminuem drasticamente a sua abundância, e quais implicações ecológicas isso pode ter.

Yin *et al.* (2015) tentaram responder essa questão. De acordo com seu estudo a abundância relativa de alguns grupos como *Firmicutes*, *Chloroflexi* e *Crenarchaeota* aumentou de maneira diretamente proporcional ao aumento da concentração de metais à exceção do grupo *Proteobacteria*, o qual teve sua abundância diminuída. Neste mesmo estudo, genes funcionais envolvendo a homeostase de metais (e.g., *chrR*, *metC*, *merB*), o metabolismo de carbono e a habilidade de remediação orgânica foram encontrados em maior abundância nas áreas contaminadas demonstrando que a comunidade microbiana foi capaz de modular seu consumo de energia e aumentar sua adaptabilidade e resistência em áreas contaminadas.

2.4. Resistência bacteriana a metais e suas aplicações

Os metais ocorrem naturalmente nos solos e alguns deles, tais como cobre (Cu), zinco (Zn) e cobalto (Co), desempenham importante papel na nutrição de plantas e

animais, enquanto outros, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As) e selênio (Se), exercem efeitos deletérios sobre vários componentes da biosfera (ALLOWAY, 1995). Mas aumentos da sua concentração no ambiente devido atividades poluidoras vem se destacando no cenário de poluição ambiental.

Esse aumento da concentração de metais acima de seu limite natural de ocorrência acaba tornando o ambiente tóxico para biota. Essa pressão seletiva acaba favorecendo o surgimento de bactérias resistentes a metais, dessa maneira, microrganismos começam a apresentar mecanismos de resistência, acabam por apresentar vantagens sobre outros (SILVER & PHUNG, 2009).

Microrganismos apresentam vários tipos de mecanismos de resistência em resposta às concentrações de metais os quais podem ser codificados através de genes cromossomais, mas na maioria das vezes o loci que confere resistência está localizado nos plasmídeos (NIES, 2003).

Alterações na parede ou na membrana celular são exemplos desse tipo de mecanismos de resistência que tem por objetivo proteger componentes celulares essenciais que sejam sensíveis a metais (JI & SILVER, 1995).

Existe também o transporte ativo ou sistemas de efluxo que representam uma grande categoria de sistemas de resistência a metais. Nesses mecanismos, as bactérias usam transporte ativo para exportar metais tóxicos para fora de seu citoplasma evitando com que seus componentes celulares sejam prejudicados (BRUINS *et al.*, 2000).

Outro mecanismo de resistência importante é o sequestro intra ou extracelular de metais, em que proteínas são produzidas com a capacidade de se ligar fortemente a alguns tipos de metais, tornando-os inativos (SILVER, 1992; BRUINS *et al.*, 2000).

Metais podem ser extremamente tóxicos aos microrganismos. Mas muitos deles conseguem desenvolver sistemas de tolerância para conseguir sobreviver nesse ambiente de extrema toxicidade (RAJKUMAR *et al.*, 2012). Entre esses sistemas microrganismos podem por exemplo alterar a especiação dos metais para formas menos tóxicas, podem fazer a remoção dos metais ou ainda alterar condições ambientais que fazer a precipitação dos metais facilitando sua remoção.

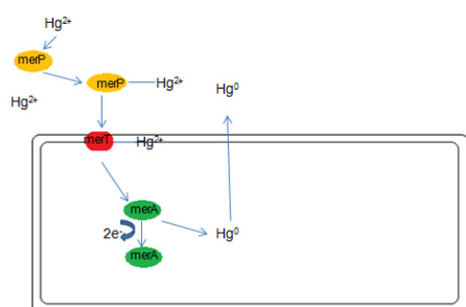
Dessa maneira, bactérias podem ser forte aliadas na busca de metodologias para descontaminação de áreas que sofrem com o aumento na concentração de metais devido a poluição antrópica.

A seleção e identificação de bactérias resistentes e capazes de remover metais em amostras ambientais, é importante pois possibilita utilizar características bacterianas

intrínsecas para encontrar novas tecnologias para a remediação de áreas contaminadas (GERMAINE *et al.*, 2013). Contudo, o sucesso da técnica de remediação depende de microrganismos resistentes e tolerantes, que consigam manter suas funções metabólicas mesmo após a captação de metais (VALLS & LORENZO, 2002).

Muitos são os mecanismos envolvidos na tolerância e resistência aos metais. Dentre eles destacam-se bioabsorção, precipitação, biomineralização, produção de sideróforos, biosurfactantes e proteínas ligantes (CAMARGO *et al.*, 2007). De acordo com Bruschi & Goulhen (2007), os processos de biorremediação desenvolvidos por microrganismos pode ser dividido em dois grandes grupos: um grupo explora a atividade enzimática metal-redutase das bactérias (direta) e o segundo envolve a produção de sulfeto de hidrogênio produzido biologicamente por algumas bactérias que é capaz de precipitar os metais favorecendo sua remoção (indireta) (Figura 9).

a) Detoxificação enzimática de metais



b) Precipitação de metais

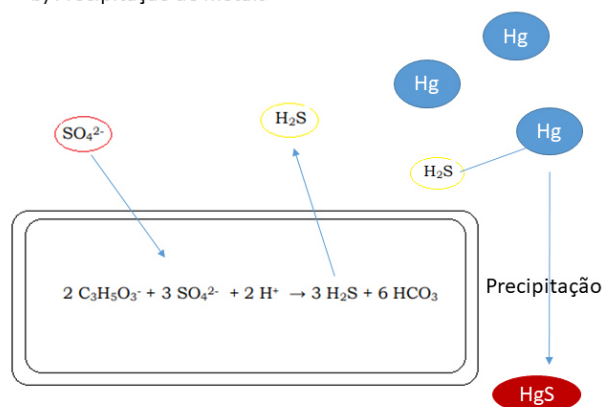


Figura 9 – Principais processos de biorremediação de metais desenvolvidos por microrganismos: a) Esquema simplificado do mecanismo de resistência por detoxificação enzimática de metais para formas menos tóxicas onde o mercúrio é transformado a través de ação enzimática para sua forma menos tóxica; b) Precipitação de metais por bactérias redutoras de sulfato, onde o sulfato é utilizado como aceptor de elétrons para quebra de lactato e produz sulfeto, o sulfeto quando combinado, por exemplo, ao mercúrio se transforma em sulfeto de mercúrio que é insolúvel e acaba precipitando. (Fonte: da autora).

2.5. Bactérias redutoras de sulfato

Um importante grupo para ser estudado levando em consideração o problema ambiental causado pela poluição por metais são as bactérias redutoras de sulfato.

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem ser classificadas em cinco linhagens filogenéticas distintas, sendo quatro grupos dentro do domínio *Eubacteria* (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Thermodesulfobacteria* e *Nitrospira*) e um no domínio *Archea* (*Euryarchaeota*) (CASTRO *et al.*, 2000). As famílias *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteriaceae* agrupam a maioria das espécies conhecidas (SCHEID & STUBNER, 2001).

As bactérias redutoras de sulfato compreendem um grupo de microrganismos anaeróbios capazes de reduzir metabolicamente íons sulfato ou outras espécies oxidadas de enxofre (sulfito, tiosulfito ou enxofre elementar) a sulfeto de hidrogênio. Na respiração anaeróbia, compostos orgânicos ou hidrogênio, são oxidados havendo transferência de elétrons através da cadeia respiratória até um aceptor orgânico, que não o oxigênio (MADINGAN *et al.*, 2004).

Uma das mais importantes aplicações biotecnológicas para bactérias redutoras de sulfato está intimamente ligada com sua fisiologia, através de seu metabolismo e subsequente formação de sulfeto (MUYZER & STAMS, 2008). Em locais com concentrações altas de metais o sulfeto se liga a esses metais formando sulfeto metálico. Sulfetos metálicos são insolúveis e precipitam naturalmente, facilitando assim sua separação e retirada de efluentes ou resíduos contaminados (Figura 10).

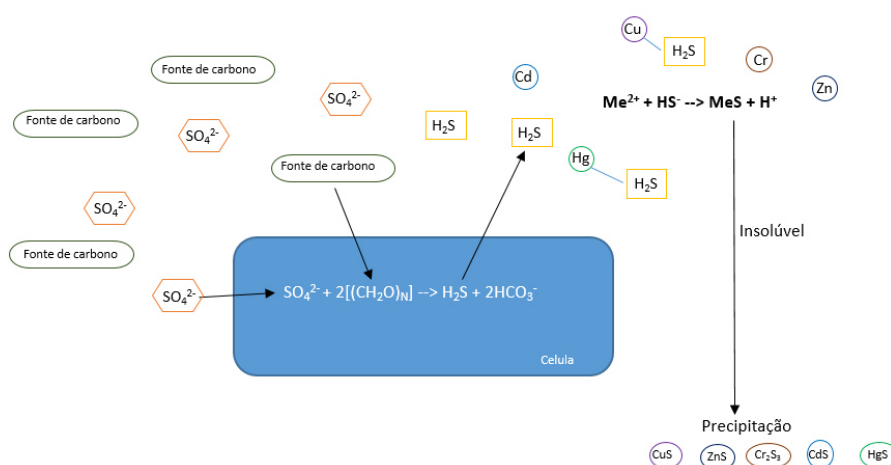


Figura 10– Esquema demonstram o metabolismo de BRS. Elas utilizam sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor final de elétrons para realizar a degradação da matéria orgânica $(\text{CH}_2\text{O})_N$, o que resulta na produção de sulfeto (H_2S). O sulfeto no ambiente pode se combinar com diferentes tipos de metais (Cobre (Cu); Mercúrio (Hg);

Zinco (Zn); Cromo (Cr); cádmio (Cd)) formando diferentes tipos de sulfeto metálico (CuS; ZnS; Cr₂S₃; CdS; HgS) que são insolúveis e precipitam.

Diversos estudos demonstram a importância e aplicabilidade de bactérias redutoras de sulfato no tratamento biológico de efluente. O tratamento biológico apresenta diversas vantagens, tais como, elevada eficiência na remoção de sulfato e metais, baixa produção de lodo, viabilidade econômica e segurança ambiental (BERTOLINO *et al.*, 2012; KAKSONEN & PUHAKKA, 2007).

As BRS apresentam um papel importante nas tecnologias de biorremediação para tratamento de águas, solos e subsuperfícies contaminadas visto que são mediadoras diretas e indiretas da redução de metais e metalóides, contribuindo também para a biodegradação de poluentes orgânicos (GEETS *et al.*, 2006).

A biorremediação de áreas contaminadas por metais através da utilização de bactérias capazes de reduzir metais, tem despertado grande interesse como alternativa para descontaminação destas áreas. Estudos recentes relatam, por exemplo, o potencial de bactérias como a *Desulfotomaculum reducens*, isoladas de um local contaminado com metais, em remover estes metais, incluindo urânio, cromo, manganês e ferro (LI *et al.*, 2015; OTWELL *et al.*, 2015)

Zhang e Wang (2016) estudaram a biorremediação de drenagem ácida de minas por meio de grânulos imobilizados de BRS provenientes de estação de tratamento águas residuárias em reator anaeróbio. O reator apresentou um desempenho satisfatório para altas concentrações de metais, incluindo Fe, Mn, Cu, Cd e Zn, onde a eficiência de remoção dos metais em torno de 99,9%.

A eficiência da estratégia de biorremediação depende da atividade das BRS, a qual é afetada por condições ambientais, parâmetros operacionais e composição da comunidade microbiana local. Muitas vezes a elevada concentração de metais e sua toxicidade faz com que a eficiência de bactérias redutoras de sulfato não seja satisfatória (PAULO *et al.*, 2015). Por isso a importância em encontrar bactérias redutoras de sulfato capazes de sobreviver em áreas contaminadas, a longo prazo, por metais e onde desenvolveram uma série de mecanismos de resistência devido a essa exposição.

CAPÍTULO 3

CONTAMINAÇÃO POR METAIS EM ÁREAS PORTUÁRIA E SUA RELAÇÃO COM A COMUNIDADE MICROBIANA: A POLUIÇÃO DESSAS ÁREAS PODE MUDAR A COMUNIDADE MICROBIANA?

3.1. RESUMO

As atividades portuárias são freqüentemente associadas à poluição e à disseminação de diferentes contaminantes em compartimentos ambientais sendo um dos mais importantes o aumento da concentração de metais. A poluição por metais pode levar a mudanças severas na estrutura e composição da comunidade e selecionar grupos que possam desenvolver mecanismos de resistência. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar como os metais influenciam a comunidade bacteriana em áreas portuárias brasileiras e na seleção de linhagens resistentes em comparação com uma área pristina. A composição da comunidade mudou significativamente entre as duas áreas portuárias e a área preservada, sendo o cádmio o único metal que não mostrou nenhuma correlação com nenhum filo. *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e *Thermodesulfobacteria* foram os filios que apresentaram correlação positiva fraca com contaminação orgânica e com a presença de Cu e Zn. *Chloroflex*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* e *Chlorobi* apresentaram correlação negativa com Cu, Cr e Zn. Grupos microbianos envolvidos no ciclo do nitrogênio e que podem reduzir compostos de um carbono foram encontrados em menor abundância nas áreas portuárias. A diversidade foi significativamente menor nas áreas portuárias em comparação com a área conservada. No entanto, não foi possível ver claramente uma maior quantidade de bactérias resistente a metais nas áreas portuárias em comparação com a área de controle. Por outro lado, foi possível notar que alguns gêneros podem desenvolver facilmente mecanismos de resistência a metais, por isso os gêneros mais isolados foram *Bacillus* sp, *Vibrio* sp e *Pseudomonas* sp. Esse tipo de estudo pode elucidar, em ambientes naturais muito complexos, como os poluentes podem influenciar a comunidade como um todo e as conseqüências dessas mudanças.

3.2. ABSTRACT

Port activities are frequently associated with pollution and the spreading of different contaminants in environment compartments. One of the most important is the increase of heavy metals concentration. Metal pollution can lead to severe changes in community structure and composition, and select groups that can develop resistant mechanisms. Thus, the objective of the present study was to analyze how heavy metals influence the bacterial community in Brazilian port areas and in the selection of resistant strains comparing to a pristine area. The community composition changed significantly between the two port areas and pristine area. Cadmium was the only metal that didn't show any correlation with any phyla. *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* and *Thermodesulfobacteria* were the phyla that showed a weak positive correlation with organic contamination and with Cu and Zn. *Chloroflex*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, and *Chlorobi* showed negative correlation to Cu, Cr and Zn. Microbial groups involved in nitrogen cycle and that can reduce one-carbon compounds were found in lower abundance at port areas. The diversity was significant lower in the port areas comparing to the pristine area. However it was not possible to see clearly a higher amount of heavy metal resistant strain in port areas comparing to the control area. On the other hand it was possible to notice that some genera can develop easily heavy metal resistant mechanisms that is why the most isolated genera were *Bacillus* sp, *Vibrio* sp and *Pseudomonas* sp. This kind of study can elucidate in very complex natural environments how pollutants can influence the community as whole and the consequences of these changes.

3.3.INTRODUÇÃO

Terminais portuários são áreas importantes para a economia mundial através do transporte e armazenamento de muitos tipos de produtos (BURUAEM *et al.*, 2012). No entanto, em todo o mundo, essas áreas são conhecidas como locais com altas concentrações de diversos tipos de contaminantes. Historicamente, as cidades que tiveram a instalação de um porto experimentaram rápida expansão comercial e industrial, causando um aumento da população, levando à contaminação e deterioração da qualidade do ambiente marinho e vários impactos ambientais negativos sobre a zona costeira (SANY *et al.*, 2013).

Desta forma, as atividades portuárias são frequentemente associadas à poluição e à disseminação de diferentes contaminantes em compartimentos ambientais, como a biota, a água e os sedimentos. Uma das contaminações mais importantes que a atividade portuária pode levar é o aumento da concentração de metais (AYDIN *et al.*, 2011).

Metais são contaminantes que geram grande preocupação devido à sua toxicidade, tendências a se acumular no sedimento e bioacumular ao longo da cadeia alimentar. No entanto, a disponibilidade de metais sofre muitas flutuações e, além disso, é muito difícil de se determinar. Uma vez depositados nos sedimentos, os metais podem ser adsorvidos por partículas finas e formar complexos com diferentes compostos como carbonatos, óxidos de ferro e manganês, carbono orgânico e sulfetos. Esses complexos são importantes portadores geoquímicos. Eles podem regular a partição de metais, a mobilidade, a biodisponibilidade e a toxicidade, de acordo com as condições ambientais (RIBA *et al.*, 2003; DELVALLS & CONRADI, 2000).

Esse tipo de poluição pode interferir na comunidade microbiana de várias maneiras. Metais como cálcio, zinco, níquel, ferro, magnésio, manganês e cobalto são nutrientes essenciais em baixas concentrações (ADRIANO, 2001). Esses elementos participam de reações bioquímicas de catalisadores, estabilizadores de proteínas e de parede celular e mantêm o equilíbrio osmótico da célula (HUGHES & POOLE, 1989). Em contraste, metais em altas concentrações são tóxicos para microorganismos, pois podem causar alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas, além de interferir na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico (POOLE & GAD, 1989).

Desta forma, há muitos estudos indicando que a poluição por metais pode levar a mudanças severas na estrutura e composição da comunidade (YAO *et al.*, 2017). Estudos

mostraram que a contaminação a longo prazo no solo tem efeitos prejudiciais sobre a atividade microbiana do solo, especialmente a respiração microbiana (SOBOLEV & BEGONIA, 2008). Além de mudanças mediadas por metais a longo prazo nas atividades enzimáticas do solo, muitos relatórios mostram grandes reduções na atividade microbiana devido à exposição a metais tóxicos em períodos curtos de tempo (QUERO *et al.*, 2015).

Os contaminantes acumulam-se nos sedimentos marinhos e determinam uma redução da biodiversidade, através de efeitos adversos para a biota, a remoção de espécies sensíveis e a seleção nos grupos mais tolerantes (JOHNSTON & ROBERTS, 2009). Algumas bactérias podem desenvolver alguns mecanismos de resistência a metais, tendo assim vantagem sobre os grupos que não conseguem resistir a este tipo de toxicidade.

No entanto, ainda existe uma lacuna sobre como os metais podem influenciar em diferentes taxas e quais os grupos seriam os mais resistentes. Existem muitos estudos que isolaram bactérias resistentes a metais (ZAMPIERI *et al.*, 2016; MATYAR *et al.*, 2008) e alguns estudos que tentaram entender como a contaminação por metais pode influenciar a comunidade bacteriana como um todo (QUERO *et al.*, 2015; HUA *et al.*, 2017). Entretanto, há poucos estudos tentando combinar esses dois aspectos e realmente entender como os metais influenciam em alguns grupos e quais grupos são mais afetados e quais espécies são mais resistentes. Especialmente utilizando para esse fim as técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS) desenvolvidas recentemente (SUN *et al.*, 2012; KORLEVIC *et al.*, 2015; INCHEEN *et al.*, 2018).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi analisar como os metais influenciam a comunidade de bacteriana nas áreas portuárias e na seleção de cepas de resistentes.

3.4.MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Área de Estudo

O trabalho foi desenvolvido em duas áreas portuárias e uma área controle: a primeira na cidade de Santos, a segunda na cidade de São Sebastião e a área controle escolhida é a Praia da Fazenda localizada na cidade de Ubatuba (Figura 11).

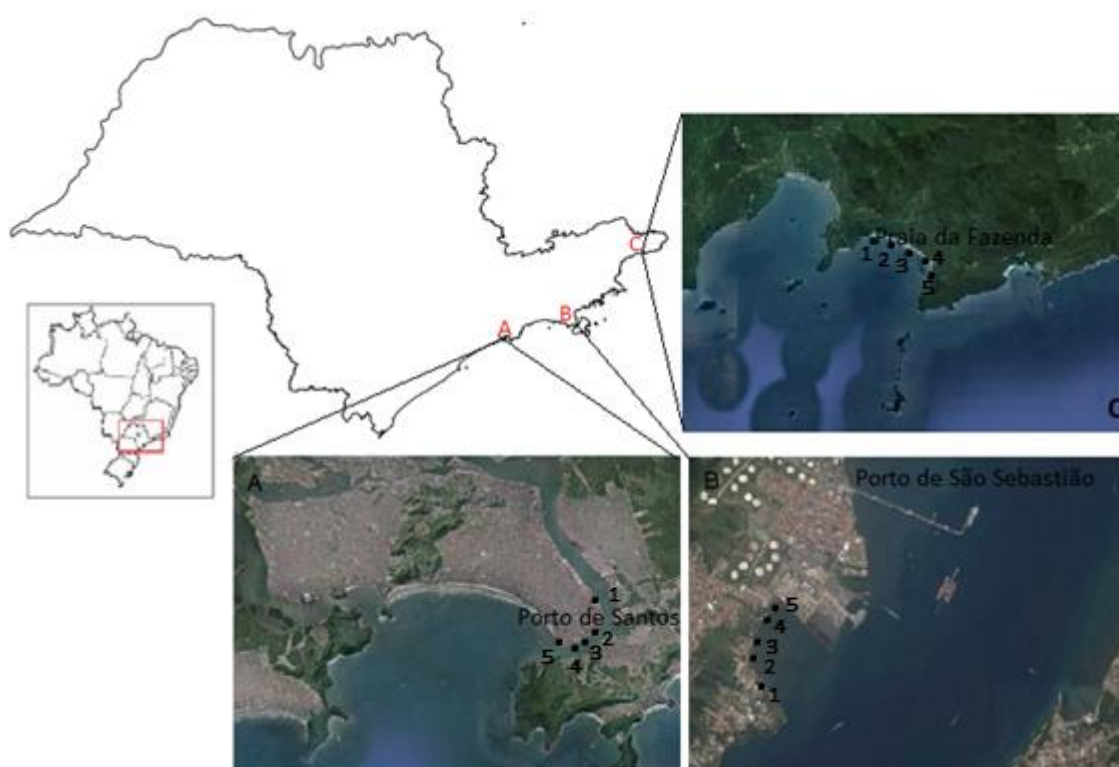


Figura 11 - Mapa do Brasil mostrando a localização do estado de São Paulo e, em detalhe as 3 áreas de estudo: zona estuarina de Santos – São Vicente (A); zona costeira de São Sebastião (B) e a Praia da Fazenda localizado no município de Ubatuba. (Fonte: <https://maps.google.com.br/maps>).

O Município de Santos está localizado na região metropolitana da Baixada Santista (RMBS), região central da costa do estado de São Paulo. A RMBS é de relevante importância para o estado, tanto pelo aspecto ecológico: presença de áreas protegidas, presença do estuário de Santos-São Vicente, manguezais, remanescentes de mata Atlântica; quanto pelo aspecto econômico: atividades industriais e portuária (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

É nessa região que se encontra o maior porto da América Latina (Figura 12). A presença do porto de Santos, docas e locais de extração de petróleo acabam influenciando a qualidade do ambiente que é considerada crítica em relação a contaminação do ecossistema aquático (ABESSA *et al.*, 2008).

Na Baixada Santista existem inúmeras indústrias que produzem os mais variados tipos de produtos e, conseqüentemente, geram muitos resíduos que podem afetar o ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Em 2001, um dos relatórios da CETESB já apontava a existência, na Baixada Santista, de indústrias que utilizam em seu processo de produção diversos metais, além de solventes, fenóis, cianeto, entre outros, que podem afetar significativamente o ambiente e a biota local (CETESB, 2001).

O Sistema Estuarino de Santos é considerado uma região crítica no que diz respeito à contaminação dos ecossistemas aquáticos, sendo que há ocorrência de contaminação elevada por hidrocarbonetos alifáticos no Canal de São Vicente e no interior dos canais de Santos (ABESSA, 2008). Segundo Abessa (2008), essa contaminação parece ocorrer a partir dos terminais de óleo, dos lixões, das indústrias e, em menor escala, do emissário.

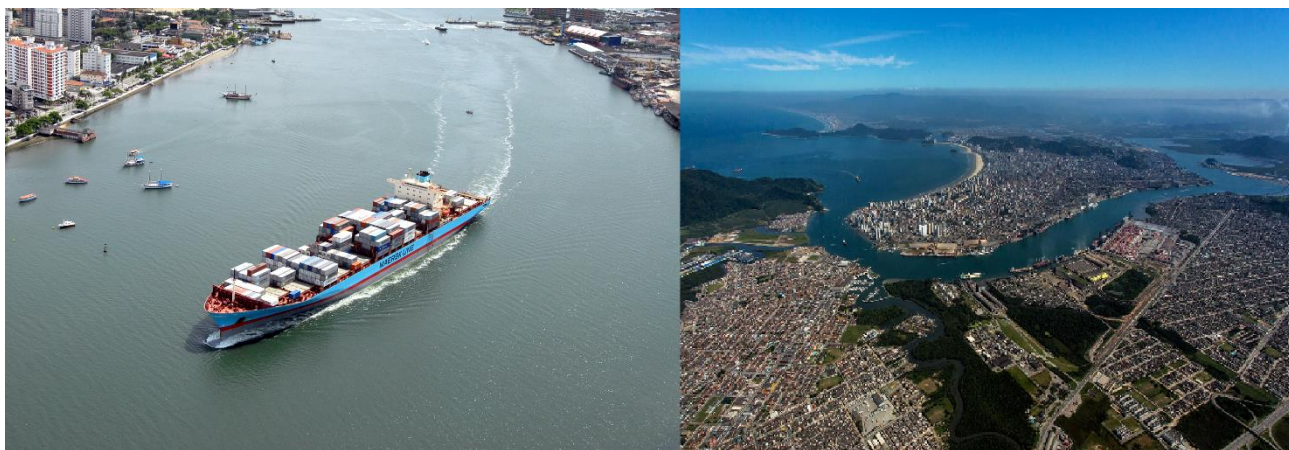


Figura 12- Imagens aéreas do Porto de Santos.

(fonte: <https://web.archive.org/web/20070512181621/http://www.gfmag.com/index.php?idPage=315>)

A cidade de São Sebastião, por sua vez, está localizada no norte da costa do litoral paulista. Nela se encontra o porto de São Sebastião e o Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR) da Petrobrás. Essa área apresenta intenso atividade turística durante os meses de verão. Em contraste, é uma região constantemente exposta a diferentes impactos antrópicos como despejo de esgoto e derramamento de petróleo, além dos impactos relacionados a atividade portuária.

Nessa área também está localizada a Baía do Araça que é representativa na costa brasileira, pois reúne ecossistemas como costões rochosos, manguezais e praias arenosas, em continuidade a uma região de sublitoral que se estende para o interior do canal de São Sebastião – SP. Além disso, possui representativa diversidade biológica (AMARAL *et al.*, 2010).

As águas do porto do Canal de São Sebastião são utilizadas de várias formas, que incluem o porto de cargas, o píer do terminal de petróleo, o transporte de passageiros e automóveis entre São Sebastião e Ilhabela, as marinas, o fundeio de barcos de pesca de pequeno e médio portes na enseada do São Francisco, atividades localizadas de maricultura além de áreas de proteção ambiental (CUNHA, 2003) (Figura 13).

O Terminal Aquaviário Almirante Barroso (TEBAR), localizado em São Sebastião (SP) é o maior terminal aquaviário da América do Sul, sendo responsável pela movimentação diária de 600 mil barris ou 4 bilhões de litros de petróleo por mês, que representam 50% de todo o petróleo consumido no Brasil. Com 40 tanques que armazenam um total de 1,2 bilhão de litros de petróleo e derivados ou o equivalente a 8 milhões de barris (AMARAL *et al.*, 2016).



Figura 13 – Fotos áreas do porto de São Sebastião.
(fonte: <http://portoss.sp.gov.br/apos-adequacao-projeto-de-ampliacao-do-porto-reduz-area-e-nao-tera-intervencao-no-mangue/>)

Vale destacar que ambas as áreas são cenários de acidentes ambientais gravíssimos que ocorrem com certa frequência e que elevam ainda mais os níveis de poluentes presentes nessas regiões. Como exemplo temos o vazamento de petróleo de uma das redes do píer do Terminal Aquaviário Almirante Barroso (Tebar) da Petrobras em 2013 que apresentou manchas de 3km de extensão e que chegou, inclusive, à enseada de Caraguatatuba, que fica cerca de 10 quilômetros distante da origem do incidente. Outro exemplo é o incêndio ocorrido no início de 2015 em tanques de combustível de uma empresa localizada nos arredores do porto de Santos que levou para o estuário uma série de poluentes e que ocasionou entre outros impactos a morte de toneladas de peixes e invertebrados.

Em contrapartida, a cidade de Ubatuba está localizada no litoral norte do Estado de São Paulo. Quase oitenta por cento do seu território consiste em áreas de preservação. O Parque Estadual da Serra do Mar, criado para proteger e preservar a mata atlântica tem três núcleos dentro de Ubatuba: Cunha-Indaiá, Santa Virgínia e Picinguaba. A praia da Fazenda se localiza na região norte de Ubatuba dentro do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba. Esta Unidade de Conservação é demasiadamente importante

porque se configura como um corredor ecológico que possibilita conectar os mais importantes remanescentes de Mata Atlântica do Brasil. Portanto, a praia da Fazenda se configura como uma área conservada do ponto de vista ambiental com trechos intocados de mata Atlântica e restingas (Figura 14) (PQMA, 2011).



Figura 14 – Imagem da praia da Fazenda, Ubatuba – SP. (Fonte: <http://loucosporpraia.com.br/prai-da-fazenda-ubatuba/>).

3.4.2. Coleta de amostras

Em cada área de estudo, Santos, São Sebastião e Ubatuba, foram selecionados 5 pontos de coleta os quais foram georreferenciados com uso de GPS (Figura 11, Tabela 3). As coletas foram realizadas em dois verões (fev./2016 e fev./2017) e dois invernos (jul./2016 e jul./2017). As amostras de sedimento foram coletadas no infralitoral durante a maré baixa, com o auxílio de espátulas estéreis, e acondicionadas em sacolas plásticas estéreis. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração (4 °C) até seu processamento no laboratório de Microbiologia Marinha e Ambiental (Micromar – UNESP/IB CLP).

Tabela 3 – Coordenadas dos pontos de coletas nas três áreas de amostragem (São Sebastião, Ubatuba e Santos) georreferenciados por GPS.

	Pontos	Coordenadas	
		S	W
SÃO SEBASTIÃO	A1	23°49'011	45°24'249
	A2	23°48'431	45°24'273
	A3	23°48'476	45°24'288
	A4	23°48'498	45°24'287
	A5	23°48'531	45°24'293
UBATUBA	U1	23°21'477	44°50'406
	U2	23°21'410	44°50'576
	U3	23°21'370	44°50'095
	U4	23°21'339	44°50'219
	U5	23°21'290	44°50'389
SANTOS	P1	23°59'168	46°17'411
	P1	23°59'172	46°17'451
	P3	23°59'186	46°17'474
	P4	23°59'205	46°17'508
	P5	23°59'118	46°17'323

3.4.3. Variáveis ambientais

Durante as coletas foram determinadas temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, profundidade e pH dos pontos de coleta utilizando sonda multiparâmetros (Horiba 10).

Foram realizadas análise granulométrica do sedimento aplicando o método tradicional de peneiramento e pipetagem descrito por Suguio (1973), para assim determinar as características do sedimento.

Em laboratório também foram determinadas as porcentagens de carbono orgânico total (C.O.T). Para isso foi utilizado o método de Walkley & Black que se baseia na oxidação de carbono orgânico do solo através de íons dicromato em meio fortemente ácido, e a determinação da quantidade de íons Cr^{3+} reduzido é feita por titulação do dicromato em excesso com íons Fe^{2+} (EMBRAPA, 1997).

3.4.4. Determinação de contaminação orgânica

A contaminação orgânica nos locais de coleta, no que diz respeito a esgotos domésticos, foram avaliadas através dos resultados de análises para determinar as densidades de bactéria indicadora de contaminação fecal (bactérias do grupo *Enterococcus*), com base na resolução CONAMA 357 de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (BRASIL, 2005). As densidades de bactérias do grupo *Enterococcus* foram determinadas através da técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2012), utilizando como meio de crescimento o Agar M-Enterococcus.

Alíquotas das amostras de sedimento foram pesadas e acrescidas de água destilada estéril (1:10) e submetidas à agitação por 10 minutos para lavagem e completa extração das bactérias dos grãos, e posteriormente volumes de 10, 50 e 100 mL do sobrenadante serão filtrados em membrana de nitrato de celulose porosidade 0,45 µm (OLIVEIRA & PINHATA, 2008). As membranas foram depositadas em placas contendo Agar M Enterococcus as quais foram incubadas a 37 °C por 24/48 h. Após o período de incubação foram consideradas colônias típicas aquelas que apresentaram coloração marrom avermelhada. As colônias foram transferidas para o meio de cultura Enterococosele caldo, e foram incubadas à 37°C por 48h. Os tubos que apresentaram enegrecimento do meio após o período de incubação foram considerados positivos e as colônias correspondentes confirmadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus* (APHA, 2012).

3.4.5. Determinação da concentração de metais

A análise dos elementos metálicos cromo, cobre, cádmio e zinco foram realizadas em amostras de sedimento superficial que foram congeladas e liofilizadas, segundo a metodologia SW 846 US EPA 3051 (USEPA, 1994), a qual consiste em uma digestão ácida capaz de dissolver a maior parte dos elementos de origem antrópica. As estruturas silicáticas não são dissolvidas por esse procedimento.

Foram adicionados 10 mL de HNO₃ a 300 mg de sedimento seco e essa solução foi submetida a ação de microondas por 30 minutos em diferentes potenciais, de 250W a 890W. Em seguida a amostra foi filtrada em papel filtro Whatman 41 e a solução resultante teve seu volume elevado a 45 mL. Os metais foram quantificados por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES). Para

verificação da metodologia analítica foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs), EnviroMAT SS-1 e EnviroMAT SS-2 da SCP Science.

3.4.6. Determinação da abundância de bactérias heterotróficas

Foram pesadas alíquotas de 20 g de sedimento, que foram acondicionadas em erlenmeyers estéreis e acrescidas de água deionizada e purificada (água Milli-Q). As amostras foram submetidas ao processo de agitação (agitador tipo vortex), por cinco minutos, para a remoção dos microrganismos aderidos aos grãos de areia, e depois deixadas em repouso por 10 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Posteriormente, 100 mL do sobrenatante foram transferidos para frascos de vidro estéreis, contendo formaldeído com concentração final de 5% (V/V), para fixação dos microrganismos presentes nas amostras. Estes frascos foram mantidos sob refrigeração para posterior determinação dos microrganismos através do método de contagem direta de microrganismos utilizando microscopia de epifluorescência, segundo Hobbie *et al.* (1977).

Para a contagem de bactérias heterotróficas, alíquotas de 200 μ L das amostras fixadas foram transferidas para tubos de ensaio e coradas com 5 μ L DAPI, 4',6-diamidino-2-fenolindol, (PORTER & FIEG, 1980), mantidas isoladas de qualquer fonte luminosa, por uma hora e então filtradas, por meio de sistema de filtração à vácuo, em membranas Nucleopore Black de 0.2 μ m de porosidade e 25mm de diâmetro (HOBBIE *et al.*, 1977) (Figura 15).



Figura 15- Imagem do kit de filtração utilizado para realização da contagem de bactérias heterotróficas.

Após a filtragem, as membranas foram dispostas em lâminas limpas e estéreis, colocadas de modo que não houvesse a formação de bolhas na interface lâmina-membrana, e por fim, as membranas foram cobertas com uma gota de óleo mineral e uma lamínula limpa e estéril. As contagens foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) acondicionado dentro de uma câmara escura para possibilitar a visualização da fluorescência, sob luz ultravioleta (330 a 390 nm) (Figura 16).



Figura 16 – Imagem capturada no microscópio de epifluorescência das células bacterianas florescendo em azul sob luz ultravioleta.

3.4.7. Isolamento de Bactérias Heterotróficas - análise das cultiváveis

Para cada amostra, 10 g de sedimento foram homogeneizados em 90 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e colocados no agitador por 5 min para que ocorresse desprendimento das bactérias aderidas aos grãos de areia. Após esse processo foi realizada uma diluição seriada até a concentração de 10^{-5} .

As diluições foram plaqueadas em placas de petri contendo meio de cultura Marine Agar 2216E (Difco) e Plate Count Agar (HiMedia), através da técnica de “Spread plate” e incubadas à 28°C, durante de 24-72h.

Após esse período, foi realizada a contagem de colônias crescidas em cada placa com auxílio de contador de colônias Tipo Quebec e os resultados foram expressos como

unidades formadoras de colônia por grama de areia (UFC g⁻¹). A partir de cada placa colônias com aspectos diversos foram selecionadas e isoladas, através da técnica de esgotamento, nos mesmos meios de cultura.

Para o isolamento, foram selecionadas colônias que foram submetidas a uma sucessão de cinco esgotamentos, para obtenção de colônias puras (Figura 17). As colônias purificadas foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C e depois submetidas ao teste de resistência a antibióticos e a metais e posteriormente identificadas através de métodos biomoleculares.

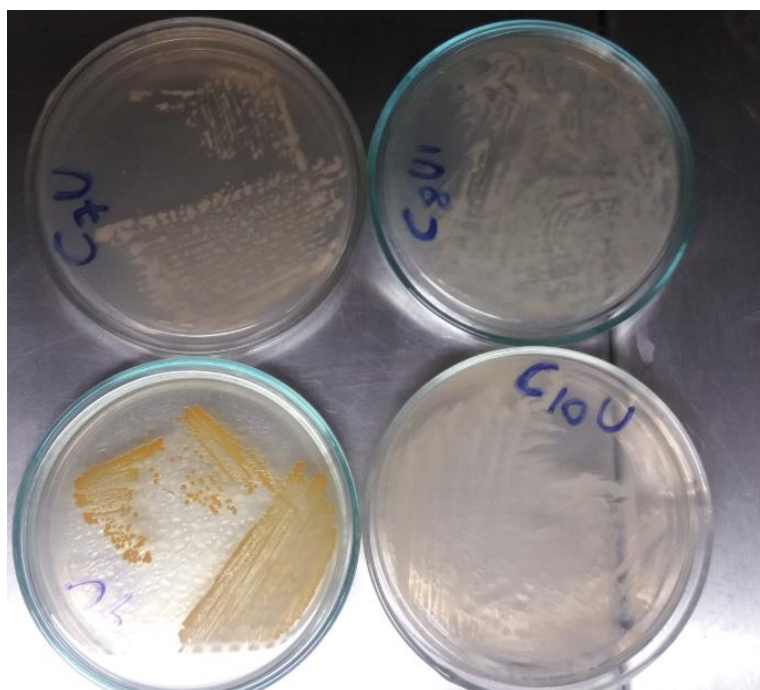


Figura 17 – Crescimento de colônias bacterianas em placas de petri contendo meio cultura Marine Agar 2216E (Difco)

3.4.8. Teste de resistência a metais

Para determinar a resistência a metais das cepas isoladas, foi utilizada a técnica da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

Cada colônia isolada foi inoculada em 1 mL de solução salina, com o controle de turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland (1×10^6 UFC mL⁻¹).

Os inóculos preparados foram reinoculados em placas de petri contendo meio Agar Muller Hinton (Difco™ 225250) com as seguintes concentrações de metais 12,5; 25; 50;

100; 200; 400; 800; 1600; 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cinco diferentes metais foram testados mediante uso dos seguintes compostos: $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; K_2CrO_4 . Os testes foram realizados em triplicatas (MATYAR *et al.*, 2008) (Figura 18).

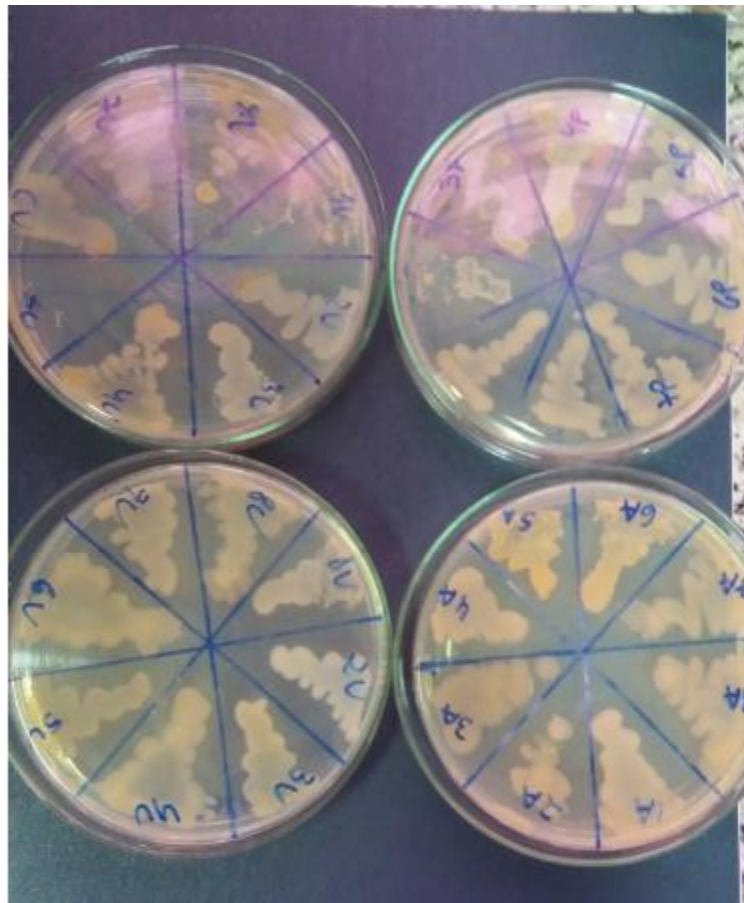


Figura 18 – Teste de resistência aos diferentes metais.

Os isolados foram considerados resistentes quando o valor da CMI exceder o de *Escherichia coli* K-12 que foi usada como controle (AKINBOWALE *et al.*, 2007), como nos trabalhos de Trevors *et al.* (1985), Ahmad & Yadava (1988) e Malik & Jaiswal (2000).

3.4.9. Identificação Molecular das Cepas isoladas

Para realização da identificação molecular foi feita extração do DNA genômico das colônias resistentes armazenadas utilizando o PureLink® Genomic DNA Kit de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 0,8% e quantificado.

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S rDNA através de reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram utilizados oligonucleotídeos para o domínio Eubacteria fD1 “forward” (5’ -17AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) e rD1 “reverse” (5’ AAGGAGGTGATCCAGCC-3’) (WEISBURG *et al.*, 1991).

As reações foram realizadas em volume final de 50 µl contendo 20 pmols de oligonucleotídeos, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão da enzima, 2 U da enzima Taq DNA polimerase (FERMENTAS), 1,5 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti-96 well thermal cycler (Applied Biosystems), dentro do programa 94°C/3 minutos, 30 ciclos de amplificação (94°C/1 minuto, 55°C/30 segundos, 72°C/30 segundos), 72°C/10 minutos.

A avaliação dos amplificados será feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O DNA amplificado foi purificado através do PureLink® Quick Gel Extraction and PCR purification Combo Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, foram retirados 5 µl do produto final, para avaliação por eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificação do DNA para realização da reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Sequencing- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 – Life Technologies. Cada reação de sequenciamento foi ajustada para um volume final de 10 µl, utilizando 20ng dos fragmentos de interesse, 3,2 pmols de oligonucleotídeos iniciadores rD1 ou fD1, 2,0 µl de tampão 2,5x e 0,5 µl dos terminadores Big Dye. As condições de reação foram: 96°C/1 min; 25 ciclos (96°C/1 min., 50°C/5s., 60°C/ 4 min.) (SOUZA, 2013).

Após a reação foi realizada a precipitação adicionando-se 2,5 µl de EDTA 125mM, 30 µl de etanol 100%. A solução foi misturada por inversão e centrifugada por 20 min. a 13.4000 rpm a 4°C. Depois o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 30µl de etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado, a amostra seca a temperatura ambiente e depois armazenada a 4°C.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL), no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), através de sequenciador ABI, modelo 3130 (Applied Biosystems).

As sequências encontradas foram alinhadas utilizando o programa Clustal W 1.8. Posteriormente as sequencias foram ajustadas com o auxílio do programa BioEdit.

Foi utilizado a ferramenta BLASTn da base de dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) para identificação das cepas isoladas.

A análise de distância foi feita com base na região 16S rDNA, utilizando o programa Mega6. Cada sequência obtida neste trabalho foi alinhada às sequências semelhantes (selecionadas pela busca no BLAST), em um alinhamento múltiplo. Em seguida, foi gerada a árvore pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei.

3.4.10. Análise da comunidade microbiana

A extração do DNA metagenômico das amostras de sedimento foi realizada utilizando o kit comercial Mo Bio Power soil. As extrações foram realizadas em triplicata para cada amostra, utilizando 0,25g por amostra e a eluição do material foi realizada em 100µL. A efetividade da extração foi verificada em gel de agarose 1% em TEB 1X; 90 V / 45 min. A quantificação foi realizada através de biofotômetro no qual a qualidade do DNA foi verificada através do resultado da razão dos comprimentos de onda 260/280 nm, que correspondem à contaminação por proteínas. A concentração média obtida foi de 120 ng/µL de DNA e o grau de pureza variou entre 1.5 – 2.0.

O sequenciamento foi realizado no “Centro de Genômica Funcional” da ESALQ – USP. Para análise da estrutura da comunidade e diversidade de bactérias foi utilizado o sequenciamento do tipo “paired-end” no sistema Illumina MiSeq. As amostras de DNA obtidas foram submetidas à amplificação da região V3 e V4 do gene do rRNA 16S. Para essa amplificação foram utilizados iniciadores com adaptadores para posterior sequenciamento. Adicionalmente, os iniciadores “reverse” usados para cada amostra receberam um tag de identificação, composta por 12 bases que serviu posteriormente para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas (CAPORASO *et al.*, 2010, 2011).

O iniciador foward utilizado para amplificação da região V3 e V4 do rRNA 16S com pré-adaptador Illumina foi o: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGT ATAAGAG ACAGCCTACGGGNGGCWGCAG; e o reverse: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATG TGTATAAGAGACAG GACTACHVGGGTATCTAATCC (KLINDWORTH *et al.*, 2013).

As amostras de DNA foram amplificadas em reações de 25uL cada. Na solução foram adicionados 200nM de cada um dos iniciadores foward e reverse, 3 ng de DNA, 0,04 mg de BSA e 10uL de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix. A amplificação

foi feita com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 10 minutos. As amplificações foram feitas em termociclador C100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA). Para todas as reações foram utilizados controles negativos sem DNA, não apresentando produtos na amplificação. Todos os produtos de amplificados foram analisados em eletroforese de gel de agarose 1X TAE- 1,5%.

Alíquotas de 20 uL de cada replica técnica, de cada amostra, foram misturadas e purificadas através do QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR puros foram quantificados por fluorimetria através do fluorômetro Qubit (Invitrogen). O conjunto de produtos do PCR foram sequenciados em duas corridas no sistema Illumina MiSeq, no Centro de Genômica Funcional.

3.4.11. Análise dos resultados

Inicialmente, a análise dos resultados foi feita utilizando o BaseSpace que é uma nuvem para dados de sequenciamento de nova geração da Illumina. Os usuários podem acessar através da nuvem um portal na internet para recuperar, atualizar e analisar seus dados com uma variedade de aplicativos. Os dados foram analisados no aplicativo 16S App pipeline para ver a relevância de os dados. Esse aplicativo realiza a classificação taxonômica de leituras de amplicons direcionadas 16S rRNA usando uma versão Illumina da base de dados taxonômicos do GreenGenes (TEILING & TECOTZKY, 2011).

As sequências foram analisadas usando o programa “Quantitative Insights into 216 Microbial Ecology” (QIIME) (Caporaso et al. 2010). Foi realizado um filtro de qualidade nas sequências obtidas, de acordo com a literatura (Caporaso et al. 2011). Sequências foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com um máximo de distância de 3% usando o programa MOTHUR (Schloss et al. 2009). Todos os dados foram submetidos ao Sequence Read Archive (SRA) do NCBI (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>) através BioProjeto número PRJNA531437.

Também através do MOTHUR foram calculadas as curvas de rarefação, os índices de diversidade de *Shannon-Winner* e *Simpson*, além dos estimadores de riqueza *Ace* e *Chao-1*.

3.4.12. Análises Estatística

Os dados físico químicos do sedimento, assim como as abundâncias relativas da comunidade microbiana foram analisadas utilizando o programa “R”, versão 2.5.0. A análise de variância de uma via (ANOVA) foi aplicada a esses dados, e as diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

Para análise da comunidade, foi realizado um teste de correspondência e as amostras foram agrupadas hierarquicamente com a utilização do programa PAST3. O coeficiente de correlação de Spearman foi aplicado para identificar as correlações entre os dados físico-químicos e a abundância dos grupos de microrganismos. A diversidade microbiana também foi analisada utilizando PAST3 e o MG-RAST.

A análise discriminante linear (LDA) e tamanho do efeito utilizando o método LEfSE foi realizado com a tabela de UTOs para produção de gráficos no MicrobiomeAnalyst (DHARIWAL *et al.*, 2017). Os dados foram normalizados pelo método da soma total de escalonamento (TSS) (DHARIWAL *et al.*, 2017). O método LEfSe incluiu o teste de Kruskal-Wallis para identificar táxons com diferenças significativas e o LDA foi realizado para avaliar o tamanho do efeito de cada recurso. A LDA limiar de 2,0 e um nível de significância de $p < 0,05$ foram utilizados para detectar biomarcadores.

3.4.13. Armazenamento de cepas isoladas com potencial biotecnológico

Ao final do estudo as cepas resistentes a metais e com potencial para futuros estudos de biorremediação de áreas contaminadas por metais foram armazenadas e mantidas em um banco de culturas no Laboratório de Microbiologia Marinha do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista (UNESP).

As cepas resistentes foram transferidas para Eppendorfs contendo caldo nutriente preparado com água do mar esterilizada (filtrada em filtros 0,22 μ m e autoclavada), e acrescido de 20% de glicerol. Os tubos foram armazenados em ultra freezer à temperatura de -80°C.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Variáveis ambientais

As médias das variáveis ambientais encontradas nas coletas de verão e inverno nas três áreas de estudo podem ser visualizadas na tabela 4. As temperaturas ficaram na média de $29,9 \pm 0,12$; $29,6 \pm 0,13$ e $28,6 \pm 0,27$ no verão pra Ubatuba, São Sebastião e Santos, respectivamente e de $22,6 \pm 0,54$; $24,4 \pm 1,54$ e $22,4 \pm 0,78$ no inverno. O O.D. teve média de no verão e de $7,65 \pm 0,55$ em São Sebastião, $6,8 \pm 0,27$ em Ubatuba e $7,8 \pm 0,3$ em Santos. Já no inverno as médias ficaram de $6,85 \pm 0,1$; $6,2 \pm 0,05$ e $6,43 \pm 0,77$, respectivamente.

Tabela 4 – Dados físico-químicos das águas de São Sebastião, Ubatuba e Santos durante as coletas de verão e inverno.

	Pontos	Dados Físico- Químicos				
		Temp	Ph	Salin	OD	profund.
INVERNO S. SEBASTIÃO	A1	19,8	7,94	24,4	6,39	0,5
	A2	20,62	7,89	24,5	5,10	0,65
	A3	21,57	7,91	24,3	5,6	0,4
	A4	21,23	7,93	24,5	5,65	0,25
	A5	21,09	7,97	25,1	5,75	0,25
VERÃO S. SEBASTIÃO	A1	29,5	6,78	27	8,43	0,1
	A2	29,75	6,82	24,7	7,06	0,01
	A3	29,84	6,79	25,7	7,36	0,05
	A4	29,64	6,81	26,1	7,39	0,01
	A5	29,6	6,79	26,6	8,03	0,1
INVERNO UBATUBA	U1	22	4,43	29	7,50	0,2
	U2	22,1	4,77	29,7	6,89	0,25
	U3	23	4,87	30	7,01	0,3
	U4	22,8	4,94	30	7,22	0,35
	U5	23,2	4,95	30	6,77	0,3
VERÃO UBATUBA	U1	29,8	6,39	32	7,22	0,1
	U2	29,98	6,75	23,3	7,01	0,1
	U3	30	6,78	30,1	6,61	0,05
	U4	30,1	6,86	30,3	6,66	0,05
	U5	30,1	6,89	29,6	6,61	0,1
INVERNO SANTOS	P1	21,04	5,8	21,6	7,25	0,2
	P2	22,9	6,4	21,7	5,25	0,1
	P3	22,6	6,33	21,6	5,58	0,3
	P5	22,9	6,56	21,5	6,50	0,2
	P5	22,6	6,64	21,3	7,55	0,3

VERÃO SANTOS	P1	28,5	6,77	25,4	8,1	0,1
	P1	28,27	6,73	25,1	7,8	0,15
	P3	28,7	6,78	25,2	7,66	0,1
	P4	29	6,78	25,3	7,42	0,1
	P5	28,5	6,74	26,1	8,13	0,1

Os dados físico-químicos não apresentaram diferença significativa entre as estações do ano ou entre as áreas. Apenas para temperatura que ficou significativamente menor no inverno para todas as áreas (Figura 19).

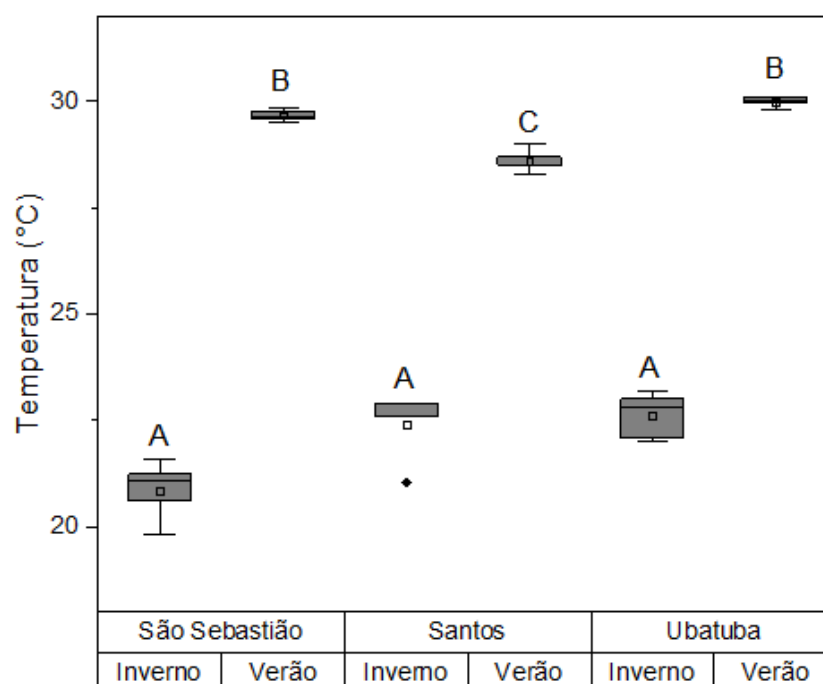


Figura 19 – Temperatura (°C) encontrada na água nos pontos de coleta durante o verão e o inverno. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Em relação a porcentagem de matéria orgânica encontrada no sedimento das áreas de coleta não houve diferença durante as estações do ano (Figura 20). De uma maneira geral, a média das porcentagens apresentou-se maior em Santos ($2,97 \pm 1,55\%$), seguido de São Sebastião ($2,03 \pm 1,03\%$) e Ubatuba ($1,93 \pm 1,24\%$).

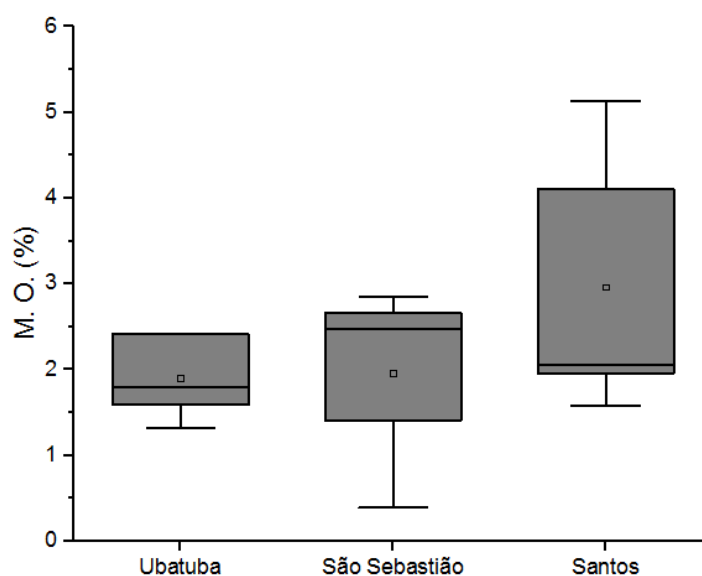


Figura 20 – Percentagem de matéria orgânica (M.O.) encontra no sedimento das três áreas de coleta (Ubatuba, São Sebastião e Santos).

Os dados de granulometria das três áreas podem ser visualizados na figura 21. Pode-se observar que as três áreas apresentam características granulométricas similares, com maior domínio de areia muito fina. Mas Ubatuba e Santos apresentam maiores porcentagens de silte e argila.

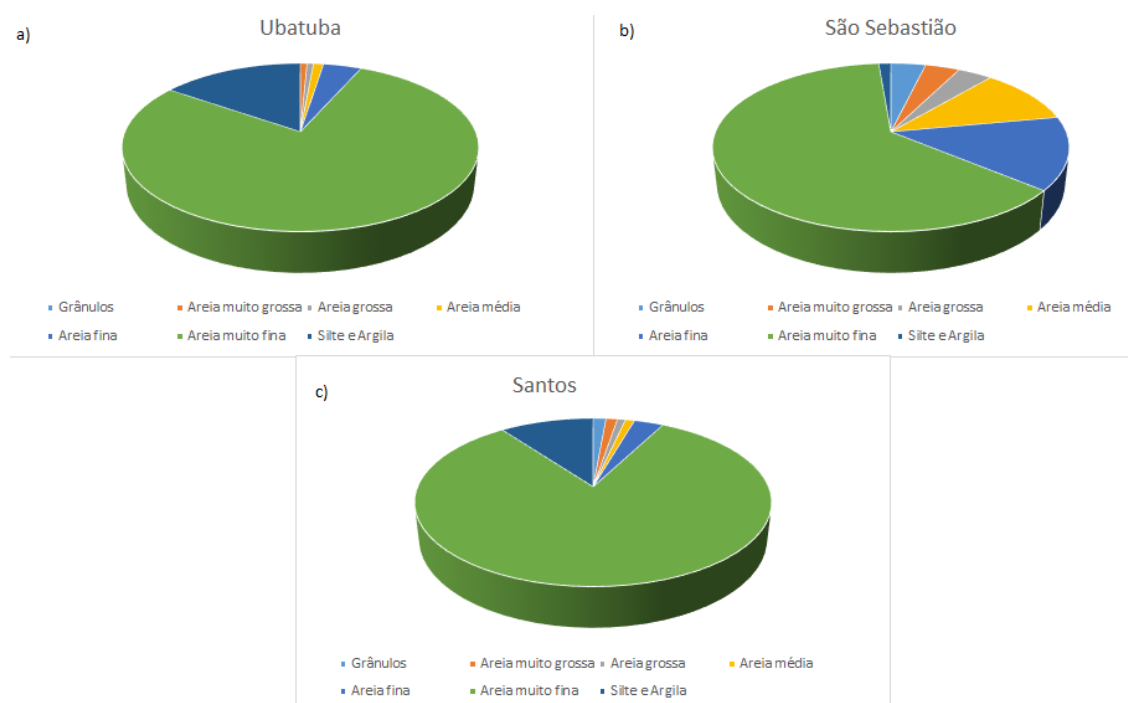


Figura 21 – Análise granulométrica do sedimento das três áreas de estudo (Ubatuba (a); São Sebastião (b); Santos (c)), mostrando a composição (%) do sedimento em grânulos, areia muito grossa, areia grossa, areia média, areia fina, areia muito fina, silte e argila.

Em relação a porcentagem de carbono orgânico total presente nas amostras, não houve diferença significativa entre as amostragens feitas no verão e no inverno e nem entre as áreas de coleta. Mas pode-se observar que as médias das áreas portuárias ficaram mais próximas, em torno de 4%, e na região de Ubatuba a média foi de 2,6% (Figura 22).

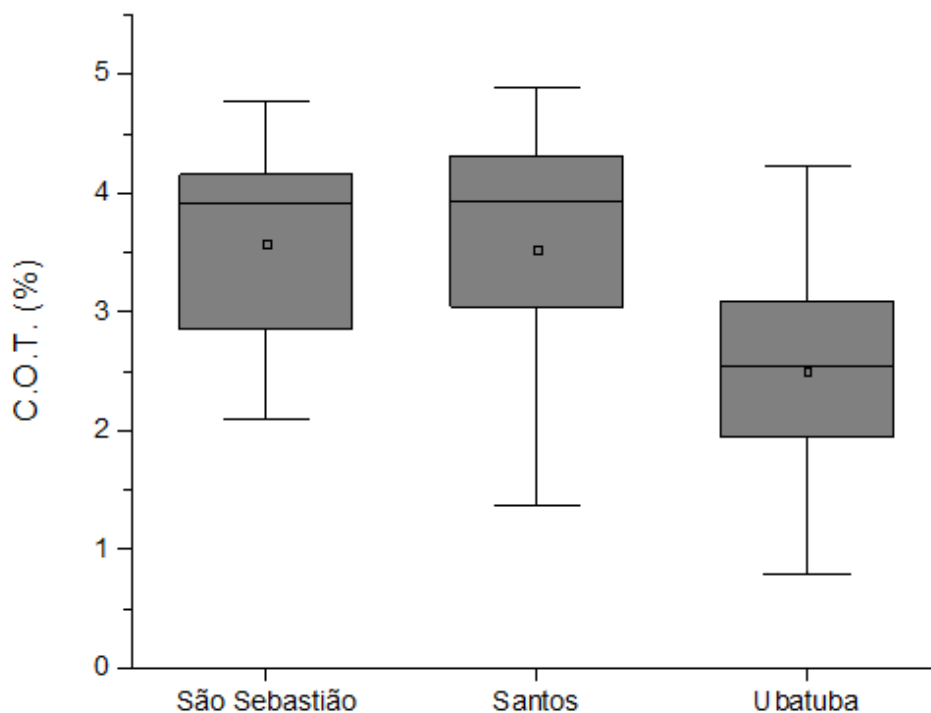


Figura 22 – Boxplot com as porcentagens de carbono orgânico total (COT) para as três áreas de amostragem (São Sebastião, Santos e Ubatuba).

As concentrações de metais encontradas podem ser visualizadas na tabela 5. Para Cd não foram encontrados valores relevantes para nenhum dos pontos de amostragem, ficando todas as amostragens com concentrações <0,6 mg/kg de sedimento. A região de Ubatuba apresentou concentrações baixas para todos os metais, a média para Zn foi de 7,7 mg/kg de sedimento, de Cr foi <0,5 e Cu < 0,6 mg/kg.

Santos apresentou as maiores médias para todos os metais (exceto Cd): Zn 108,2 mg/kg; Cr 17,2 mg/kg; e Cu 16,0 mg/kg. Em São Sebastião as médias encontradas foram de 24,4 mg/kg para Zn, 8,5 mg/kg para Cr e 4,8 mg/kg para Cu.

Tabela 5 – Concentrações médias encontradas nos pontos de amostragem parra Zinco, Cromo, Cobre e Cadmio expressos em mg/kg de sedimento.

		Zinco	Cromo	Cobre	Cadmio
SANTOS	P1	230 ± 0,01	24 ± 0,0004	29 ± 0,001	< 0,4
	P2	144 ± 0,003	12 ± 0,001	8,7 ± 0,0006	< 0,4
	P3	79 ± 0,003	22 ± 0,001	23 ± 0,0005	< 0,4
	P4	60 ± 0,001	15 ± 0,0004	13 ± 0,001	< 0,4
	P5	28 ± 0,0004	13 ± 0,001	6,0 ± 0,005	< 0,4
SÃO SEBASTIÃO	S1	22 ± 0,003	7,3 ± 0,0007	5,1 ± 0,002	< 0,4
	S2	4,1 ± 0,004	5,7 ± 0,006	6,0 ± 0,001	< 0,4
	S3	28 ± 0,004	9,5 ± 0,001	6,7 ± 0,004	< 0,4
	S4	28 ± 0,002	10 ± 0,0008	< 0,06	< 0,4
	S5	40 ± 0,002	9,8 ± 0,0006	6,2 ± 0,002	< 0,4
UBATUBA	U1	5,0 ± 0,0002	< 0,5	< 0,6	< 0,4
	U2	17 ± 0,003	< 0,5	< 0,6	< 0,4
	U3	4,8 ± 0,001	< 0,5	< 0,6	< 0,4
	U4	5,1 ± 0,006	< 0,5	< 0,6	< 0,4
	U5	6,6 ± 0,0003	< 0,5	< 0,6	< 0,4

3.5.2. Contaminação orgânica

A contaminação orgânica nas áreas de amostragem foi analisada através da densidade de *Enterococcus* sp presente nas amostras. Esses resultados podem ser visualizados na figura 23. Pode-se perceber que não houve crescimento em nenhum ponto durante o período de amostragem em Ubatuba (área controle). Já para Santos e São Sebastião tanto no inverno quanto no verão houve densidade elevada desses indicadores de contaminação orgânica. Para essas duas áreas a contaminação orgânica apresentou-se maior período do verão. São Sebastião teve uma média de 1312 UFC g⁻¹ no verão e de 816 UFC g⁻¹ no inverno enquanto que Santos apresentou média de 4498 UFC g⁻¹ no verão e 634 UFC g⁻¹ no inverno.

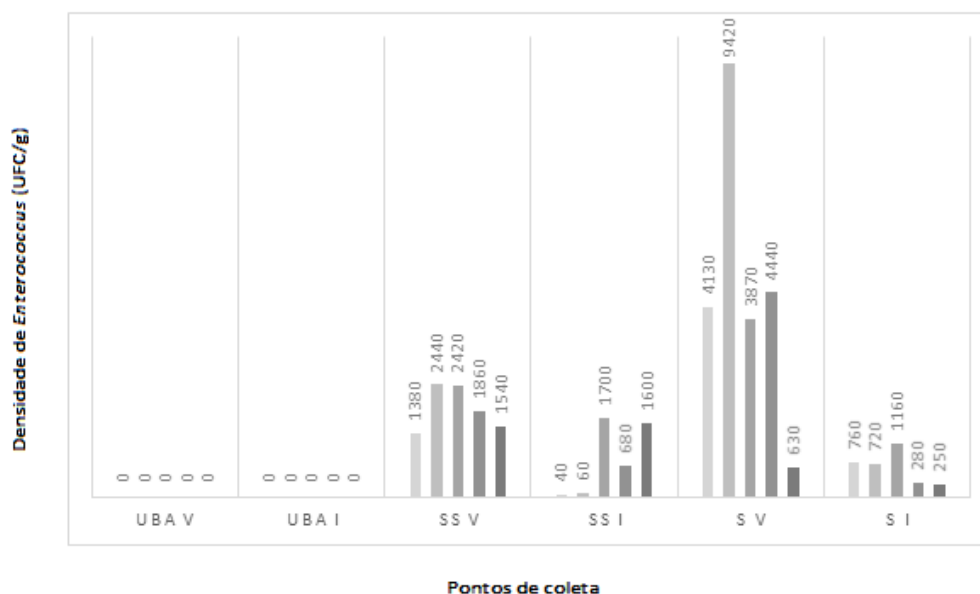


Figura 23 – Densidade de *Enterococcus* sp nos pontos de coleta no verão em Ubatuba (UBA V); inverno em Ubatuba (UBA I); verão em São Sebastião (SS V); inverno em São Sebastião (SS I); e verão em Santos (S V) e inverno em Santos (S I). Os valores estão expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de sedimento.

3.5.3. Análise da comunidade microbiana

Em relação às bactérias isoladas, podemos verificar maior densidade de cepas cultiváveis no verão para todas as áreas de estudo (Figura 24). Em Ubatuba a média ficou de $2,07 \text{ UFC } 10^3 \text{ g}^{-1}$ no inverno e $5,96 \text{ UFC } 10^3 \text{ g}^{-1}$ no verão; em São Sebastião a média foi de $15,79 \text{ UFC } 10^3 \text{ g}^{-1}$ no inverno e de $80,7 \text{ UFC } 10^3 \text{ g}^{-1}$ no verão; e por fim em Santos as médias ficaram de $15,82 \text{ UFC } 10^3 \text{ g}^{-1}$ no inverno e de $48,92 \text{ UFC } 10^3 \text{ g}^{-1}$ no verão.

Portanto as maiores médias foram encontradas em Santos e São Sebastião no inverno e em São Sebastião no verão, seguindo de Santos e Ubatuba.

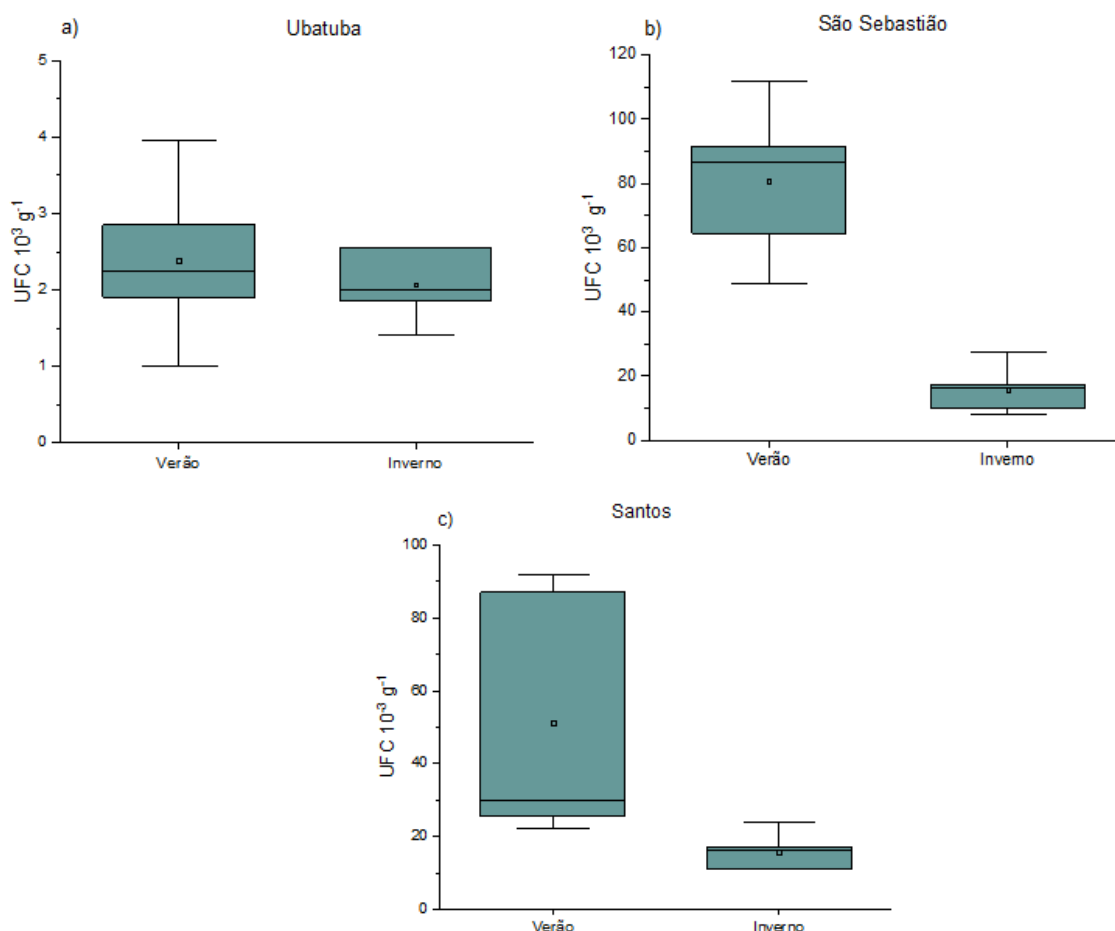


Figura 24 – Densidade bacteriana média em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de sedimento, em Ubatuba (a), São Sebastião (b) e Santos (c).

A densidade bacteriana encontrada nas regiões de amostragem foi maior no verão em São Sebastião e Santos. A média em Santos foi de $4,2 \cdot 10^6$ células g^{-1} no verão e de $2,3 \cdot 10^6$ células g^{-1} no inverno, enquanto em São Sebastião a média foi de $2,1 \cdot 10^6$ células g^{-1} no verão e $1,3 \cdot 10^6$ cel g^{-1} no inverno. Nessas duas áreas, os valores foram estatisticamente diferentes entre o verão e o inverno ($p = 0,002$; $p = 0,012$, respectivamente). Em Ubatuba, a média foi de $0,5 \cdot 10^6$ células g^{-1} no verão e $0,3 \cdot 10^6$ células g^{-1} no inverno não diferem estatisticamente ($p = 0,91$). No entanto, as médias foram significativamente menores quando comparadas às de Santos e São Sebastião ($p = 0,011$ e $p = 0,022$, respectivamente) (Figura 25).

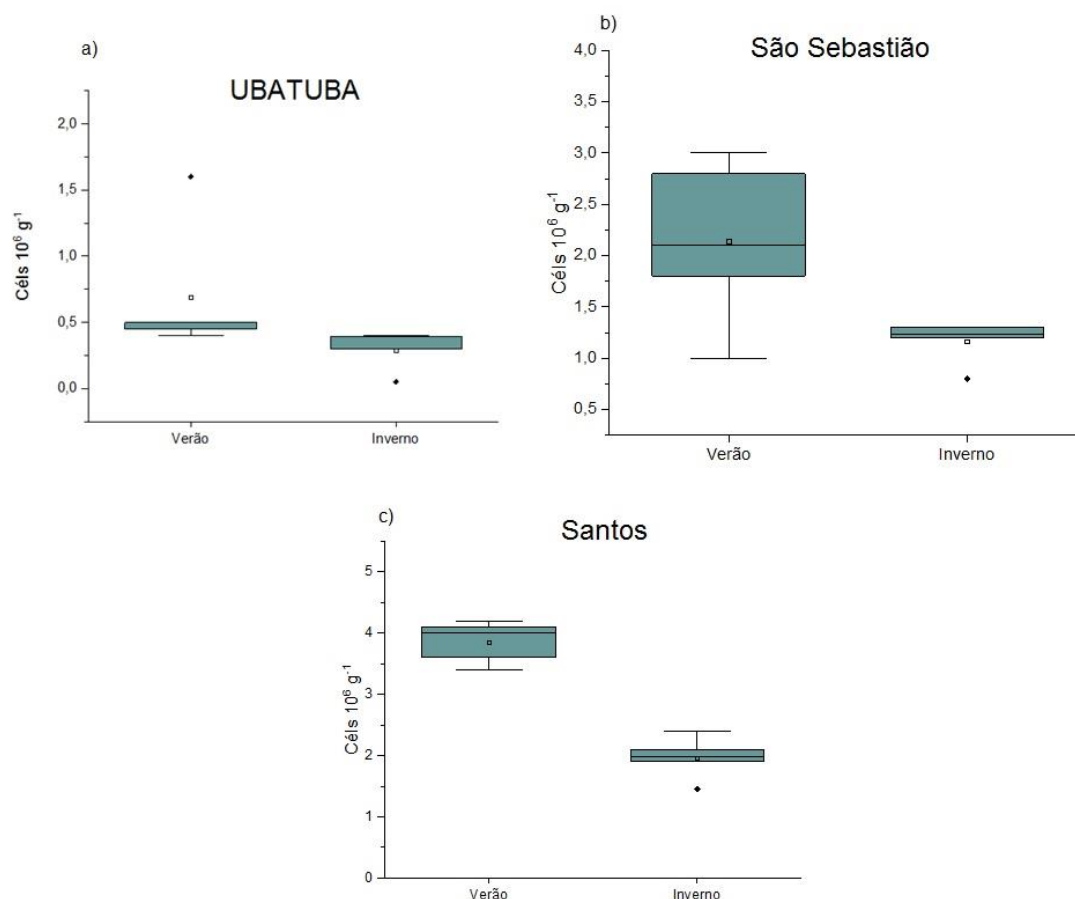


Figura 25 – Densidades médias de bactérias heterotróficas (células x 10⁶ por grama de sedimento) encontradas para as áreas de Ubatuba (a), São Sebastião (b) e Santos (c) no verão e no inverno.

A composição da comunidade mostrou que as OTUs foram afiliadas a 35 filos, 66 classes e 134 ordens. Na tabela 6, é possível visualizar o índice de diversidade alfa para todas as amostras durante o verão e o inverno, além do número de sequências e OTUs. A estação de São Sebastião apresentou valores mais baixos para os índices Simpson, Shannon e Chao-1 e maior para Dominance. Em Ubatuba, foram encontrados maiores índices de diversidade (Shannon), riqueza e menores valores de índice de dominância. A diversidade foi significativamente menor nas áreas portuárias em comparação com a área pristina. Em Ubatuba, a média do índice Shannon-Winner foi de 4,75; em Santos era de 4,58; e em São Sebastião foi de 3,99. O Mann-Whitney pairwise mostrou que o índice encontrado em Ubatuba foi significativamente maior ($p = 0,006$ – em comparação com São Sebastião; $p = 0,017$ - em comparação com Santos). Em contrapartida, entre as duas áreas portuárias não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,6$).

Tabela 6 - Índice de diversidade alfa (Simpson, Shannon, Chao-I e Dominância), número de sequências e UTOs para as três áreas de estudo: Ubatuba, São Sebastião e Santos, durante o verão (V) e inverno (I).

	Simpson (1-D)	Shannon (H)	Equitabilidade (J)	Chao-1	Dominância (D)	Sequências	OT Us
Ubatuba V	0,98	4,74	0,73	682,82	0,01	211.579	938
Ubatuba I	0,98	4,76	0,73	702,74	0,01	183.726	898
São Sebastião V	0,97	4,83	0,74	737,76	0,05	223.989	1.210
São Sebastião I	0,63	2,55	0,74	601,32	0,36	169.047	692
Santos V	0,77	4,45	0,69	687,10	0,02	175.980	906
Santos I	0,97	4,72	0,73	680,58	0,02	193.999	953
Ubatuba	0,98	4,75	0,73	692,78	0,01	197.653	918
São Sebastião	0,80	3,99	0,74	669,54	0,20	196.518	951
Santos	0,87	4,58	0,71	683,84	0,02	184.989	930

É possível perceber que os 5 filos mais abundantes possuem percentuais similares nas regiões (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Cyanobacteria*). Em seguida, filos menos abundantes aparecem em maior percentual e maior número na região de Ubatuba. Por exemplo, em Ubatuba é possível observar maior percentual de *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Chlorobi* e *Caldithrix* (Figura 26).

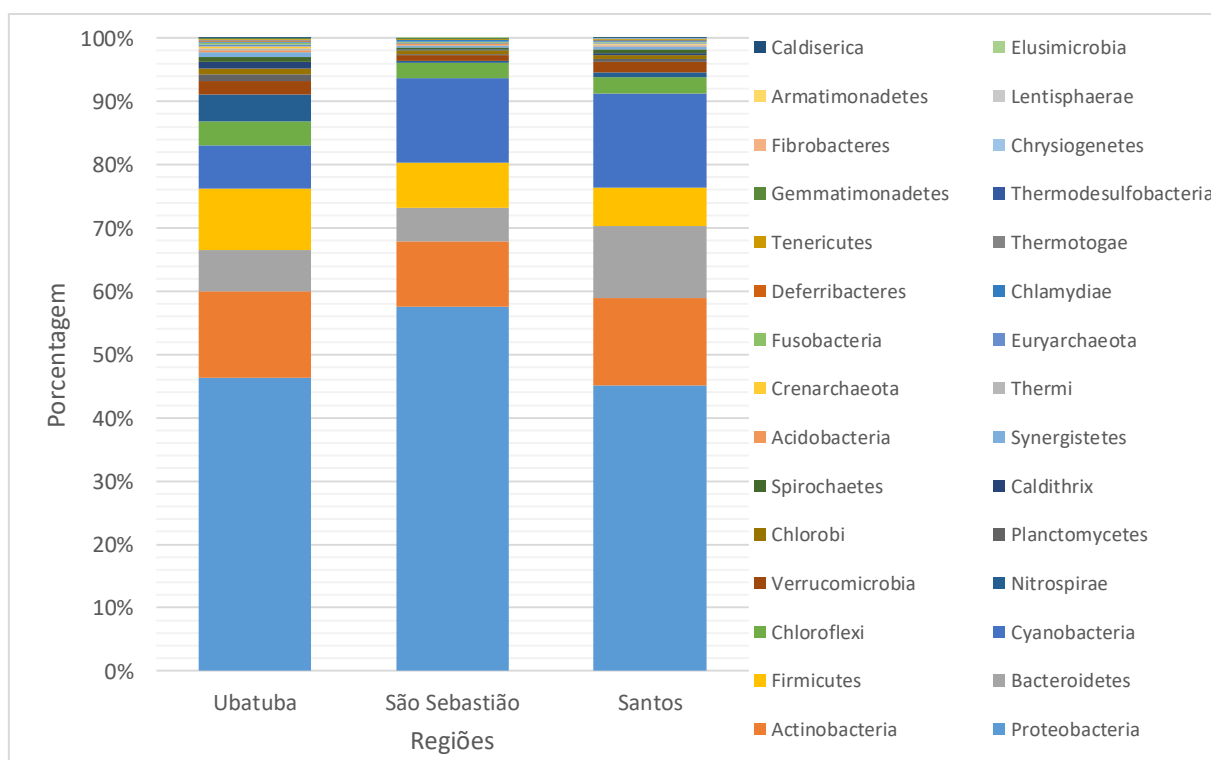


Figura 26 - Gráfico de barras empilhadas a 100% das abundâncias relativas das bactérias dominantes e dos filos de archaea derivadas dos genes 16SrRNA dos três locais de amostragem (Ubatuba, São Sebastião e Santos).

A composição da comunidade mudou significativamente entre as duas áreas portuárias e Ubatuba (Figura 27). É possível ver que a comunidade das duas áreas portuárias é mais semelhante, mas diferem da comunidade de Ubatuba. Apenas dois pontos do Porto de Santos foram semelhantes à composição familiar encontrada em Ubatuba. Foi possível observar que na área de controle a abundância relativa das principais famílias são mais homogêneas e *Ectothiorhodospiraceae* (12,5%), *Flavobacteriaceae* (4,6 %), *Pseudoalteromonadaceae* (4,9%), *Rhodobacteraceae* (4,2%), *Desulfobacteraceae* (3,9 %) e *Saprospiraceae* (3,3%) foram a família em maior abundância relativa. Por outro lado, na maioria das estações do Porto de Santos e São Sebastião, foi possível observar o predomínio de diferentes famílias (percentagens médias): *Thermomonosporaceae* (3,9%), *Chromatiaceae* (4,5%), *Desulfovibrionaceae* (5,9 %), e *Pseudonocardiaceae* (9,6 %). As estações S1, S3, S5 durante o inverno tiveram uma composição muito diferente da outra, a principal razão foi uma grande dominância de *Caldilineaceae* (5,3%).

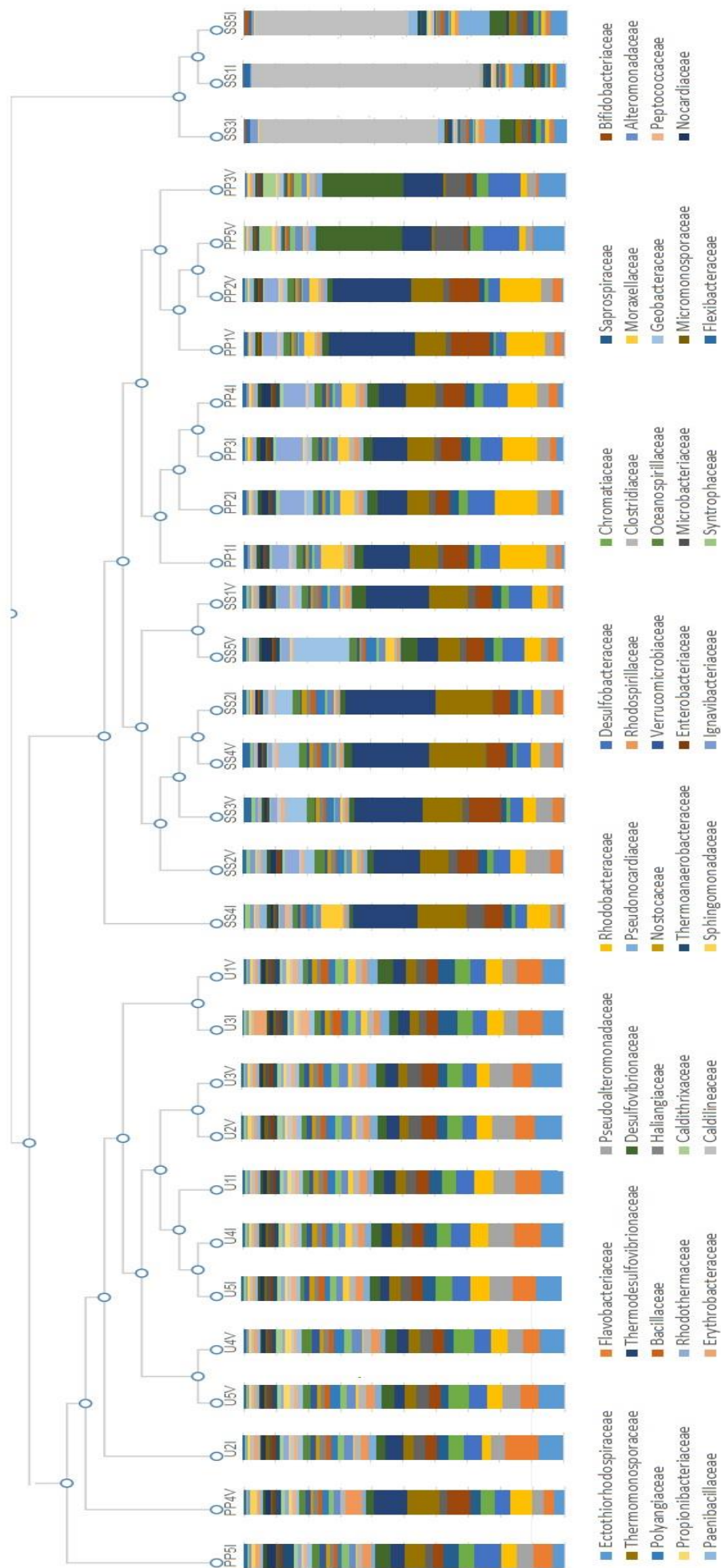


Figura 27 - Dendograma mostrando um agrupamento hierárquico de amostras com base em classificações de nível familiar. O gráfico de barras abaixo de cada amostra mostra a abundância relativa de suas classificações de nível familiar nas três regiões de coleta (Ubatuba - U; São Sebastião - S; Santos - P) durante o verão (V) e inverno (I).

A análise correspondência canônica, usando a composição microbiana ao nível de gênero e os parâmetros físico-químicos demonstrou diferença estatística significativa entre as três regiões ($p < 0.05$). Além disso, é possível notar uma densidade correlaciona à região de Santos, enquanto que a riqueza e diversidade de espécies está correlacionada à região de Ubatuba (figura 28). *Ectothiorhodospira*, *Thiorhodospira*, *Thermodesulfobivrio*, *Dethiosulfobivrio* e *Acinetobacter* foram os gêneros presentes em maior abundância na área pristina. *Escherichia*, *Lewinella*, *Pseudoalteromonas*, *Lutimonas* foram gêneros mais abundantes nas áreas portuárias. A concentração de metais, especialmente Zn e Cu, estão também correlacionadas às áreas portuárias (Santos e São Sebastião), onde existe a dominância de *Marichromatium*, *Dunoroseobacter*, *Jannaschia* e *Escherichia*.

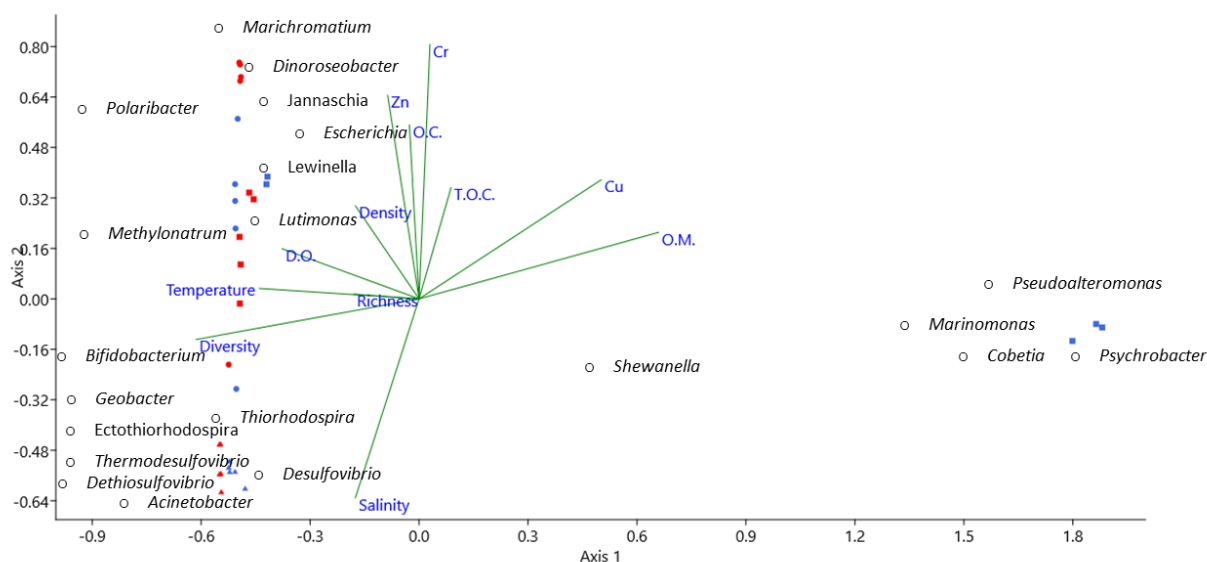


Figura 28- Análise de correspondência canônica mostrando a correlação entre composição bacteriana em nível de gênero (sequenciados através do gene 16S rRNA) e variáveis ambientais (COT, MO, temperatura, contaminação orgânica, salinidade), concentrações de metais (Cd, Cu, Cr e Zn) e características das comunidades (densidade de bactérias, índice de riqueza e diversidade) em cada local (Santos (ponto); São Sebastião (praça) e Ubatuba (triângulo)) durante o inverno (cor azul) e verão (cor vermelha).

A análise LEfSe (LDA Effect Size) foi capaz de buscar biomarcadores estatisticamente significativos entre os grupos, ou seja, gênero com diferenças

significativas entre os grupos. O “score” LDA de amostras das três regiões foi utilizado para identificar grupos bacterianos com diferença estatística significativas entre às três áreas. Foram encontrados 124 gêneros com diferenças significativas entre as três regiões. A figura 29 mostra os 50 grupos mais abundantes que aparecem com diferenças significativas entre as regiões. A área pristina apresentou 20 gêneros mais abundantes em comparação com as outras duas áreas.

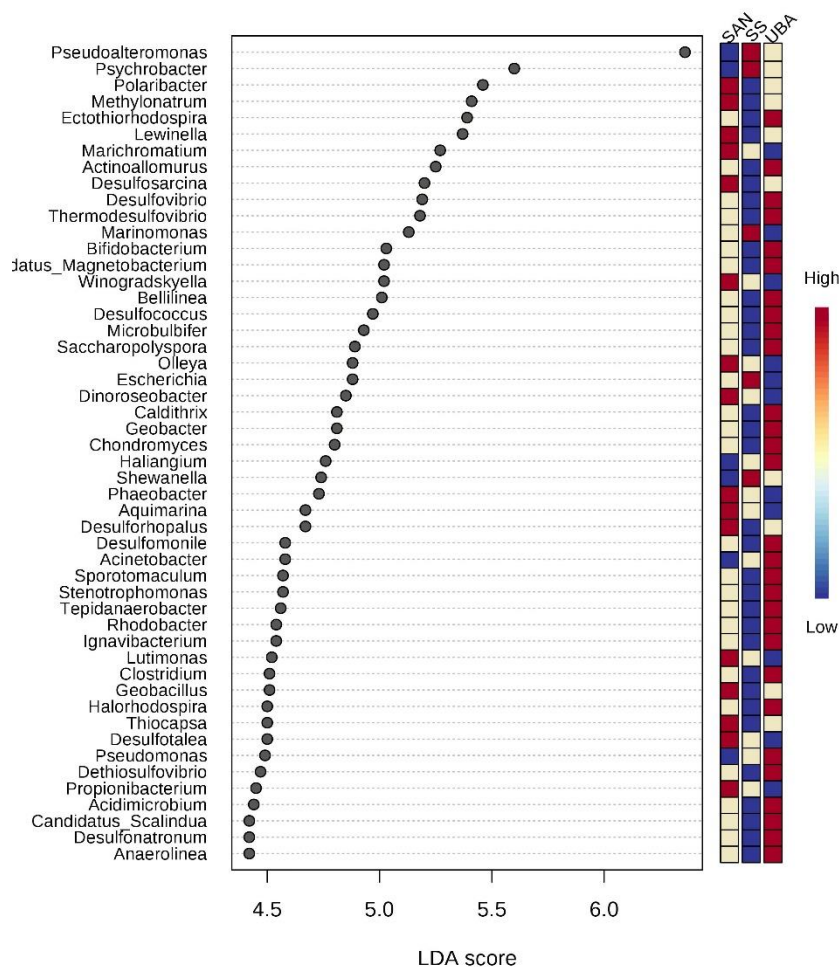


Figura 29- Análise LefSe da abundância de bactérias entre diferentes áreas de estudo (São Sebastião-SS; Santos-SA; Ubatuba-UBA).

Através do teste de correlação foi possível observar uma forte correlação positiva com metais e contaminação orgânica (Figura 30). O cádmio foi o único metal que não mostrou nenhuma correlação com nenhum filos. *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e *Thermodesulfobacteria* foram os filos que apresentaram correlação positiva fraca com contaminação orgânica e com Cu e Zn. *Chloroflex*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Chlorobi*, *Caldithrix*, *Synergistetes*, *Acidobacteria*, *Thermi*, *Euryarchaeota* e

Deferribacteres foram os filos que apresentam correlação negativa (fraca ou forte) com Cu, Cr e Zn.



Figura 30 – Mapa de calor com os valores de correlação de Spearman dos principais filos encontrados com as concentrações dos metais (cobre (Cu), cromo (Cr), zinco (Zn) e cádmio (Cd) e valores de contaminação orgânica encontrados.

Para entender se a poluição por metais pode influenciar nos diferentes processos fisiológicos que ocorrem nos sedimentos marinhos, foi feita uma análise de componentes principais, que é mostrada na figura 31. É possível que a maior parte dos diferentes grupos seja mais representativa na área pristina, mostrando uma correlação negativa, especialmente com Cr e Zn. Além disso, alguns grupos como bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias nitrificantes, metilotróficas e metanogênicas aparecem em maior abundância em Ubatuba.

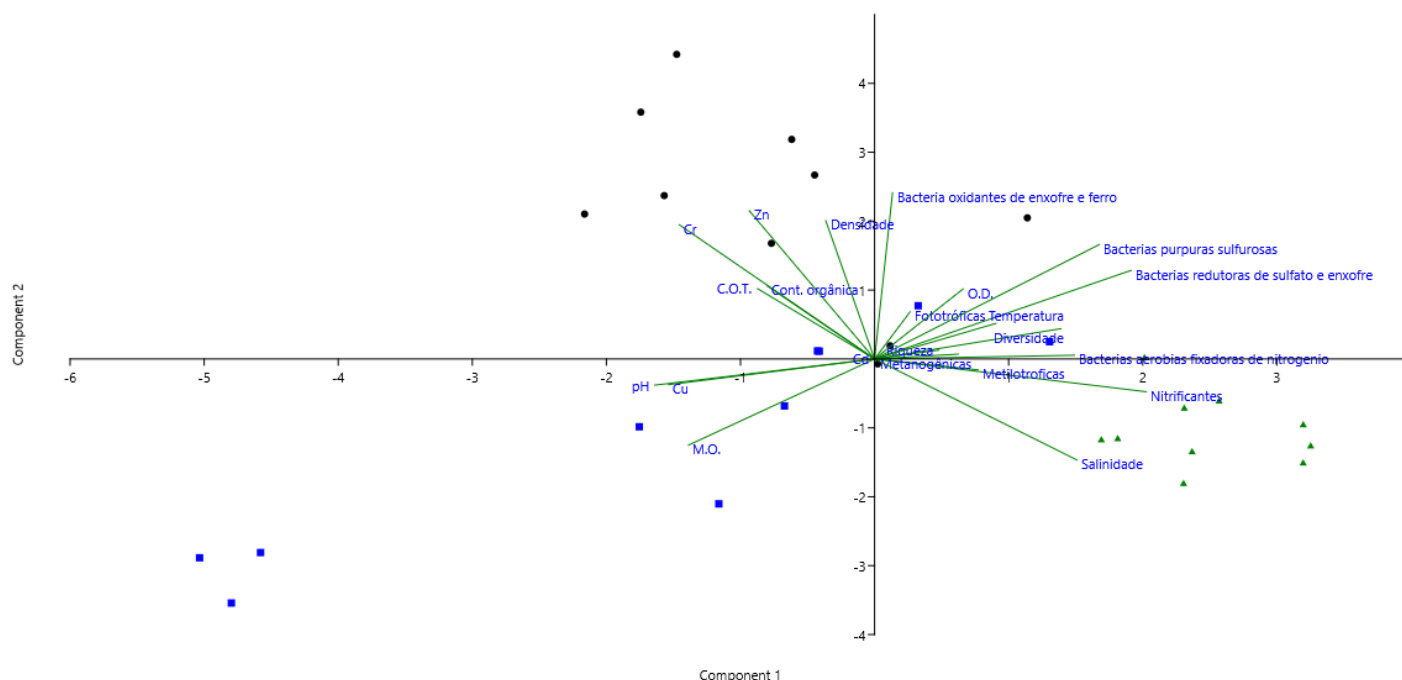


Figura 31 – Análise de componente principal mostrando a relação entre variáveis ambientais (COT, MO, temperatura, contaminação orgânica, salinidade), concentrações de metais (Cd, Cu, Cr e Zn) e tipos importantes de fisiologia microbiana em cada local (Santos (ponto preto); Sebastião, (quadrado azul) e Ubatuba (triângulo verde).

3.5.4. Resistência aos metais

No presente trabalho foram isoladas 100 cepas para realização dos testes de resistência. Deste total, 48,4% de cepas foram resistentes a Zn; 37,2% ao Cd; 50% ao Cr e 14% ao Cu, sendo que a maior parte delas foi isolada de São Sebastião. As porcentagens de resistência para cada área, para cada um dos metais podem ser visualizadas na tabela 7.

Tabela 7 - Frequência (%) de cepas resistentes em cada uma das áreas de coleta.

	Zn	Cr	Cu	Cd
<i>São Sebastião</i>	60,8	70	3	39
<i>Santos</i>	33,3	17	2	40
<i>Ubatuba</i>	50	33,3	10	42

O perfil dos resultados das concentrações mínimas inibitórias, para todas as cepas isoladas, está presente na tabela 8.

Tabela 8 – Porcentagem de cepas resistentes obtidas através de testes em diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr e Zn.

Metais	Porcentagem (%) de cepas tolerantes a cada concentração de metais (ug mL ⁻¹)										% cepas resistentes
	12,5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	>3200	
Cádmio	100	72	57	39,2*	22	9	5	5	0	0	39,2
Cobre	100	95	94,1	86	49	26	14*	0	0	0	14
Cromo	100	100	100	100	100	97,0	70,8	50*	0	0	50
Zinco	100	100	94,0	93,0	82,5	37,2*	14,3	3	0	0	37,2

* Concentração mínima inibitória da cepa padrão *Escherichia coli* K12.

3.5.5. Identificação das cepas isoladas

A Figura 32 mostra a identidade das cepas resistentes. É possível notar que o *Vibrio* sp foi o gênero mais isolado (38%), seguido pelo *Bacillus* sp (34%) e *Pseudomonas* sp (8%). As outras espécies *Marinobacter* sp, *Micrococcus yunanensis*, *Escherichia* sp, *Staphylococcus warneri* e *Enterobacter cloacae* apresentaram 4% cada.

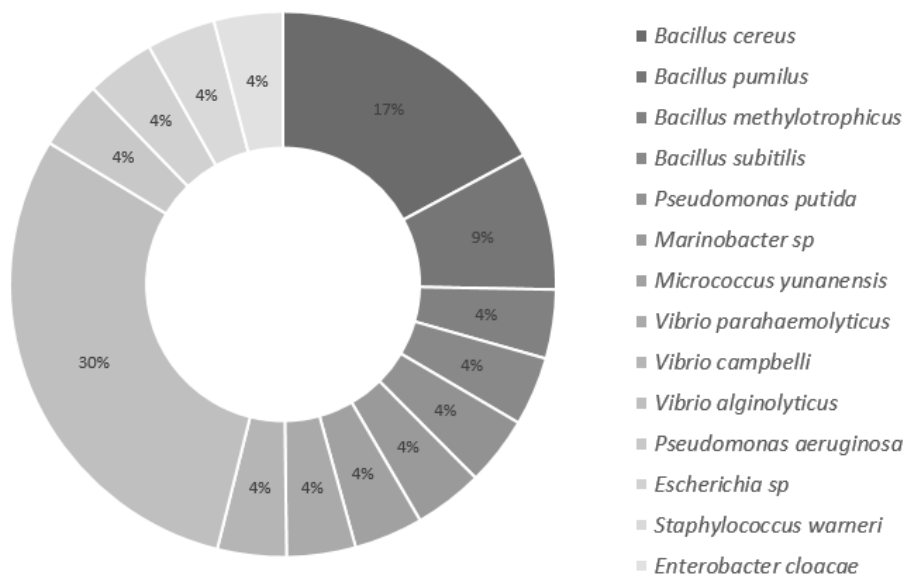


Figura 32 – Porcentagem de espécies de cepas resistentes isoladas e identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

3.6. DISCUSSÃO

As áreas portuárias são geralmente associadas à poluição e contaminação. Há muitas atividades que contribuem para a fonte de contaminação: tráfego marítimo, carregamento, reparos e dragagem, bem como escoamento de águas pluviais, descarga de efluentes, poeira, etc. (GALKUS *et al.*, 2012). Além disso, o acelerado desenvolvimento da urbanização e industrialização e as densas atividades marítimas na área, a existência de muitos tipos de indústria pode ser responsável pelo acúmulo de poluentes de alto nível (ABDOLLAHI *et al.*, 2015). É por isso que foi encontrado em Santos e São Sebastião níveis mais altos de metais comparando-se com a área pristina. O zinco foi o metal encontrado em maior concentração no Porto de Santos. Segundo Pinto *et al.* (2015) sedimentos do Sistema Estuarino Santos-São Vicente revelaram maior acúmulo de zinco, principalmente por causa de algumas fontes da indústria química.

Por outro lado, a Praia da Fazenda pertence a uma área de proteção ambiental onde as atividades antrópicas são mais reguladas. É por isso que nesta área os níveis de metais eram extremamente baixos e as densidades de *Enterococcus* sp não apresentavam contaminação orgânica (figura 23).

A contaminação orgânica aparece principalmente devido à descarga de efluentes. Esse tipo de contaminação geralmente aumenta excessivamente durante o verão, onde a população aumenta nessas áreas devido ao turismo e atividades de veraneio (ZAMPIERI *et al.*, 2017). Essa fator explica o aumento da contaminação orgânica nas áreas durante o verão.

A entrada de compostos orgânicos influi diretamente na comunidade microbiana. Quando os níveis de nutrientes aumentam, a abundância de bactérias tende a aumentar na mesma proporção. Observou-se em todas as áreas, mas especialmente em Santos e São Sebastião, maiores densidades de bactérias, principalmente durante o verão, quando a entrada de nutrientes foi maior (figura 24 e 25).

Esse material orgânico pode trazer alguns contaminantes orgânicos tóxicos e importantes que podem interferir na comunidade microbiana. Não foi objetivo do presente estudo, mas é necessário levar em consideração que diferentes tipos de componentes orgânicos como hidrocarbonetos, n-alcanos, hidrocarbonetos isoprenóides e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), que são os principais componentes do petróleo e seus derivados, pode prejudicar populações de bactérias. Kim *et al.* (2015) mostraram que os HAPs estavam abaixo dos níveis tóxicos nas mesmas estações que

foram coletados sedimentos para este estudo. Pinto *et al.* (2015), tentaram mostrar efeitos de metais e hidrocarbonetos na abundância e diversidade microbiana no estuário de Santos, e não foram encontrados níveis que apresentem riscos para a biota. Além disso, Pinto *et al.* (2015), comparando os dois tipos de contaminantes, mostraram que a presença de metais nos sedimentos pode levar a mudanças drásticas na abundância e diversidade de populações microbianas, além de interferir em processos microbiológicos extremamente importantes para manter a saúde dos sistemas estuarinos.

Além disso, fatores físico-químicos, incluindo pH, temperatura, teor de água, concentração de oxigênio, teor de carbono orgânico e disponibilidade de nutrientes, também podem influenciar a composição da comunidade microbiana (LI *et al.*, 2012). Da mesma forma, contaminantes como metais podem se acumular nos sedimentos e determinar a redução da biodiversidade, por meio de efeitos adversos à biota residente, a remoção de espécies sensíveis e a seleção de espécies mais tolerantes (JOHNSTON & ROBERTS, 2009). Portanto, metais podem alterar a composição e estrutura microbiana (QUERO *et al.*, 2015). É importante destacar que outros estudos também mostraram que a comunidade microbiana é mais sensível à contaminação antrópica do que a variação ambiental relacionada a fatores físico-químicos como latitude, salinidade ou pH (FUHRMAN *et al.*, 2008; LOZUPONE & KNIGHT, 2007).

Aparentemente, a diversidade é afetada pela concentração de metais nessas áreas, de acordo com os valores do índice de diversidade encontrados (tabela 6). Ubatuba teve níveis de diversidade significativamente mais altos. Muitos estudos mostram que a poluição por metais reduz a diversidade microbiana nos sedimentos, porque os microorganismos sensíveis à toxicidade dos metais diminuem abruptamente em abundância ou até mesmo se extinguem, enquanto espécies resistentes lentamente se tornam predominantes (KLUG & REDDY, 1984, GILLER *et al.*, 1998 ; GUO *et al.*, 2017). O problema mais perigoso é que mudanças na estrutura da comunidade microbiana podem afetar seriamente a capacidade dos micróbios do solo de degradar a matéria orgânica (GILLER *et al.*, 1998). As bactérias marinhas desempenham um papel importante nos ciclos de nutrientes nas áreas costeiras. Dessa forma, uma redução na diversidade pode prejudicar a função ambiental (QUERO *et al.*, 2015). Li *et al.* (2019) mostraram que a contaminação em sedimentos de mangue pode ter um efeito negativo na capacidade de deposição de nutrientes dos micróbios e, ao mesmo tempo, estimular a biorremediação com o aumento da emissão de gases de efeito estufa. A análise da diversidade alfa também mostrou maiores valores de dominância do índice de

dominância, uma vez que alguns grupos que podem liderar melhor com níveis mais altos de contaminação acabaram sendo dominantes na comunidade. Ubatuba apresentou os menores números de dominância, reflexo da maior diversidade.

Foi possível notar, de acordo com o agrupamento hierárquico de amostras, que quase todas as estações das áreas portuárias estavam agrupadas. As únicas exceções foram as estações P4 e P5 (Porto de Santos) (figura 27). No entanto, nessas estações foi possível perceber que a concentração de metais foi a menor em comparação com outras estações da mesma região. Este fato corrobora a hipótese de que metais podem influenciar a composição microbiana nessas áreas.

Proteobacteria foi o filo mais abundante em todas as amostras. Vários estudos mostram que esse grupo tem predomínio na população de bactérias em sedimentos de áreas costeiras (QUERO *et al.*, 2015, IMCHEN *et al.*, 2018; HUA *et al.*, 2017). No entanto, foi possível ver diferentes composições em cada região de amostragem.

Nas áreas portuárias foram encontradas maiores porcentagens de *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* e *Thermodesulfobacteria* em comparação com Ubatuba. Esses dois grupos apresentaram correlação positiva com as concentrações de metais. Existem alguns estudos mostrando que esses grupos podem ser resistentes e encontrados em áreas contaminadas por metais. Pinto *et al.* (2015) demonstraram que as densidades de cianobactérias foram maiores em sedimentos poluídos por metais em comparação com locais não contaminados. As actinobactérias podem constituir uma microbiota predominantemente ativa, além de proteobactérias α (TEKAYA *et al.*, 2012). Isto pode ser atribuído à sua estrutura morfológica adaptativa, bem como ao seu excepcional poder metabólico.

Por outro lado, em Ubatuba foram encontradas percentuais mais elevados, especialmente nos grupos que não aparecem em grande abundância, e foi observado que esses mesmos grupos apresentaram correlação negativa com as concentrações de metais, por exemplo: *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* e *Chlorobi*.

A análise em nível de gênero (figuras 28 e 29) também mostrou uma composição diferente nas áreas. A área preservada apresentou maior abundância de alguns gêneros relacionados à redução de sulfato e ciclo do nitrogênio. Além disso, *Escherichia*, um gênero que apresenta espécies indicadoras de contaminação fecal, foi encontrado em maior abundância nas áreas portuárias.

Outra questão importante é que os metais podem interferir no importante processo fisiológico microbiano, consequentemente nos ciclos de nutrientes. Já em 1984, Slater &

Capone mostraram que níveis mais altos de metais, como ocorre em alguns sedimentos estuarinos, podem causar perturbações no equilíbrio natural do ciclo de nitrogênio nos sedimentos e, portanto, têm o potencial de afetar toda a coluna de água. Isso pode ser confirmado neste estudo, já que foi possível perceber que a abundância de bactérias fixadoras de nitrogênio e de bactérias nitrificantes apresentou correlação negativa com alguns metais como Zn e Cr, demonstrando maior abundância no local com menores concentrações desses metais.

Organismos metilotróficos e metanogênicos aparecem em maior abundância em Ubatuba em comparação com as duas áreas portuárias. Alguns estudos mostram que os metais influenciam a eficiência metanotrófica do solo (DURISCH-KAISER *et al.* 2005; WANG *et al.* 2011).

Foi demonstrado que altas concentrações de metais inibem o metabolismo bacteriano e o “turnover” bentônico (DELL'NNO *et al.*, 2003), além de influenciar a diversidade de micróbios residentes e selecionar aqueles que são mais tolerantes aos metais (GILLAN, 2015). O perfil resistente a metais tenta elucidar essa afirmação. No entanto, não foi possível ver claramente uma maior quantidade de deformação resistente a metais nas áreas portuárias em comparação com a área de controle.

A resistência microbiana aos metais tóxicos é generalizada, com frequências que variam de alguns por cento em ambientes intocados a quase 100% em ambientes altamente poluídos (SILVER & PHUNG, 2009). A biodisponibilidade dos metais pode mudar de acordo com características diferentes do sedimento e do ambiente, e tamanho de partícula, matéria orgânica, pH, sulfeto ácido-volátil (TAN *et al.*, 2013). Os ambientes naturais são muito complexos, sendo difícil prever a biodisponibilidade dos metais, e isso também influenciará nos padrões de resistência da comunidade.

Por outro lado, foi possível notar que alguns gêneros podem desenvolver facilmente mecanismos de resistência a metais, por isso os gêneros mais isolados foram *Bacillus* sp, *Vibrio* sp e *Pseudomonas* sp.

A maioria dos mecanismos de sobrevivência depende de alguma mudança na especiação do metal, levando à diminuição ou aumento da mobilidade. Estes incluem transformações redox, a produção de peptídeos e proteínas de ligação a metais (GAAD, 2010). Os mecanismos que envolvem a resistência bacteriana geralmente são efluxo ou desintoxicação enzimática, que também pode resultar na liberação das células, p. Redução de Hg (II) para Hg (0) (SILVER & PHUNG, 1996, 2009; NIES, 2003; ROSEN, 2002; OSMAN & CAVET, 2008). Plasmídeos bacterianos têm genes de resistência a

muitos metais tóxicos e metalóides. Sistemas relacionados também são freqüentemente localizados em cromossomos bacterianos (SILVER & PHUNG, 1996; ROSEN, 2002).

Bacillus sp é um gênero freqüentemente isolado em áreas poluídas por metais (ZAMPIERI *et al.*, 2016). Vários estudos indicam que o gênero *Bacillus* possui potencial significativo para a biorremediação de áreas marinhas e estuarinas poluídas com metais. Kamala-Kannan e Lee (2008) sugeriram que este gênero é o grupo taxonômico dominante nas comunidades de bactérias heterotróficas nas áreas poluídas. Da mesma forma, há muitos estudos que mostram um alto nível de resistência a metais em diferentes espécies de *Pseudomonas* sp (PITONDO-SILVA *et al.*, 2016).

3.7. CONCLUSÃO

As áreas portuárias são fontes importantes para o estudo do efeito, a longo prazo, da contaminação por metais em comunidades bacterianas. Esta exposição a longo prazo pode alterar significativamente a população de *Bacteria* e *Archaea* comparativamente a locais não contaminados. A diversidade diminui com o aumento das concentrações de metais, levando a consequências perigosas para o meio ambiente. Alguns grupos como *Thermomonosporaceae*, *Thermodesulfobacteriaceae*, *Desulfobacteriaceae* e *Rhodobacteraceae* desenvolvem resistência e podem ser encontrados em maior abundância nesses locais contaminados em comparação com a área pristina. O mesmo acontece com alguns importantes filos como actinobactérias, cianobactérias e termodesulfobactérias. Em contrapartida, alguns grupos são mais sensíveis como *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Desulfobacteriaceae* e *Saprospiraceae*; ou filo como *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Planctomyces*. Além disso, metais podem interferir no importante processo fisiológico microbiano, consequentemente nos ciclos de nutrientes. O perfil de resistência a metais também mostra que alguns gêneros podem desenvolver altos níveis de resistência, sendo importantes fontes para estudos de mecanismos resistentes a metais e processos de biorremediação. Esse tipo de estudo ajuda a elucidar em ambientes naturais muito complexos como os poluentes podem influenciar a comunidade microbiana. Porém, ainda são necessários estudos para entender como essas mudanças podem alterar o funcionamento da comunidade microbiana e como podem afetar o ambiente como um todo.

CAPÍTULO 4

EFEITO DOS METAIS EM ENRIQUECIMENTOS DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

4.1. RESUMO

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo de bactérias anaeróbias que tem grande potencial para estudos de biorremediação de áreas contaminadas com metais. A comunidade microbiana é sensível à toxicidade causada pelos metais e bactérias como as BRS tem sua atividade diminuída. Dessa maneira, para potencializar esse uso ainda é preciso saber quais grupos de bactérias redutoras de sulfato são realmente mais resistentes aos metais. As zonas portuárias são conhecidas ao redor do mundo como áreas que apresentam uma quantidade de metais a cima de níveis considerados como aceitáveis, sendo áreas onde a comunidade microbiana foi exposta por esse tipo de contaminação por um longo período de tempo, podendo ser um importante inóculo para isolamento de BRS resistentes a metais. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi analisar como metais influenciam na comunidade de bactérias redutoras de sulfato presentes no sedimento de uma área portuária. Os enriquecimentos demonstraram uma comunidade de BRS dominada por *Desulfovibrio* sp ativa e capaz de precipitar uma média de 80% dos metais com contrações iniciais de 6,0mM de Zn; 8,0mM de Cr, 0.3mM de Cd e 1.3mM de Cu. Para todos os metais testados, o aumento na sua concentração culminou na drástica redução de BRS e aumento proporcional de fermentadoras como *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter*. Cu foi aparentemente o metal mais tóxico às BRS e a comunidade foi mais resistente ao Zn.

4.2. ABSTRACT

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are a group of anaerobic bacteria that have great potential for bioremediation studies of areas contaminated with heavy metals. The microbial community is sensitive to toxicity caused by metals and SRB has its activity decreased. Thus, to potentiate this use it is still necessary to know which groups of sulfate-reducing bacteria are actually more resistant to metals. Port areas are known around the world as areas that present metals concentrations above acceptable levels, being areas where the microbial community has been exposed by this type of contamination for a long period of time and can be an important inoculum for isolation of metal-resistant BRS. In this way, the objective of the present study analyzed how heavy metals influence the community of sulfate-reducing bacteria present in the sediment of a port area and try to isolate resistant species that can be used in future biotechnological applications. The enrichments demonstrated a BRS community had the activity decreased with the increase of all heavy metals tested. The community was dominated by *Desulfovibrio* sp, but it was also found *Desulfobulbos* sp and *Thermodesulfovibrio* sp that were capable of precipitating about 80% of the metals with initial concentrations of 6.0 mM Zn; 8.0mM Cr, 0.3mM Cd, and 1.3mM Cu. For all metals tested, the increase in concentration resulted in a drastic reduction in BRS and a proportional increase in fermenters such as *Citrobacter*, *Clostridium* and *Enterobacter*. Cu was the metal that presented more toxicity for the SRB and the community was more resistant to Zn.

4.3. INTRODUÇÃO

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) pertencem a um grupo de microrganismos anaeróbios que pode ser encontrado nos mais diversos ambientes anóxicos, onde podem usar sulfato comoceptor final de elétrons para a degradação de compostos orgânicos, resultando na produção de sulfeto (MUYZER & STAMS, 2008).

A redução de sulfato pode ter uma aplicação biotecnológica muito importante na remoção de metais de resíduos de áreas contaminadas. Essa aplicação é possível devido a diferença nas propriedades químicas de metais sulfatos e sulfeto. Metais como cádmio, cobalto, cobre, ferro, zinco, cromo e níquel, são solúveis quando na forma de sulfato, mas insolúveis quando na forma de sulfetos metálicos (PAULO *et al.*, 2015). Portanto a produção de sulfeto pelas BRS, e consequentemente a formação de sulfetos metálicos, causa a precipitação de metais presentes no ambiente, facilitando sua remoção (MUYZER & STAMS, 2008). A demonstração de como a fisiologia desses microrganismos funciona pode ser visualizada nas equações 1 (redução de sulfato) e 2 (reação do sulfeto produzido pelas BRS com os metais dissolvidos no meio).



O desenvolvimento de várias indústrias como, mineradoras, indústrias químicas, de papel, pesticidas, vidro e cerâmica contribuem para aumentar a concentração de metais em águas residuais e esgotos (SARIOGLU *et al.*, 2010). Metais não são biodegradáveis, tendendo, assim, a se acumular no ambiente e em organismos vivos até chegar a concentrações tóxicas ou carcinogênicas (FU & WANG, 2011).

O aumento nas concentrações de metais, acima dos limites de segurança estabelecidos para o meio ambiente, é mais frequentemente encontrado perto de indústrias e outras atividades humanas. A presença de metais em efluentes de indústrias e a falta de tratamento e disposição adequada de resíduos contribuem para esse fato (MASINDI & MUEDI, 2018).

Os metais são persistentes no ambiente, devido à sua toxicidade, podem contaminar as cadeias alimentares e causar diferentes problemas de saúde. A exposição crônica a metais no ambiente é uma ameaça real para os organismos vivos; por exemplo, concentrações de metais acima dos limiares afetam o equilíbrio microbiológico dos solos

e podem reduzir sua fertilidade (WIECZOREK-DĄBROWSKA, 2013). Outra questão é que a bioacumulação de metais tóxicos na biota de diferentes ecossistemas pode ter efeitos adversos nos animais. Níveis mais altos de metais na biota podem ter efeitos negativos na saúde ecológica de espécies de animais aquáticos e podem contribuir para o declínio de suas populações. A comunidade microbiana, da mesma forma, é influenciada através da diminuição na diversidade e na capacidade de degradação (ALI *et al.*, 2019).

As BRS têm sua atividade diminuída devido a presença de metais em maiores concentrações. Por isso que um dos principais problemas em biorreatores durante o tratamento de esgoto e águas residuais é a toxicidade de metais (BHATTACHARYA *et al.*, 1995).

Dessa maneira, se torna de extrema importância a busca do entendimento de como os metais podem influenciar na atividade e na composição de bactérias redutoras de sulfato, tornando possível identificar quais os grupos conseguem apresentar estratégias que os permitam sobreviver mesmo em concentrações extremamente altas de metais.

No entanto, as bactérias podem desenvolver resistência através de uma grande diversidade de genes de resistência a metais, tanto por evolução vertical quanto por transferência horizontal de genes, a fim de se adaptar à exposição à toxicidade de metais (TURE *et al.*, 2018; ARGUDÍN *et al.*, 2018). Assim, o conhecimento sobre como os metais podem influenciar a atividade e a composição de bactérias redutoras de sulfato se torna extremamente importante. Muitos estudos indicam que em locais contaminados, onde as bactérias foram expostas à toxicidade do metal, o número de genes de resistência aumenta. Dessa forma, a comunidade em locais contaminados pode se adaptar à contaminação por metais (IMCHEN *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2017; GILAN *et al.*, 2015).

As zonas portuárias são conhecidas ao redor do mundo como áreas que apresentam uma quantidade de metais a cima de níveis considerados como aceitáveis por companhias ambientais (BURUAEM *et al.*, 2012), sendo, portanto, áreas onde a comunidade microbiana foi exposta por esse tipo de contaminação por um longo período de tempo. Aliado a esse fato, nos ambientes marinhos existem uma quantidade e diversidade significativa de bactérias redutoras de sulfato, pois esse grupo é muito importante na ciclagem de carbono no sedimento marinho (MUYZER & STAMS, 2008).

Essa busca se torna muito importante pois existe uma potencialidade do uso de microrganismos oriundos de locais impactados como inóculo em reatores anaeróbios envolvidos no tratamento de águas residuárias contendo metais. Isso se deve principalmente ao fato desses microrganismos já estarem adaptados às condições em que

serão submetidos durante seu uso em biorreatores (BARNES *et al.*, 1994; BRATKOVA *et al.*, 2013; KIEU *et al.*, 2013).

Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi analisar, utilizando sedimento de uma área portuária como inóculo, como metais influenciam na comunidade de bactérias redutoras de sulfato.

4.4.MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Área de estudo

Como já foi apresentado previamente no Capítulo 3 (seção 3.4.1) o Porto de Santos se localiza no município de Santos (região metropolitana da Baixada Santista), região central da costa do estado de São Paulo. Essa área é relevante por ser cenário de várias atividades econômicas importantes como: pesca, turismo, atividades industriais e portuárias e ainda assim, ter a presença de áreas protegidas como manguezais e remanescentes de mata Atlântica (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O Porto de Santo tem dimensões significativas e além de suas atividades acaba atraindo uma série de indústrias que se fixam próximo a ele, tudo isso influencia a qualidade do ambiente (ABESSA *et al.*, 2008) (Figura 33).



Figura 33 – Pluma de contaminantes no Porto de Santos visualizada durante coleta de sedimento (Fonte: da Autora).

Próximo ao porto está instalado o maior polo industrial do Brasil, com aproximadamente 1100 indústrias, incluindo petroquímica, farmacêutica e siderúrgica (CBH-BS, 2011) e, conseqüentemente, geram muitos resíduos que podem afetar o ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2008) (Figura 34).

Em 2001, um dos relatórios da CETESB já apontava a existência, na Baixada Santista, de indústrias que utilizam em seu processo de produção diversos metais, além de solventes, fenóis, cianeto, entre outros, que podem afetar significativamente o ambiente e a biota local (CETESB, 2001). No último relatório da CETESB que avaliou a qualidade ambiental de zonas costeiras de São Paulo, em 2018, foi verificada contaminação por metais como Cu e As, além da presença de hidrocarbonetos poliaromáticos acima do limite e densidades altas de coliformes termotolerantes que fizeram com que as amostras do porto fossem consideradas Ruins ou Péssimas (CETESB, 2018).



Figura 34 – Terminais portuários exclusivos de indústrias localizadas nos arredores do Porto de Santos (Fonte: <http://www.portodesantos.com.br/relacoes-com-o-mercado/terminais/>).

O estuário de Santos - São Vicente é um bom exemplo onde as pressões antrópicas estão continuamente introduzindo contaminantes no meio ambiente. Toda essa influência humana pode indicar um enriquecimento de alguns metais no final do século XIX, quando o Porto de Santos era inaugurado, e até a década de 1970, quando as atividades do Porto de Santos se expandiram (TESSLER *et al.*, 2006).

Dessa maneira, o porto de Santos é um local onde existe um histórico de contaminação por metais, em que a microbiota acabou sendo exposta a esse tipo de pressão seletiva.

4.4.2. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de sedimento em 5 pontos ao longo do porto de Santos (Figura 35). Foram escolhidos pontos próximos a efluentes industriais ou onde a literatura apontava como áreas criticamente contaminadas por metais (PINTO *et al.*, 2015; ABESSA *et al.*, 2008; BURUAEM *et al.*, 2012).

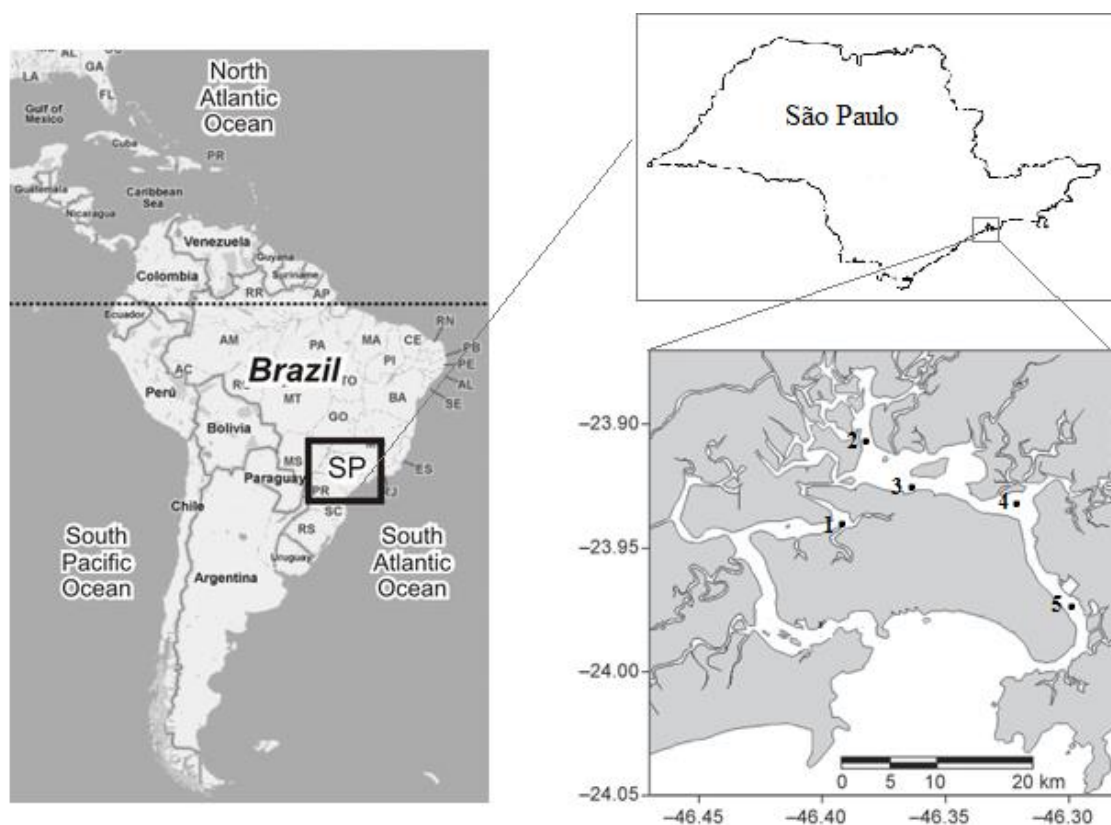


Figura 35 – Mapa da região de coleta mostrando os 5 pontos ao longo do Porto de Santos –SP (Brasil).

4.4.3. Variáveis Ambientais

Durante a coleta de sedimentos cada ponto de amostragem foi caracterizado de acordo com suas características físico-químicas utilizando uma sonda multi-parâmetro (HORIBA, modelo U50), foram eles: pH, salinidade, temperatura, profundidade,

oxigênio dissolvido e condutividade. Em laboratório os sedimentos coletados foram caracterizados quanto a granulometria, através da técnica de peneiramento (SUGUIO, 1973); porcentagem de matéria orgânica utilizando a mufla (JIMÉNEZ & GARCÍA, 1992); porcentagem de carbono orgânico total foi realizada a partir da oxidação com dicromato de potássio, ataque com ácido sulfúrico e posterior titulação do dicromato excedente da oxidação com sulfato ferroso amoniacal, conforme descrito em Gaudette *et al.* (1974); concentração de metais, cromo, cobre, cádmio e zinco foi realizada segundo a metodologia SW 846 US EPA 3051 (USEPA, 1994), a qual consiste em uma digestão ácida capaz de dissolver a maior parte dos elementos de origem antrópica. Os elementos Cr, Cd, Cu e Zn foram quantificados por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES).

4.4.4. Quantificação de bactérias redutoras de sulfato

A avaliação quantitativa de bactérias redutoras de sulfato foi realizada através do Método do Número Mais Provável (NMP). Para isso, foi feito um mix das 5 amostras de sedimento que foi utilizado para realização de diluição seriada até a diluição 10^{-12} . Cada diluição foi inoculada em quintuplicada em frascos de antibiótico de 40 mL contendo 8,8 mL de Postgate C (POSTGATE, 1984) (Anexo 1) e alíquotas de 0,1 mL das soluções de sulfeto de sódio (0,4%) e sulfato ferroso (1%). Após este procedimento, os frascos foram cultivados sob mistura gasosa de Nitrogênio, a 30°C e durante 30 dias. O sulfeto produzido pelas BRS reage com o sal ferroso presente no meio e origina o precipitado negro (FeS), que provoca turbidez dos meios de cultivo. Quando isto ocorre, o crescimento dos microrganismos é considerado positivo. Por meio da contagem dos tubos positivos e negativos de três diluições consecutivas, seleciona-se a combinação correspondente e obtém-se o valor NMP. Com este dado, pode-se calcular o valor NMP para o experimento de acordo com a equação 3 (APHA, 2012):

$$NMP/100\text{ mL} = \text{Valor NMP} \times 10/V \quad (3)$$

Em que: V corresponde a menor diluição da série de combinações de tubos positivos.

4.4.5. Enriquecimento de BRS resistentes a metais

Para realização de ensaio forma utilizados frascos de antibióticos de 150mL. Em cada frasco foi adicionado meio de cultura Postgate C (Anexo 1) com diferentes concentrações de metais (POSTGATE, 1984; CABRERA *et al.*, 2005; GARDNER & STEWART, 2002; LUPTAKOVA & KUSNIEROVA, 2005) (Figura 36). Cádmio foi utilizado na forma de sulfato de cádmio e as concentrações variaram de 0,2 até 0,7mM; o cobre foi utilizado na forma de sulfato de cobre e as concentrações variaram de 0,3 até 5mM; o cromo foi utilizado na forma de sulfato de cromo e as concentrações variaram de 0,4 até 13mM; o zinco foi utilizado na forma de sulfato de zinco e as concentrações variaram de 0,3 até 10 mM. Em cada frasco foi adicionado 10% v/v de um mix feito com o sedimento dos 5 pontos. Esse mix foi utilizado como inóculo e cada frasco teve volume final de 50 mL (figura 36). Também foram feitos um controle positivo, apenas o meio de cultura e o inóculo, e um controle negativo, meio de cultura e o metal, para cada um dos metais.

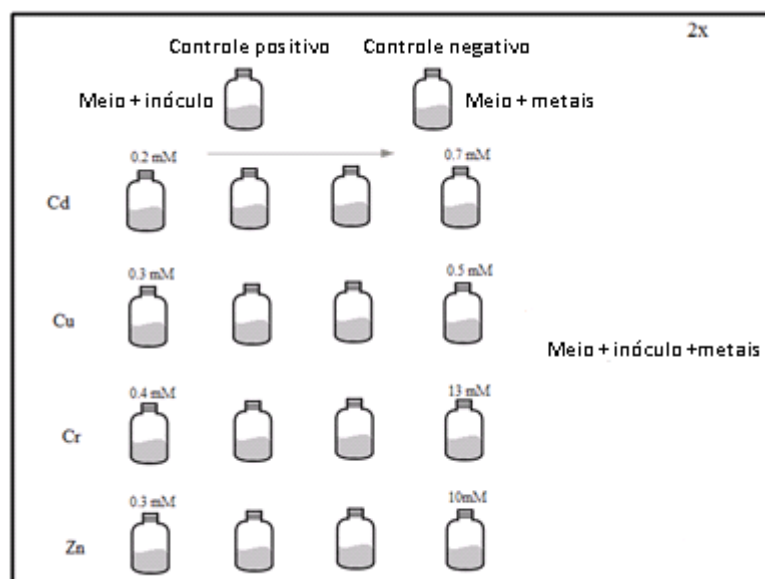


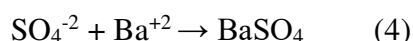
Figura 36 – Design experimental do enriquecimento com diferentes concentrações de cádmio, cobre, cromo e zinco.

Os frascos foram estaticamente incubados no escuro à 30°C por 49 dias. Após esse período, esses frascos serviram como inóculo para segunda fase do experimento, com exatamente as mesmas condições, para que a comunidade microbiana presente no sedimento ficasse mais tempo exposta a toxicidade dos metais. Dessa maneira, foram adicionados 10% v/v dos frascos da primeira fase em novos frascos com o mesmo meio

e as mesmas concentrações de metais. O segundo enriquecimento foi incubado por 28 dias também a 30°C.

No início do experimento e semanalmente foram medidos concentração de sulfato e sulfeto. No início e no final de cada experimento foram medidas concentrações dos metais e os ácidos produzidos.

O sulfato foi medido através de método turbidimétrico. O íon sulfato, em meio ácido acético, é precipitado por cloreto de bário, formando micro-cristais uniformes de sulfato de bário em suspensão, conforme a equação 4 a seguir:



A determinação da concentração de sulfato em amostra foi feita através da determinação da absorção de luz de 420 nm pela turbidez proporcionada pela suspensão de sulfato de bário em comparação com a curva de calibração. Para isso, em um tubo de ensaio foi adicionado 5mL de amostra bruta ou diluída (de acordo com a concentração de sulfato presente na amostra e com a curva de calibração do espectrofotômetro), 1 mL de solução tampão, misturar as soluções por inversão. Em seguida, cerca de 0,4g de cloreto de bário foi adicionado a cada tubo, durante 15s o tubo foi agitado vigorosamente e ficou em repouso por 5min, cronometrando o tempo imediatamente. Após esse processo, a absorbância foi medida em comprimento de onda de 420 nm.

O sulfeto ($\text{S}^{2-}/\text{H}^{\text{S}}/\text{H}_2\text{S}$) foi medido como sulfeto total dissolvido no meio de cultura e utilizou-se método colorimétrico em espectrofotômetro da marca 39 Hach® modelo DR-2800 por meio de kit hach® específico para análises de sulfeto e produzido pelo fabricante.

4.4.6. Análises de metais

Foram retiradas amostras de 15 mL no início e no final do enriquecimento para todos os frascos de enriquecimento. Amostras foram centrifugadas e cerca de 10 mL do sobrenadante foi utilizado para análise. Para análise da quantidade dos metais (Zn, Cr, Cd e Cu) em cada amostra foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica com chama (Figura 37). Para as leituras foram utilizadas curvas de calibração, que obedeciam a Lei de Beer.

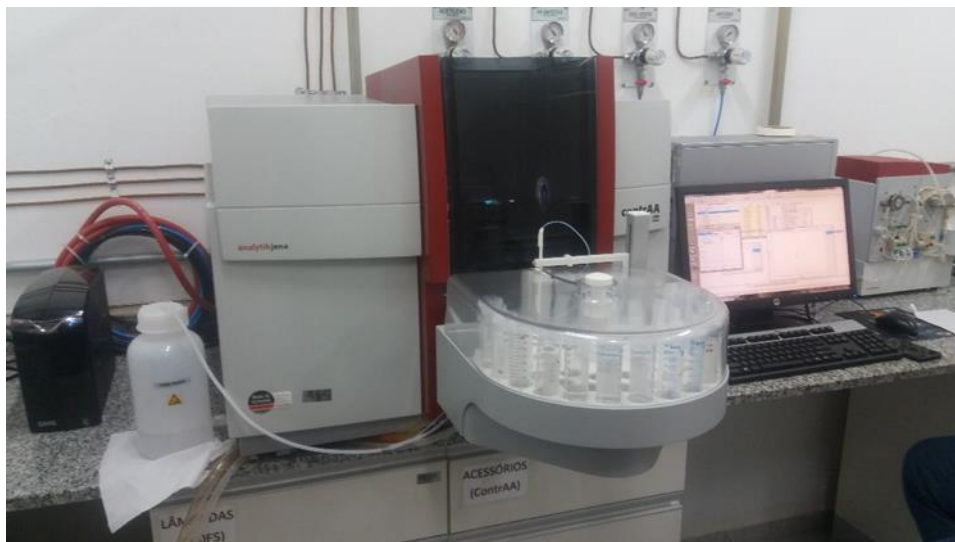


Figura 37 - Espectrômetro de absorção atômica com chama utilizado no presente trabalho
(Fonte: da Autora).

4.4.7. Análise dos ácidos orgânicos

Para quantificação dos ácidos orgânicos voláteis presentes ao final do experimento foi utilizado um cromatógrafo de gás GC-2010 (Shimadzu Scientific Instruments Columbia, MD, USA) equipado com coluna HP-INNOWAX (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 mm de espessura de filme) e detector de ionização em chama (FID), tendo hidrogênio como gás de arraste, segundo metodologia descrita por Adorno *et al.* (2014).

4.4.8. Análise da comunidade microbiana

Para análise da comunidade microbiana foi feito um “pool” dos sedimentos dos 5 pontos de coleta, sendo utilizado aproximadamente 0,25 g (em triplicata) desse mix de sedimento para extração do DNA, utilizando-se o kit MoBio de acordo com as instruções do fabricante.

Para análise através de Hi-Seq, a concentração de DNA foi ajustada para 10-20 ng μL^{-1} com auxílio de fluorímetro (Qubit® 2.0) para amplificação por PCR. A PCR foi realizada em triplicata a um volume total de 50 μL contendo tampão de PCR 1X HF, dNTPs 0,2 mM, 2 U μL^{-1} de Phusion Hot start II DNA polimerase (Promega, Madison,

WI), 10 μM do primer 515F- 806R com diferentes barcodes para cada amostra, 0,2-0,4 ng μL^{-1} de DNA e água livre de nuclease até o volume final. O programa de amplificação consistiu de um etapa de desnaturação a 98 °C por 30 s, 25 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento em 56 °C durante 10 s e alongamento a 72 °C durante 10 s; e um passo de extensão final a 72 °C durante 7 min.

O tamanho dos produtos de PCR foi verificado por electroforese em gel numa agarose a 1% (p / v) gel contendo 1x SYBR® Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os produtos de PCR foram purificados com o MagBio Beads. Os produtos de PCR purificados foram misturados em quantidades equimolares com um Concentração de DNA de 100 ng μL^{-1} . Os amplicons agrupados foram sequenciados usando Sequenciador do Genoma FLX em combinação com química de titânio (GATC-Biotech, Konstanz, Alemanha).

Todas as leituras de sequência foram processadas pelo pipeline de análise NGS SILVA rRNA (SILVAngs 1.0) (PRUESSE *et al.*, 2013). As leituras foram alinhadas usando o SINA v1.2.11 contra o SEDA SILR SSU rRNA e com qualidade controlada. Leituras idênticas foram identificadas, as leituras exclusivas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), aplicando critérios de identidade de 0,98. Para obtenção dos perfis taxonômicos, as sequências geradas foram submetidas a análises computacionais utilizando o programa de bioinformática *MOTHUR* (SCHLOSS *et al.*, 2009) e o programa Past3 para as análises multivariadas de similaridade.

Todos os dados foram submetidos ao Sequence Read Archive (SRA) do NCBI (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>) através BioProjeto número PRJNA531183.

4.5.RESULTADOS

4.5.1. Dados físico-químicos

A caracterização do sedimento demonstrou que os sedimentos foram coletados em uma profundidade média de 1,6 m e que a temperatura média encontrada foi de 26,9 °C. A salinidade variou entre 16,0 e 24,4 nas áreas mais próximas ao mar aberto, a porcentagem média de oxigênio dissolvido foi de 47,4%, pH 5,8; M.O. 3,0% e C.O.T. de 2,8% (tabela 9).

Tabela 9 – Dados físico-químicos nos 5 pontos de amostragem durante a coleta de amostras.

	Profundidade (m)	Temperatura (°C)	Salinidade	Condutividade	O.D. (%)	pH	M.O. (%)	C.O.T.
P1	1,0	26,3	16,0	26,4	46,5	5,7	4,1	3,2
P2	1,7	26,6	14,8	22,1	38,0	5,8	2,1	2,6
P3	1,7	27,0	24,4	39,7	69,7	5,3	2,0	4,2
P4	2,0	27,0	23,2	38,0	45,9	6,0	1,6	4,3
P5	1,8	27,8	23,3	38,5	37,7	6,1	5,1	4,8

A quantidade de metais encontradas estão presentes na tabela 10. Não foi encontrada quantidades significativas de cádmio em nenhum dos pontos de amostragem.

Tabela 10– Concentração de metais (Zn, Cr, Cd e Cu) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de sedimento para cada um dos pontos de amostragem.

	Zinco	Cromo	Cobre	Cádmio
P1	$230 \pm 0,01$	$24 \pm 0,0004$	$29 \pm 0,001$	$< 0,004$
P2	$144 \pm 0,003$	$12 \pm 0,001$	$8,7 \pm 0,0006$	$< 0,004$
P3	$79 \pm 0,003$	$22 \pm 0,001$	$23 \pm 0,0005$	$< 0,004$
P4	$60 \pm 0,001$	$15 \pm 0,0004$	$13 \pm 0,001$	$< 0,004$
P5	$28 \pm 0,0004$	$13 \pm 0,001$	$6,0 \pm 0,005$	$< 0,004$

4.5.2. Quantificação BRS e análise do enriquecimento

A análise de número mais provável indicou uma concentração inicial de bactérias redutoras de sulfato de $3,2 \cdot 10^6$ NMP/100g de sedimento.

O ensaio de enriquecimento de BRS na presença de diferentes concentrações de metais durou 49 dias na tentativa de que a comunidade presente consumisse todo o sulfato presente. Na figura 38 é possível analisar que no controle positivo de todos os metais e no enriquecimento com 0.3 mM de Zn e 0.4 mM de Cr o sulfato foi consumido completamente em uma média de 28 dias. Também foi possível visualizar que as concentrações maiores tiveram a redução de sulfato progressivamente menor.

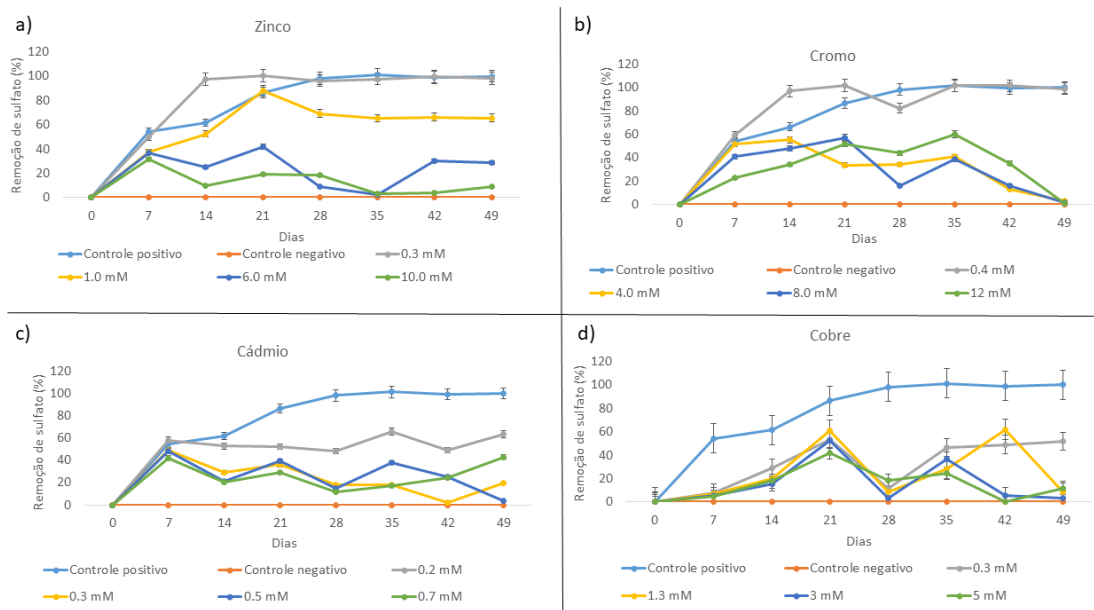


Figura 38 - Gráficos de remoção de sulfato (%) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d), durante 49 dias.

O sulfeto produzido também foi monitorado nesse período e seguiu o mesmo padrão dos resultados de remoção de sulfato (figura 39).

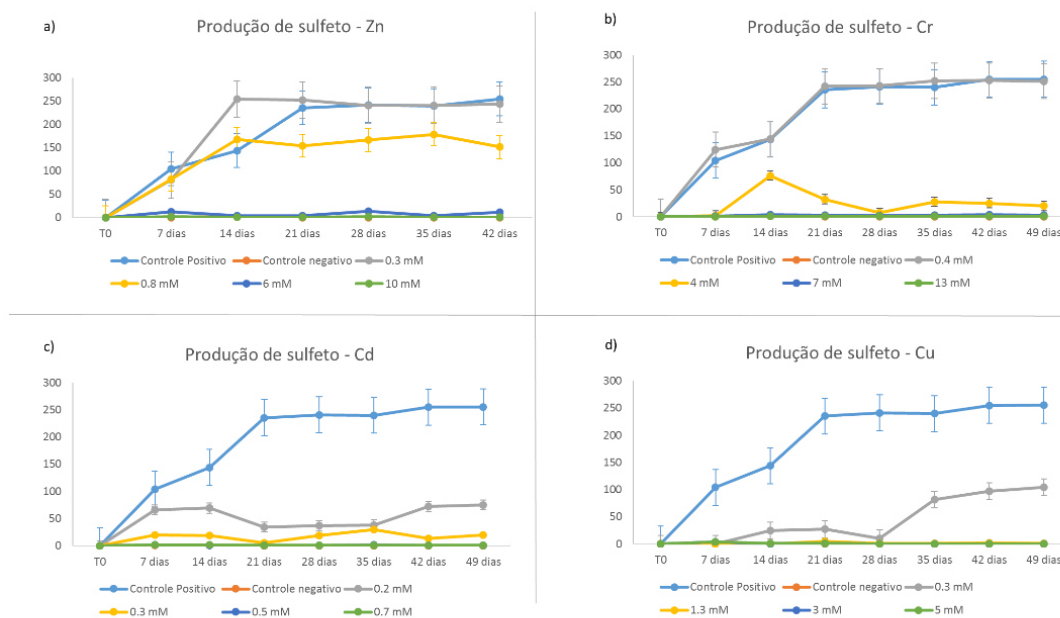


Figura 39 – Gráficos de produção de sulfeto (mg/L) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d).

Os enriquecimentos de 49 dias serviram de inóculo para um novo enriquecimento que durou 28 dias. A atividade BRS pode ser visualizada através da remoção de sulfato e produção de sulfeto (figuras 39 e 40).

Foi observada uma resposta melhor da atividade de bactérias redutoras de sulfato. Em todos os experimentos o controle positivo apresentou 100% de remoção de sulfato (Figura 40). Para os experimentos com Zn, nos frascos com menor concentração (0,3 mM) a remoção de sulfato foi de 80% e diminuiu sucessivamente: frascos com 0,8 mM de Zn a remoção foi de 60% e nas concentrações de 6 e 10 mM ficou em torno de 20%. Para o enriquecimento com cromo a variação da remoção de sulfato foi sucessiva de acordo com a concentração do metal também mas ao final a remoção em todos os frascos foi em torno de 30%.

Nos enriquecimentos com Cd, foi observada uma remoção de 80% nos frascos com 0,2 mM, 50% nos frascos com 0,3 mM e em torno de 20% para as concentrações finais de 0,5 e 0,7 mM.

Nos enriquecimentos com Cu, foi observado o mesmo padrão observado para Cr, ao final do experimento em todos os tratamentos foi observado uma remoção média de 20%.

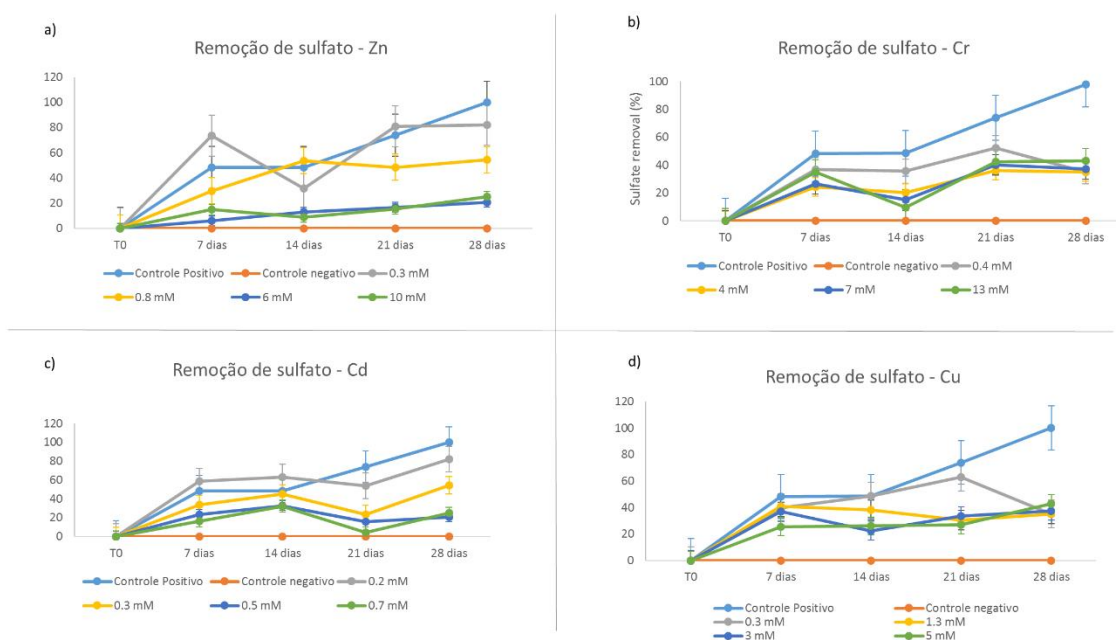


Figura 40 – Gráficos de remoção de sulfato (%) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d).

A produção de sulfeto acompanhou a remoção de sulfato. Mas nas maiores concentrações de metais não foi possível ser detectado pois o sulfeto produzido acabava precipitando os metais presentes não podendo ser detectado (Figura 41).

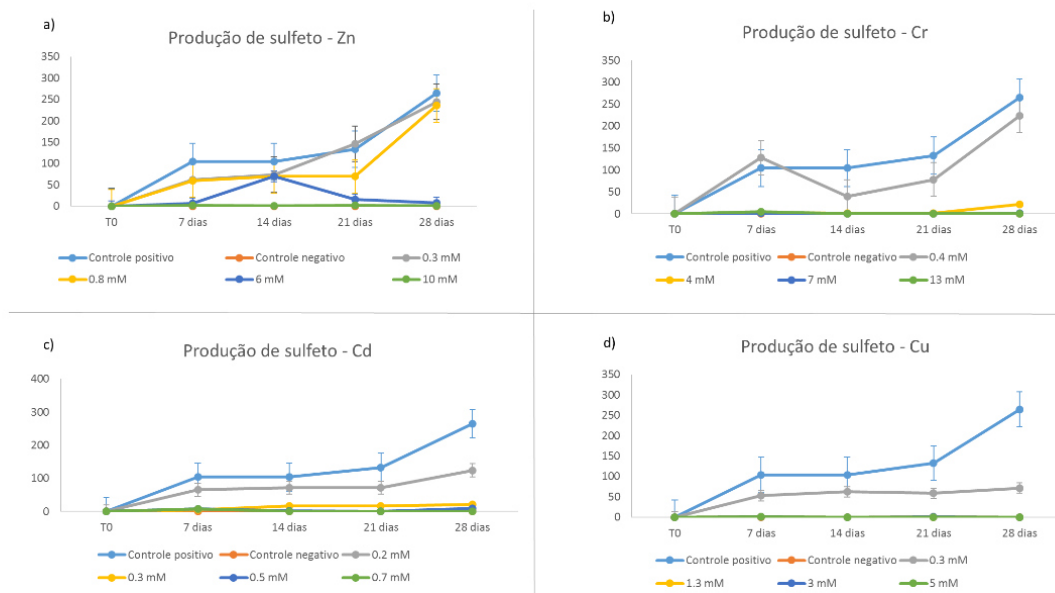


Figura 41 – Gráficos de produção de sulfeto (mg/L) para os enriquecimentos de Zn(a); Cr(b); Cd(c); Cu(d).

Ao final do experimento foram mensurados os ácidos orgânicos produzidos em cada um dos experimentos. Os valores produzidos em mg/L podem ser visualizados na tabela 11.

Tabela 11 – Ácidos produzidos (mg/L) nos enriquecimentos com diferentes concentrações de Zn (Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM), Cr (Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM), Cu (Cu1- 0,3 mM; Cu2; 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM; Cu4- 5,0 mM) e Cd (Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3; 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM).

	Acetona	Metanol	Etanol	Isobutanol	n-Butanol	Ac. Acético	Ac. Propiônico	Ac. Isobutírico	Ac. Butírico	Ac. Isovalérico	Ac. Valérico	Ac. Crotonico	SOMA DE AC. PRODUZIDOS
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1414,0	0,0	0,0	0,0	58,2	0,0	0,0	1472,2
Cu1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1334,6	2388,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3723,5
Cu2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1009,5	2589,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3598,7
Cu3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	976,4	2487,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3464,0
Cu4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	245,2	2543,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2788,4
Zn1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2326,3	117,8	0,0	0,0	66,0	0,0	0,0	2510,1
Zn2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23263,0	1177,9	0,0	0,0	660,1	0,0	0,0	25101,0
Zn3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	955,6	1740,5	0,0	6,1	0,0	0,0	0,0	2702,2
Zn4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1029,7	2556,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3585,8
Cr 1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1816,1	196,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2012,1
Cr 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1945,0	180,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2125,8
Cr3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	235,8	989,0	0,0	957,0	0,0	0,0	0,0	2181,8
Cr4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	137,0	977,8	0,0	654,2	0,0	0,0	0,0	1769,0
Cd1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1024,5	1723,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2748,3
Cd2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1037,8	3035,7	0,0	0,0	51,7	0,0	0,0	4125,2
Cd3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	567,7	1928,2	0,0	553,8	0,0	0,0	0,0	3049,7
Cd4	0,0	0,0	0,0	0,0	170,3	600,0	1915,0	0,0	734,7	0,0	0,0	0,0	3420,0

Na figura 42 pode-se observar quanto os valores produzidos em mg/L representam em porcentagem. No controle positivo, foram produzidos 82% de ácido acético e menores porcentagens de outros ácidos como o ácido isobutírico, butírico e isovalérico. Nos meios enriquecidos com Zn, as concentrações mais baixas ficaram com o padrão bem parecido do controle positivo. Mas em contrapartida as duas maiores concentrações tiveram menores porcentagens de ácido acético e maiores concentrações de propionato, quando comparado ao controle. O mesmo padrão foi observado para os meios enriquecidos com Cr. Já para os enriquecimentos de Cu, somente a concentração mais baixa teve 37% de produção de acetato, as demais concentrações tiveram produção de ácido butírico e isobutírico. Para os enriquecimentos de cádmio, todos os enriquecimentos tiveram uma porcentagem baixa de produção de acetato e uma alta porcentagem de propionato.

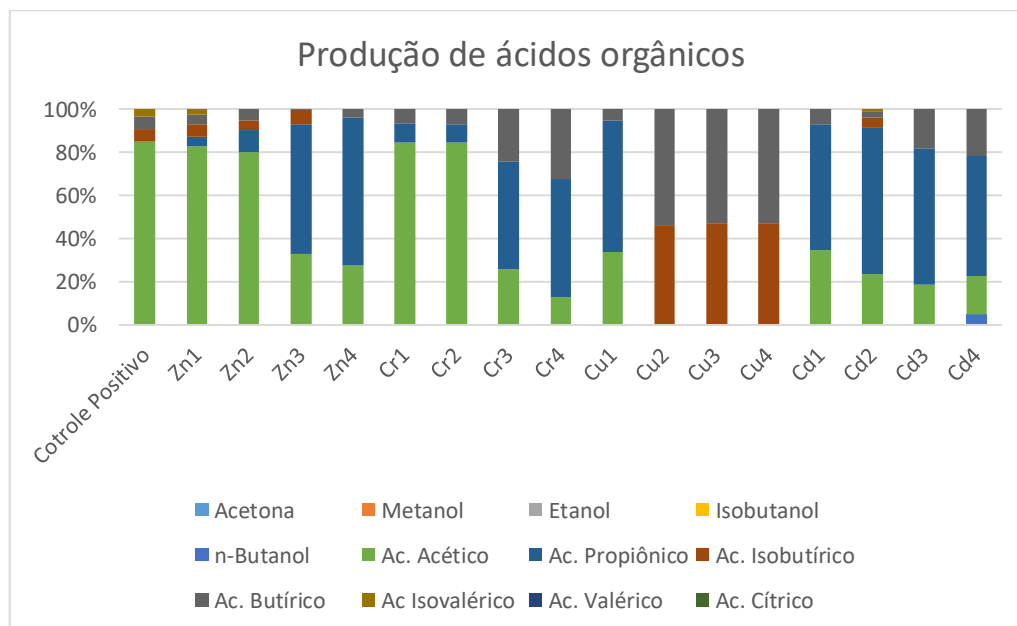


Figura 42 – Porcentagem relativa de ácidos produzidos ao final do experimento de 28 dias, nos enriquecimentos com diferentes concentrações de Zn (Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM), Cr (Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM), Cu (Cu1- 0,3 mM; Cu2- 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM; Cu4- 5,0 mM) e Cd (Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3- 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM).

Ao final do experimento foi calculada a porcentagem de precipitação de metais. Para todos os metais nas últimas concentrações onde a remoção de sulfato foi menor, houve uma precipitação de metais de apenas 20%. Enquanto que nas menores concentrações de metais a precipitação chegou a 80%. Cobre foi o metal que apresentou menor porcentagem de precipitação, variando de 9 a 41% (Figura 43).

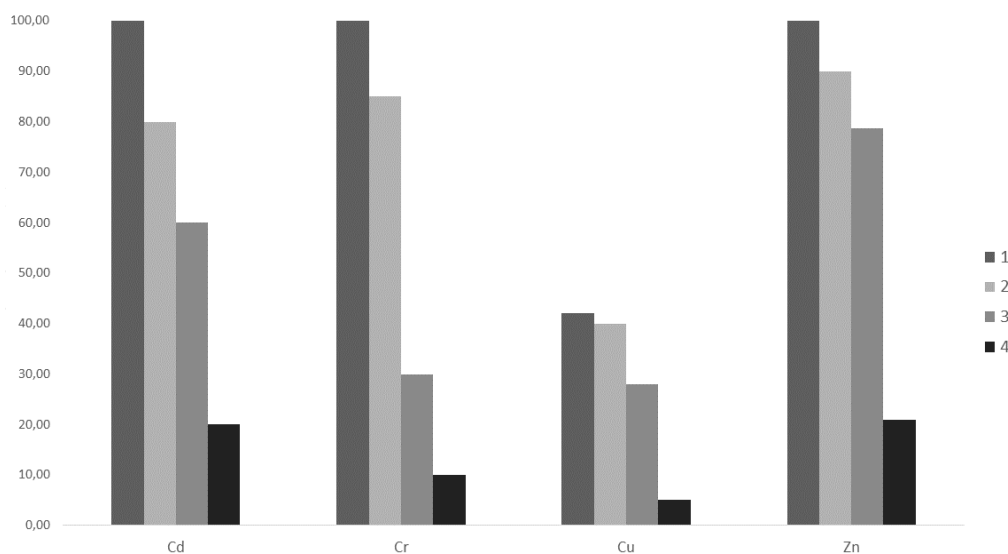


Figura 43 – Porcentagem de precipitação dos metais nos enriquecimentos de Cd (1-0,2 mM; 2-0,3 mM, 3-0,4 mM e 4 -0,5 mM), Cr (1-0,4 mM; 2- 4 mM, 3- 7 mM e 4 -13 mM), Cu (1-0,2 mM; 2- 1,3 mM, 3- 3 mM e 4 -5 mM) e Zn (1-0,3 mM; 2-0,8 mM, 3- 6 mM e 4 – 10 mM).

4.5.3. Análise da comunidade bacteriana

O inóculo utilizado nos enriquecimentos apresentou uma composição variada com 51,3% da comunidade representada pelo filo *Proteobacteria*. A abundância de famílias pode ser vista na figura 44. Quatro famílias BRS foram dominantes na comunidade: *Desulfobacteriaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfurococcaceae* e *Desulfuromonadaceae*. *Flavobacteraceae* foi a família mais abundante encontrada no sedimento.

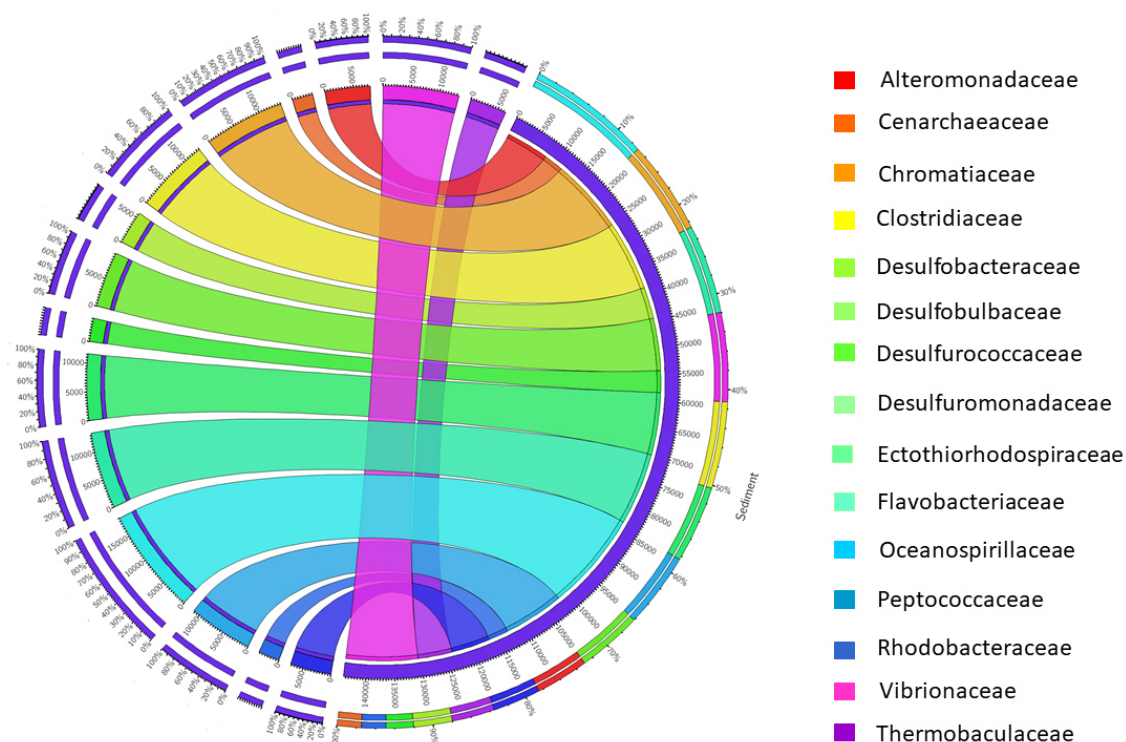


Figura 44 – Abundância de famílias no sedimento do porto de Santos utilizado como inóculo nos enriquecimentos.

Aproximadamente 9,3% dos gêneros encontrados na comunidade pertencem ao grupo de bactérias redutoras de sulfato, sendo possível visualizar os grupos encontrados nas amostras de sedimento na figura 45. O gênero *Desulfobulbos* apresentou maior abundância variando de 4,3 a 7%.

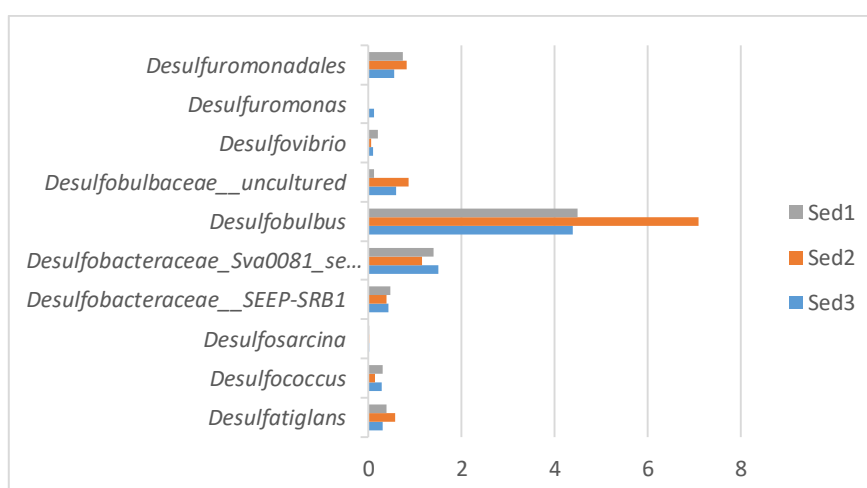


Figura 45 – Porcentagem dos grupos de bactérias redutoras de sulfato presentes no sedimento do Porto de Santos que serviram de inóculo para enriquecimento com metais nas triplicatas (Sed1, Sed2 e Sed3).

A análise da comunidade microbiana presente nos enriquecimentos pode ser visualizada na figura 46.

A comunidade microbiana encontrada nos enriquecimentos com metais demonstrou a dominância do gênero *Desulfovibrio* dentre o grupo de bactérias redutoras de sulfato. Até a concentração de 6 mM de Zinco foi possível observar a presença significativa dos gêneros *Desulfovibrio* e *Thermodesulfovibrio*. Na concentração mais alta (10 mM) não foi possível observar a presença de bactérias redutoras de sulfato, apenas fermentadoras e bactérias formadoras de esporos.

Nos enriquecimentos com cromo as bactérias redutoras de sulfato não sobreviveram a concentrações tão altas. Só foram encontradas bactérias redutoras de sulfato nas concentrações 0,4 mM, com a presença de *Desulfovibrio* sp e *Desulfobulbos*, e na concentração 4,0 mM onde apenas o gênero *Desulfovibrio* foi encontrado. Nas concentrações mais altas houve dominância dos gêneros *Clostridium* e *Citrobacter*.

Já nos enriquecimentos com Cádmio foi observado a presença do gênero *Desulfovibrio* apenas nas concentrações de 0,2 mM e 0,3 mM. Nas duas concentrações maiores foram observadas dominância de *Clostridium*, *Citrobacter* e *Vibrio*.

Nos enriquecimentos de cobre o único gênero de bactérias redutoras de sulfato encontrado foi *Desulfovibrio* variando de 25 a 30% de abundância na comunidade analisada nas seguintes concentrações iniciais de Cu: 0,3; 1,3; 3,0 mM.

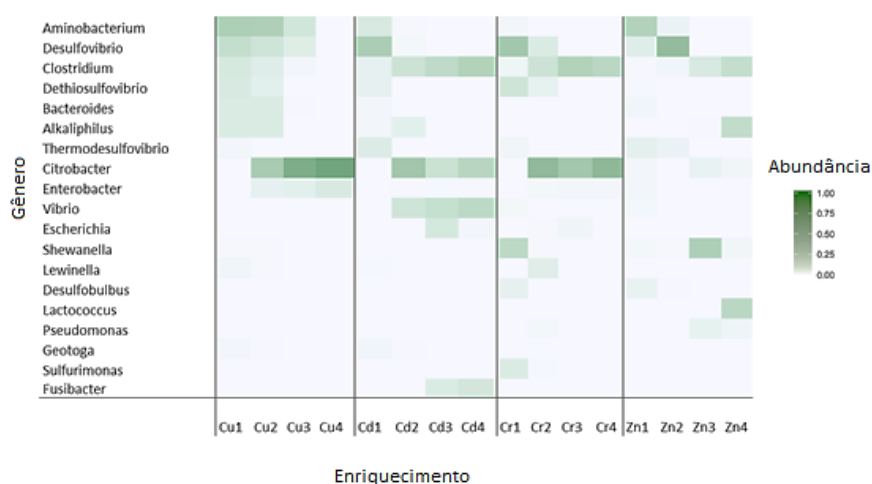


Figura 46- Mapa de calor mostrando a abundância de diferentes gêneros encontrados nas amostras de cada um dos enriquecimentos (As legendas dos enriquecimentos indicam as concentrações iniciais de cada metal: Cu1- 0,3 mM; Cu2- 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM; Cu4- 5,0 mM; Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3- 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM; Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM; Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM). As cores verdes escuras indicam maiores abundâncias.

A figura 47 demonstra a análise de similaridade entre a comunidade microbiana dos enriquecimentos. Houve uma tendência das comunidades de enriquecimentos de amostras com as menores concentrações de metais se agruparem juntas. As comunidades presentes nos enriquecimentos de Cd e Cu ficaram mais próximas enquanto que as comunidades dos enriquecimentos de Cr e Zn apresentaram-se mais semelhantes.

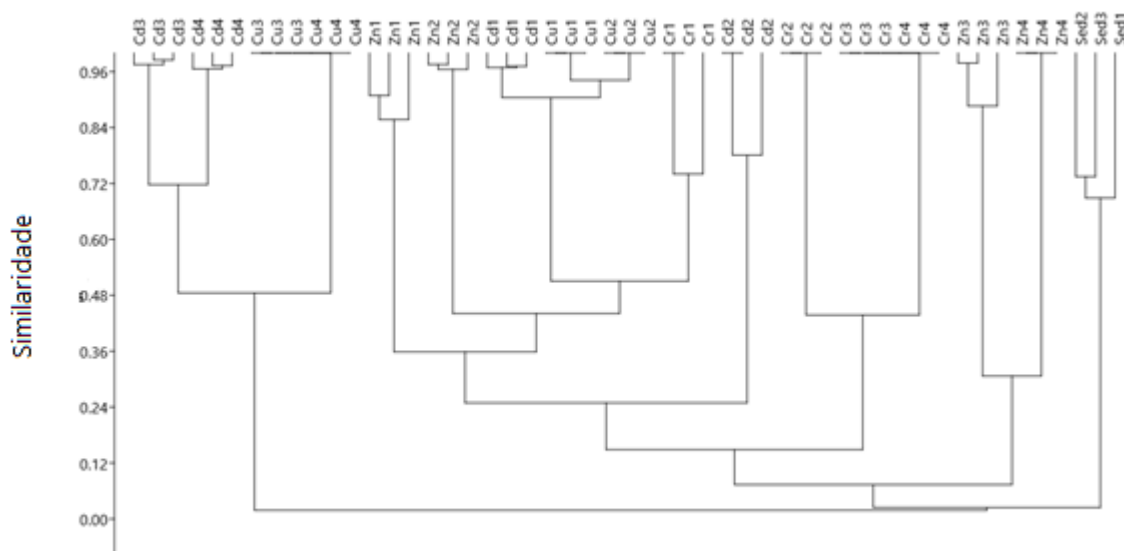


Figura 47 – Análise de agrupamento de comunidades bacterianas encontrada nos diferentes enriquecimentos (em cada triplicata) com base na matriz de dissimilaridade "Bray-Curtis". As legendas dos enriquecimentos indicam as concentrações iniciais de cada metal: Cu1- 0,3 mM; Cu2- 1,3 mM; Cu3- 3,0 mM. Cu4- 5,0 mM; Cd1- 0,2 mM; Cd2- 0,3 mM; Cd3- 0,4 mM; Cd4- 0,5 mM; Cr1- 0,4 mM; Cr2- 4,0 mM; Cr3- 7,0 mM; Cr4- 13,0 mM; Zn1- 0,3 mM; Zn2- 0,8 mM; Zn3- 6,0 mM; Zn4- 10,0 mM.

4.6.DISCUSSÃO

Bactérias redutoras de sulfato são membros importantes da comunidade microbiana, as quais apresentam interesse econômico, ambiental e biotecnológico (MARTINS *et al.*, 2009). Nos ambientes marinhos costeiro, onde o sulfato está presente em grande quantidade, as BRS contribuem com mais de 50% na mineralização da matéria orgânica (JØRGENSEN, 1982). Por isso era esperado uma grande quantidade desse grupo presente no sedimento do Porto de Santos.

A comunidade de bactérias redutoras de sulfato presente no sedimento foi dominada pelos gêneros *Desulfobulbos*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, por grupos da família *Desulfobacteraceae*. Esses gêneros são facilmente encontrados em sedimentos

marinhos, representando parte importante do grupo de microrganismos redutores de sulfato (MUSAT *et al.*, 2006; JAEKEL *et al.*, 2015).

Cepas de *Desulfobulbos* sp tem sido isoladas em sedimentos marinhos contaminados (KHARRAT *et al.*, 2017). Essas bactérias podem produzir sulfeto a partir do sulfato usando uma grande variedade de substratos como hidrogênio, ácidos orgânicos, álcoois, fazendo com que essa plasticidade seja uma vantagem competitiva (ZOUCH *et al.*, 2017).

Desulfovibrio sp foi o gênero de BRS encontrado em maior abundância nos enriquecimentos com metais. Esse gênero é muito estudado em processos de tratamento de efluentes e de remoção de metais (HWANG & JHO, 2018; CABRERA *et al.*, 2006). Uma de suas características importantes é uma resistência alta à metais quando comparados com bactérias do mesmo grupo (JOO *et al.*, 2015). Esse é um dos fatores para que esse gênero tenha sido encontrado em concentrações superiores a outras BRS. Além disso, é um gênero de crescimento muito rápido em meios de cultura, sendo facilmente isolado em cultivos anaeróbios (CABRERA *et al.*, 2006).

O gênero *Thermodesulfovibrio*, também encontrado em alguns enriquecimentos, pertencem ao filo *Nitrospirae*. Tudo o que se sabe sobre esse grupo é que são anaeróbios estritos e usam um número limitado de doadores de elétrons, que é incompletamente oxidado à acetato. Pode crescer em temperaturas altas que podem variar de 40 a 75°C e o pH que toleram pode variar de 7,7 a 8,5 para todas as espécies (FRANK *et al.*, 2016).

Além disso, foram encontrados alguns grupos que não puderam ser identificados ao nível de gênero podendo indicar grupos novos, ainda não isolados ou estudados. O Brasil é conhecido como o país da mega biodiversidade e muito pouco é conhecido sobre sua diversidade de microrganismos, além disso a formação de recursos humanos para taxonomia e sistemática de bactérias é muito escasso (MMA, 2017).

A comunidade bacteriana presente no inóculo provavelmente foram expostas por uma contaminação por metais a longo prazo. Diversos estudos mostram a contaminação por metais no porto de Santos. De acordo com estudos de Kim *et al.* (2016), o porto de Santos é um bom exemplo de um ambiente que sofre com a introdução contínua de diversos contaminantes. Portanto, essa exposição faz com que esses microrganismos tolerem altos níveis de metais como foi indicado nos enriquecimentos.

A concentração de metais encontrada no sedimento nas coletas do presente estudo não foram altas ou acima de limites que colocam em risco a biota (CCME, 2002). Entretanto existem muitos estudos e relatórios que mostram que essas concentrações no

Porto de Santos já chegaram a valores muitos mais altos (CETESB, 2018; KIM *et al.*, 2016; BURUAEM *et al.*, 2012). Além disso, a comunidade presente no inóculo foi capaz de crescer em concentrações 100x maiores do que a encontrada no sedimento indicando essa alta resistência.

Alguns estudos demonstram que uma das dificuldades na aplicação de BRS em reatores para tratamento de resíduos contaminados é a alta concentração de metais que é tóxico e inibi a atividade da comunidade de BRS (ZHANG & WANG, 2016; AYANGBENRO, 2018).

No presente estudo, as BRS presentes no inóculo foram capazes de precipitar os metais presentes em concentrações iniciais significativamente alta de metais quando comparada com outros estudos. Para Cd houve uma precipitação de quase 80% na concentração de 0,3 mM, enquanto que para Zn na concentração inicial de 6mM houve precipitação de 81%. Nos enriquecimentos com Cr houve alta precipitação nas concentrações iniciais de 0,4 mM e 4,0 mM de 98 e 87%, respectivamente. O Cu foi o metal que mais apresentou toxicidade para os microrganismos estudados já que a precipitação máxima foi de 41% no enriquecimento com menos concentração inicial (0,2 mM).

O estudo de Azabou *et al.* (2007) demonstrou a eficiência de retirada de Zn foi significativa apenas entre as concentrações de 0,02 mM até 2 mM. Guo *et al.* (2017) demonstrou que enriquecimentos de BRS tiveram boa atividade nas concentrações de 0,8mM de zinco e de 0,5mM de cromo, enquanto que no estudo de Martins *et al.* (2009), BRS foram tolerantes em concentrações de 0,1 mM de zinco e de 1,3 mM de cobre. Dessa maneira é possível visualizar que houve uma eficiência muito maior na comunidade proveniente do porto de Santos onde houve a precipitação de mais de 70% de metais nas concentrações iniciais de 0,3 mM de Cd, 4,0 mM de Cr e 6,0 mM de Zn.

A precipitação de metais acompanhou a atividade de redução de sulfato, mostrando que sedimentos costeiros contaminados podem ser aliados na busca de BRS com relevância biotecnológica. Existe um potencial muito grande na comunidade presente nesses sedimentos marinhos, pois apresentam microrganismos que podem ser utilizados como inóculo para operações de reatores anaeróbios tratando águas residuárias.

Em condições aeróbias, os microrganismos heterótrofos são capazes de mineralizar compostos orgânicos a CO₂, já em condições anaeróbias, a mineralização da matéria orgânica é bem mais complexa e, muitas vezes requer a interação entre diferentes grupos de microrganismos. Cada grupo microbiano realiza uma oxidação parcial da

matéria orgânica, e seus produtos metabólicos são assimilados por outros grupos, até a completa oxidação do composto orgânico (MUYZER *et al.*, 2008; BARBOSA, 2009). A análise dos ácidos produzidos demonstra esse metabolismo. Bactérias do gênero *Desulfovibrio* não são capazes de fazer a oxidação total do lactato, oxidando-o parcialmente formando o acetato (MUYZER *et al.*, 2008). Por isso tanto no controle, quando nos enriquecimentos com menores concentrações de metais, onde foi observado a dominância de *Desulfovibrio*, foi possível observar porcentagem significativa de ácido acético.

A conversão de lactato em outros ácidos apresentadas na tabela 11 e a análise de sulfato removido pode indicar a conversão completa à CO₂. Em todos os enriquecimentos foram adicionados 6000 mg de lactato e 3000 mg de sulfato. De acordo com a equação 5, é necessária a redução de 1 molécula de sulfato para conversão de 2 moléculas de lactato à acetato.



No enriquecimento controle (sem a presença de metais) foi reduzido 100% do sulfato inicial (3000 mg/L) e para isso foram utilizadas as 6000 mg/L de lactato. Como a tabela 11 só indica a produção de 1472,2 mg/L de outros ácidos, provavelmente a comunidade conseguiu fazer a oxidação completa à CO₂. Entretanto, nos enriquecimentos com metais houve uma produção abaixo de 6000 mg/L de outros ácidos e o consumo de sulfato foi diminuindo de acordo com o aumento na concentração de metais. Indicando que a oxidação incompleta de lactato à outros ácidos através do processo de redução de sulfato foi gradativamente sendo substituído pelo processo de fermentação devido à toxicidade dos metais. E provavelmente o restante do lactato foi totalmente convertido à CO₂.

Conforme as concentrações de metais aumentaram, houve drástica diminuição de BRS e aumento na proporção de bactérias fermentadoras (p. ex. *Citrobacter* e *Clostridium*). Essas bactérias oxidam o lactato à propionato. De maneira geral, o propionato é formado como um dos produtos finais da fermentação de uma grande variedade de produtos orgânicos. Incluem-se nesse grupo: lactato, etanol, succinato e acetato (STAMS *et al.*, 1998).

Citrobacter sp é um gênero com uma fisiologia bastante versátil por ter capacidade de crescer através de mecanismos tanto aeróbios quanto anaeróbios. Através

do metabolismo anaeróbio são capazes de degradar diversas fontes de carbono através de respiração ou metabolismo fermentativo. Em condições anóxicas estritas podem fazer a oxidação completa da matéria orgânica gerando CO₂ (GERRITSE & GOTTSCHAL, 1993; BROOKS *et al.*, 2015).

Os enriquecimentos com cobre apresentaram produção de butirato e isobutirato, e maior abundância de fermentadores do gênero *Citrobacter*. A conversão de lactato e acetato em butirato (alimentação cruzada de lactato) é uma interação nutricional reconhecida entre bactérias produtoras de lactato e acetato e produtores de butirato. Esse processo era mais conhecido em bactérias do trato gastro-intestinal de humanos. Mas um estudo de Detman *et al.* (2019) demonstrou que lactato é convertido em butirato em comunidades de biorreatores de fermentação.

A análise da comunidade presente nos enriquecimentos em que houve remoção significativa de metais, demonstrou que grande parte da produção de sulfeto para precipitação de metais foi realizada pela dominância do gênero *Desulfovibrio* (25 a 70%). Demonstrando que os enriquecimentos com metais favoreceram o desenvolvimento de bactérias desse gênero, que no inóculo inicial apresentou baixa abundância (0,15%).

Diversos estudos mostram a viabilidade do uso do gênero *Desulfovibrio* sp para aplicações biotecnológicas (ZOUCH *et al.*, 2017; IGIRI *et al.*, 2018). O estudo de Kim *et al.* (2015) demonstrou a capacidade da espécie *Desulfovibrio desulfuricans* na eliminação de metais em água do mar. Foi desenvolvido biocarregador que utiliza zeolito como suporte para *D. desulfuricans* eficiente na remoção dos metais Cu²⁺, Cr⁶⁺ e Ni²⁺. A eficiência da remoção foi de 98,2; 99,8; e 90,1 mg/g, respectivamente, após aproximadamente 7 dias.

A capacidade deste grupo de bactérias para imobilizar metais depende da concentração do metal em solução, o que pode causar uma redução na atividade metabólica ou pode até ser tóxico para as bactérias. Pode-se observar através dos resultados encontrados na porcentagem de redução de sulfato em cada meio e na comunidade encontrada, que os metais Cu e Cd, apresentaram-se mais tóxicos às BRS.

Esses resultados foram corroborados por estudos prévios que também demonstraram uma toxicidade maior de Cu e Cd quando comparado ao Cr e Zn (CABRERA *et al.*, 2006; AHMADI *et al.*, 2015; HUSSAIN & QAZI, 2016). De acordo com Lin 1992 e 1993, a sequência de sensibilidade de processos a anaeróbios a diferentes metais é Cd > Cu > Cr > Zn > Pb > Ni.

Pode-se observar que a comunidade presente nos enriquecimentos dos dois metais mais tóxicos (Cd e Cu) ficou com uma similaridade maior. Enquanto que os menos tóxicos (Cr e Zn) ficaram mais próximos através da análise de distância. Demonstrando que esses metais têm influências similares na comunidade de BRS.

Um estudo de Utgikar *et al.*, (2003) avaliou constantes de toxicidade de Cu e Zn em ensaios para avaliar o metabolismo de BRS na presença de diferentes concentrações de metais, e identificou que a constante de toxicidade do Cu é maior do que do Zn, portanto a exposição dessa comunidade ao cobre gera maior mortalidade entre BRS.

Essa diferença perceptível no impacto de cada um dos metais no metabolismo de BRS, bem como as concentrações tóxicas de cada uma desses metais, pode ajudar a prever o comportamento dessa comunidade em biorreatores durante o tratamento de efluentes contaminados por metais (UTGIKAR *et al.*, 2003).

4.7.CONCLUSÃO

Áreas portuária são locais importantes para o estudo de bactérias redutoras de sulfato resistentes a metais por principalmente serem áreas expostas a uma contaminação a longo prazo. Bactérias redutoras de sulfato apresentam uma abundância relativamente alta nessas áreas. Os metais apresentam forte influência no metabolismo de BRS, onde existe maior concentração de metal ocorre menor porcentagem de remoção de sulfato, ou seja, menor atividade de BRS. A produção de acetato também indica a maior atividade de BRS. Os metais apresentam toxicidade diferentes, afetando o crescimento de BRS em diferentes níveis. Cd e Cu foram os metais que mais influenciaram na atividade de BRS. O enriquecimento desse tipo de microrganismo em concentrações de metais mais altas acaba favorecendo o crescimento de bactérias redutoras de sulfato do gênero *Desulfovibrio*. Sendo esse tipo de inóculo eficiente na remoção de metais com alta concentração inicial quando comparado com estudos anteriores. Esse tipo de estudo pode ser de grande utilidade para entendimento maior dos efeitos de diferentes metais em comunidades de BRS. Além disso, os dados coletados auxiliam na otimização de processos de tratamento de efluentes contaminados por diversos tipos de metais, uma vez que é possível prever o comportamento dessa comunidade de acordo com concentrações tóxicas de metais como Zn, Cu, Cr e Cd. A poluição ambiental por altas concentrações de metais e seu efeito extremamente prejudicial à biota torna urgente a busca por tratamento de

biorremediação eficientes evitando ao máximo que esse tipo de poluente chegue ao meio ambiente. Existe uma alternativa para esse problema através da potencialidade do uso de microrganismos oriundos de locais impactados como inóculo em reatores anaeróbios envolvidos no tratamento de águas residuárias contendo metais.

CAPÍTULO 5

UMA NOVA ESPÉCIE DE *DESULFOVIBRIO* ALTAMENTE RESISTENTE À METAIS: NÍVEL DE TOLERÂNCIA E GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA

5.1. RESUMO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são capazes de usar o sulfato como doador de elétrons produzindo sulfeto. O sulfeto produzido pode reagir com os metais, formando sulfetos metálicos insolúveis e precipitados, tornando possível sua remoção. No entanto, metais são compostos muito tóxicos e podem interferir no metabolismo de bactérias redutoras de sulfato, tornando a precipitação de metais limitada pela a concentração inicial de metais no inóculo. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi isolar BRS resistente à metais e analisar seu nível de tolerância e os genes de resistência envolvidos. Usando o sedimento de uma área portuária sabidamente contaminada por metais foi possível isolar uma nova espécie de *Desulfovibrio*. A cepa isolada foi capaz de crescer em concentrações altas comparadas com a literatura descrita para outras espécies de BRS, com o crescimento em concentrações iniciais de 4,0mM de Zn, 6,0mM de Cr, 0,6 mM de Cd e 1,4 mM de Cu. A anotação genômica identificou 25 genes envolvidos com a resistência à antibióticos e componentes tóxicos, destes, 19 são genes envolvidos na resistência metais, especialmente de Zn. Dessa maneira, foi possível avaliar que a cepa isolada apresenta alta resistência aos metais tendo potencial para serem usada em futuros estudos de biorremediação de áreas contaminadas e de tratamento de de efluentes contendo com metais. É importante destacar também a importância no isolamento de uma nova espécie de BRS do Brasil, uma vez que esse país tem uma diversidade microbiana sub explorada e poucos estudos taxonômicos desse grupo de microrganismos.

5.2. ABSTRACT

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are able to use sulfate as an electron donor, producing sulfide. The sulfide produced can react with metals, forming metal sulfides. Metals sulfide and insoluble and precipitate, in this way, it is possible to remove them. However, metals are very toxic compounds and can interfere with the metabolism of sulfate-reducing bacteria, making metal precipitation limited by the initial concentration of heavy metals in the inoculum. Thus, the aim of the present study was to isolate metal-resistant SRB and to analyze its tolerance level and the resistance genes involved. Using the sediment from a port area known to be contaminated with metals, it was possible to isolate a new species of *Desulfovibrio*. The isolated strain was able to grow at high metals concentrations compared to others SRB species found in the literature. The strain was able to grow at initial concentrations of 4.0mM Zn, 6.0mM Cr, 0.6mM Cd and 1.4 mM Cu. Genomic annotation identified 25 genes involved in antibiotic resistance and toxic components, of which 19 are genes involved in resistance to heavy metals, especially Zn. Thus, it was possible to evaluate that the isolated strain is highly resistant to metals having potential to be used in future bioremediation studies of metal contaminated effluents. It is also important to highlight the importance of isolating a new SRB specie from Brazil, since this country has an under explored microbial diversity and few taxonomic studies of this group of microorganisms.

5.3. INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato compreendem o maior grupo de bactérias anaeróbias. Eles possuem uma grande e diversificada árvore filogenética que inclui: bactérias Gram-negativas mesofílicas que pertencem à divisão δ -Proteobacteria, bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, bactérias termofílicas e Arqueobactérias termofílicas (CASTRO *et al.*, 2000).

Dentro desse grupo merecem destaque alguns gêneros de bactérias tais como: *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfonema*, *Desulfovibrio*, *Desulfobaculum* e *Desulfosporosinus* (CASTRO *et al.*, 2000). Estes microrganismos usam como fonte de carbono, compostos diversos: hidrocarbonetos aromáticos, n-alcanos, ácidos graxos e produtos orgânicos polares formados de bactérias aeróbias a partir de carboidratos, além de ácidos graxos voláteis e compostos orgânicos de cadeia curta como lactato e acetato (MUYZER & STAMS, 2008).

De acordo com Butlin *et al.* (1949), BRS foram descritas pela primeira vez por Beijerinck (1895) e isoladas em culturas puras por van Delden (1903), sua fisiologia e bioquímica foi sistematicamente investigada por Baars (1930). Um dos primeiros gêneros descritos foi o gênero *Desulfovibrio* (WIDDEL, 1988). Apesar de há muito anos esse grupo de bactéria ter sido estudada, novas tecnologias possibilitam o conhecimento da real diversidade desse grupo e da sua importância nos mais diferentes ecossistemas e suas importantes aplicações biotecnológicas.

Existem inúmeros estudos mostrando o potencial do gênero *Desulfovibrio* em uma grande variedade de processos de biorremediação. O metabolismo deste gênero pode aumentar o pH, causando a precipitação de íons metálicos tóxicos como cobre (II), níquel (II) e cádmio (II) na forma de sulfetos metálicos em efluentes da mina (ambientes aquáticos ácidos) (PAYNE *et al.*, 2003; HEIDELBERG *et al.*, 2004). Além disso, o *Desulfovibrio* sp pode converter metais tóxicos, como urânio (VI), tecnécio (VII) e cromo (VI), em formas reduzidas, menos solúveis, entregando elétrons diretamente a íons oxidados (JOO *et al.*, 2015; PAYNE *et al.*, 2003).

No entanto, metais são compostos muito tóxicos e podem interferir no metabolismo de bactérias redutoras de sulfato, tornando a precipitação de metais limitada pela a concentração inicial de metais no inóculo (FU & WANG, 2011). A toxicidade dos metais está relacionada à sua capacidade de perturbar as funções e estruturas enzimáticas,

ligando-se ao tiol e outros grupos em proteínas ou substituindo o cofator de metais naturais em grupos prostéticos de enzimas (CHEN *et al.*, 2014; PAULO *et al.*, 2015). Desta forma, esta toxicidade de metais é um dos principais problemas em biorreatores durante o tratamento de resíduos e águas residuárias. Ficou provado que uma das barreiras nos tratamentos de efluentes contaminados é a baixa sobrevida da BRS que poderia precipitar os metais (PAULO *et al.*, 2015; BHATTACHARYA, 1995).

Este fato é preocupante, pois alguns efluentes industriais podem ter maiores quantidades de metais. Por exemplo, foi relatada uma concentração de 4632-17.627 uM de Zn e 5826-22.173 uM de Cr em um efluente industrial de uma indústria de acabamento de superfície (SANCEY *et al.*, 2011).

Devido ao rápido desenvolvimento da indústria, houve um enorme aumento da quantidade de águas residuais contendo metais, o que representa um sério desafio às questões para manter o meio ambiente de qualidade (JAIN *et al.*, 2016).

Alguns metais como zinco, cádmio, cobre e cromo são facilmente encontrados em esgoto e efluentes não tratados (OCHOAHERRERA *et al.*, 2011). Esses metais não são degradáveis e acabam por acumular na água, solos e cadeia alimentar, resultando em efeitos subletais ou morte de plantas e animais (YI *et al.*, 2011).

Diferentes organismos desenvolvem várias respostas aos íons tóxicos, o que lhes confere uma certa tolerância aos metais. Eles possuem vários mecanismos de resistência específicos, como o sequestro ou a transformação para outras espécies químicas (MARTINS *et al.*, 2009; VALLS & LORENZO, 2002).

Segundo Navarro *et al.* (2013), o conhecimento atual indica que elementos-chave envolvidos na resistência a metais em microrganismos ambientais parecem ser um amplo repertório de determinantes conhecidos de resistência a metais e sua duplicação, a presença de novas chaperonas metálicas e abundantes reservas de metais polifosfato inorgânico (polyP) usado em um sistema de resistência a cobre baseado em polyP. O estudo de novos determinantes de resistência a metais em microrganismos ambientais poderia ajudar na anotação funcional desses genes nas sequências genômicas cada vez mais disponíveis de bactérias ambientais.

Desta forma, é muito importante tentar encontrar espécies altamente resistentes a diferentes metais, e pode ter uma grande atividade e, conseqüentemente, uma maior eficiência. A caracterização de determinantes e mecanismos de resistência a metais ajudará a entender como os microrganismos se adaptam a ambientes extremos e,

eventualmente, melhoram os processos de biorremediação de metais (NAVARRO *et al.*, 2013).

A probabilidade de encontrar organismos resistentes é maior em locais que foram expostos à contaminação por metais a longo prazo, pois, dessa forma, a comunidade microbiana foi forçada a uma pressão seletiva e teve que se adaptar a essa a ela, desenvolvendo mecanismos de resistência a metais (MARTINS *et al.*, 2009).

Além disso, não existem muitos estudos no Brasil com o objetivo de isolar BRS, indicando que a comunidade microbiana brasileira ainda precisa ser sistematicamente estudada. Existem muitos microrganismos ainda não conhecidos que podem ter alto potencial para serem utilizados em diversas aplicações biotecnológicas.

Desta forma, este estudo teve como objetivo isolar bactérias redutoras de sulfato resistentes a metais e investigar a taxonomia, fisiologia e crescimento dos isolados em diferentes concentrações de metais. Além disso, estudamos as características do genoma e os genes provavelmente envolvidos no processo de resistência a metais.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Origem do inóculo

O sedimento utilizado como inóculo foi coletado no Porto de Santos, nos mesmos pontos de coleta descritos na seção 4.4.1. e 4.4.2. Foi feito um mix dos sedimentos coletados nos 5 pontos escolhidos e este foi utilizado como inóculo para os enriquecimentos que foram utilizados para o posterior isolamento

5.4.2. Enriquecimento da comunidade de BRS em elevadas concentrações de metais

Foram preparados enriquecimentos com diferentes concentrações dos mesmos metais testados nos capítulos anteriores (Zn, Cr, Cu e Cd). Esses metais foram escolhidos, uma vez que alguns estudos mostraram que eles apresentam concentrações significativas na área selecionada (BURUAEM *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2018).

Primeiro, foi feito um meio básico anóxico com a seguinte composição (g L⁻¹): 0,41 KH₂PO₄; 0,53 Na₂HPO₄ · 2H₂O; 0,3 NH₄Cl; 0,3 NaCl; 0,1 MgCl₂·6H₂O; 0,11 CaCl₂

· 2H₂O; e 1 mL L⁻¹ de cada solução de oligoelementos ácidos e alcalinos (anexo 2); 0,2 mL L⁻¹ de vitaminas (anexo 3); 0,1 g L⁻¹ de extracto de levedura BBL (Becton Dickinson, Cockeysville, MA) e 1 mL L⁻¹ de solução de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI), como descrito por STAMS *et al.*, 1993. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH 1M. O meio foi distribuído em frascos de antibiótico de 120 mL com 50 mL de volume reacional. Em seguida, os frascos foram fechados com badoques de borracha butílica (Rubber BV, Hilversum, Holanda), lavados com 1,5 atm de N₂ / CO₂ (80:20, v / v) e autoclavados.

Lactato foi adicionado como doador de elétrons e fonte de carbono a partir de soluções estoque anaeróbicas estéreis para uma concentração final de 20 mM. Cloreto de ferro foi usado como agente redutor. Adicionou-se Cobre sob a forma de CuSO₄, em concentrações finais de: 0,3 mM, 1,3 mM, 3,0 mM, 5,0 mM. O cromo foi adicionado na forma de CrSO₄, em concentrações finais de: 0,4 mM, 4,0 mM, 8,0 mM e 12 mM. Adicionou-se zinco na forma de ZnSO₄ em concentrações finais de: 0,3 mM, 1,0 mM, 6,0 mM e 10 mM. O cádmio foi adicionado na forma de CdSO₄, em concentrações finais de: 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM e 0,5 mM. Uma alíquota de 1 mL da mistura de sedimentos foi adicionada como inoculo.

Todos os enriquecimentos foram feitos em triplicata e um controle positivo (sem metal, com inóculo) e um controle negativo (meio com metais sem inóculo) também foram realizados. Os enriquecimentos foram incubados estaticamente a 30 °C durante 30 dias.

A atividade de bactérias redutoras de sulfato foi monitorada através da redução de sulfato colocado no meio de cultura. Dessa maneira, o sulfato foi medido semanalmente em todos os frascos.

As medições de sulfato foram realizadas utilizando cromatógrafo de íons Dionex ICS-1000 equipado com uma coluna IonPac AS22 e eluente de bicarbonato de carbonato-1,4 mM 4,5 mM a uma taxa de 1,2 mL min⁻¹ (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA).

5.4.3. Isolamento de BRS

O processo de isolamento foi iniciado com os frascos de enriquecimento que apresentaram maior concentração de metais com atividade de redução de sulfato. Para isolamento foi utilizado meio anóxico basal descrito por Stams, Van Dijk et al. (1993). O meio é composto por (g L⁻¹): 0,41 KH₂PO₄; 0,53 Na₂HPO₄·2H₂O; 0,3 NH₄Cl; 0,3 NaCl;

0,1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,11 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; e 1 mL L^{-1} de solução de elementos traço ácida e alcalina; 0,2 mL L^{-1} vitaminas; 0,1 g L^{-1} de extrato de levedura (Becton Dickinson, Cockeysville, MA) and 1 mL L^{-1} resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) (STAMS, VAN DIJK *et al.* 1993) e ainda foi adicionado 13g L^{-1} de ágar e colocado em placas de petri utilizando câmara anaeróbia, e foi utilizado Fe(II)Cl_2 como solução redutora. Após solidificação do meio foi inoculado 100 μL da cultura. As placas foram encubadas à 30°C em jaras anaeróbias pressurizadas com N_2/CO_2 (80:20,v/v) até observar o aparecimento de colônias de coloração negra devido a precipitação de Fe reagindo com o sulfeto produzido pela BRS.

Após o crescimento, colônias foram reinoculadas no mesmo meio basal, mas sem adição de ágar. Após crescimento as colônias foram novamente inoculadas em placas de petri, esse processo foi feito sucessivamente para garantir a presença de culturas puras (Figura 48).

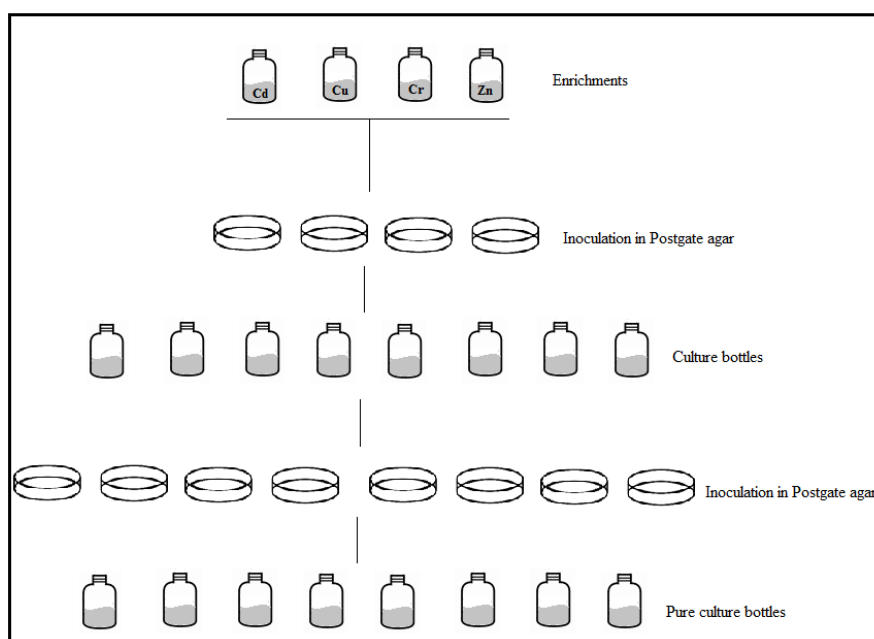


Figura 48 – Design experimental do processo de isolamento.

Nas placas contando meios sólidos foi adicionada 100uL de uma solução 20mM de FeCl_2 , para facilitar a escolha de cepas que fossem redutoras de sulfato. Pois através da produção de sulfeto originado do crescimento de BRS, havia a formação de um precipitado preto no topo da colônia, resultado da reação do ferro com o sulfeto, formando sulfeto de ferro que tem coloração preta (Figura 49).

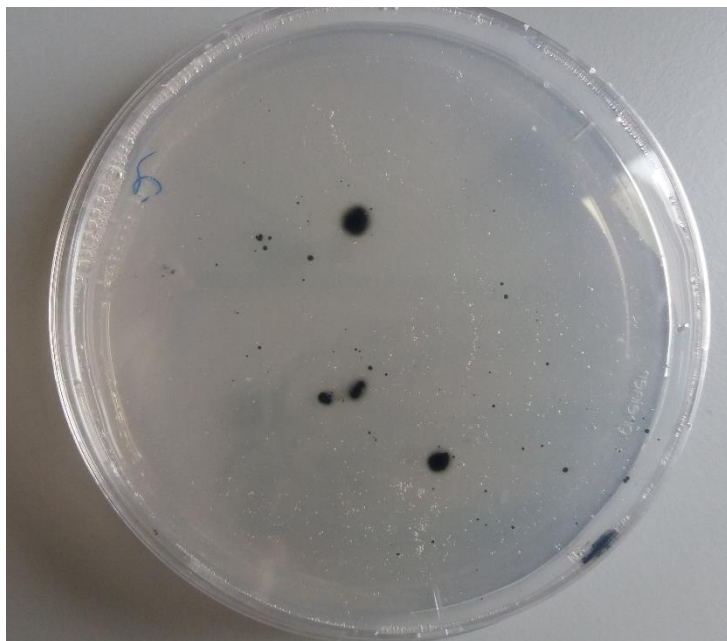


Figura 49 – Placa com crescimento de BRS que tem como característica a coloração preta devido a reação do sulfeto (produzido pelas BRS) com o FeCl_2 adicionado ao meio de cultura.

5.4.4. Identificação das cepas isoladas e reconstrução filogenética

A identificação das cepas foi feita através do sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando a técnica de sequenciamento Sanger. Primeiro, 1,0 mL de cultura líquida foram centrifugados por 5 min a 14.000 g e o sobrenadante foi removido, após esse processo o sedimento foi ressuspensionado em 100 μL de T.E. Desta suspensão de células, 2 mL foi usado como material para realização do PCR usando os primers 27F e 1492R (TIMMERS *et al.*, 2015). O produto de PCR foi examinado por electroforese em gel e limpo utilizando o kit de purificação MasterPure DNA, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi enviado para a GATC Biotech (Konstanz, Alemanha) para sequenciamento Sanger usando os mesmos primers como primers de sequenciamento. As sequências parciais foram cortadas com qualidade, verificadas quanto à contaminação por vetores e fundidas em sequências inteiras com o DNA Baser versão 4.20.0. As sequências resultantes foram alinhadas e classificadas com SINA v1.2.11 (PRUESSE *et al.*, 2012) usando o banco de dados SILVA Ref NR SSU r128 (YILMAZ *et al.*, 2014).

Cálculos de identidade de sequência e reconstrução filogenética foram realizados com o ARB versão 6.0.2 (WESTRAM *et al.*, 2011) e o banco de dados SILVA Ref NR SSU r132 (lançado em dezembro de 2017). Cálculos de identidade de sequência foram feitos com a matriz de distância ARB usando correção de similaridade. Para a

reconstrução filogenética, um número inicial de 632 sequências > 1200 pb foi selecionado. Os algoritmos GTRGAMMA de aproximação de vizinhança ARB (correção de Felsenstein) e de máxima verossimilhança RAxML v7.7.2 foram aplicados com filtros de frequência de 30 e 50% de pares de bases e, a partir das árvores resultantes, foi construída uma árvore de consenso, como descrito em Sánchez-Andrea & Stams *et al.* (2013).

A pureza dos isolados foi verificada: i) microscopicamente, ii) pela análise das sequências do gene 16S rRNA de cerca de 100 clones agrupados por ARDRA. Para isso, o DNA extraído dos isolados foi amplificado e clonado seguindo o protocolo descrito por Sánchez-Andrea & Stams *et al.* (2013). Inserções foram rastreadas por Análise de Restrição do rDNA Amplificado (ARDRA) usando endonuclease EcoI e KpnI (1U, 3,5 h, 37 ° C) e agrupados de acordo com os padrões de restrição obtido. Os padrões diferentes foram sequenciados na GATC Biotech AG, Konstanz, Alemanha; e iii) por inoculação em meio fresco com 1 g L⁻¹ extrato de levedura e 5 mM glicose para detectar a contaminação por fermentadores (FLORENTINO *et al.*, 2015).

5.4.5. Sequenciamento e análise do genoma

Para o sequenciamento do genoma, a cepa foi cultivada em frascos de 100 mL previamente descritas para o processo de isolamento. A biomassa foi recolhida por centrifugação a 4700 g a 4 °C, durante 20 min, e o sobrenadante foi descartado. Para evitar contaminantes que pudessem interferir na extração do DNA, foram realizados dois passos de lavagem. O sedimento foi ressuspensão em tampão de fosfato estéril, centrifugado à 13.400 g à 4 °C durante 10 min, e o sobrenadante foi novamente descartado, este passo foi repetido duas vezes. Para um DNA de alta qualidade e quantidade para uma bom sequenciamento do genoma, foi utilizado o protocolo descrito por Salvà-Serra *et al.* (2018). A qualidade e concentração do DNA genômico foram verificadas através de eletroforese em gel, Nanodrop e Quibit. O DNA genômico foi congelado e enviado para BaseClear BV (Leiden, Holanda) onde foi feito o sequenciamento utilizando a plataforma Illumina HiSeq2500. A qualidade e a duração das leituras de Illumina foi inspecionada com a versão 0.10.12 do FastQC.

O genoma extraído foi verificado quanto à integridade, contaminação e heterogeneidade de deformação através do CheckM (PARKS *et al.*, 2015). A anotação do genoma foi verificada usando o servidor RAST (AZIZ *et al.*, 2008).

A sequência genômica utilizada para o estudo comparativo (e seus números de acesso) foi: *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 (PRJNA37769).

A análise da média da identidade nucleotídica (average nucleotide identity - ANI) entre os pares de conjuntos de dados do genoma foi realizada usando a ferramenta online da calculadora ANI, disponível em <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>. Os valores de hibridização DNA-DNA *in silico* (DDH) também foram determinados usando o servidor da Web Calculadora de Distância Genoma para Genoma (GGDC) versão 2.0 (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013).

5.4.6. Testes de resistência à metais da cepa isolada

Os isolados foram inoculados em frascos de 120 mL com 50 mL de volume final nas mesmas condições descritas anteriormente para o primeiro enriquecimento com diferentes concentrações de Zn, Cr, Cd e Cu e, em seguida, foi analisado o consumo de lactato, redução de sulfato, produção de sulfetos e precipitação de metais em cada condição.

Os experimentos foram realizados em triplicatas com um controle negativo (CN) e um positivo (CP) para cada cepa. Também foram realizados experimentos de fermentação, também em frascos de soro de 120 mL com 50 mL, para garantir que as cepas pudessem crescer em metal de alta concentração, evitando a produção de sulfeto que acaba precipitando os metais. Para isso, a cepa foi inoculada no mesmo meio basal com a maior concentração de metal que as cepas foram capazes de crescer usando o processo de redução de sulfato, porém não foi adicionada nenhuma fonte de sulfato e, ao invés de lactato como doador de elétrons e fonte de carbono, foi utilizado piruvato em uma concentração final de 20mM. O consumo de piruvato foi analisado, bem como a concentração de metal no início e no final do experimento.

O sulfato foi medido como já explicado na seção 5.4.2., utilizando cromatógrafo de íons Dionex ICS-1000. Lactato e piruvato foram quantificados usando um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) LKB com uma coluna Varian Metacarb 67H 300 mm e eluente 0,01 N H₂SO₄ a uma taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹. As concentrações de sulfeto nos enriquecimentos foram determinadas pelo método fotométrico de azul de metileno, conforme descrito por Cline (1969). E por fim, as

concentrações de metais solúveis foram determinadas com testes de células Spectroquant® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Enriquecimento da comunidade de BRS em elevadas concentrações de metais

Foi observado, após 28 dias de experimento, que o sulfato foi consumido completamente onde não havia sido adicionado os metais testados. Em contrapartida, todos os ensaios, quanto maior foi a concentração de metais, menor foi a atividade da comunidade microbiana sulfetogênica, como pode ser observado pela diminuição na redução de sulfato (Figura 50).

Para os enriquecimentos com cromo, foram removidas até 1500 mg/L de sulfato, representando uma porcentagem de remoção de 50% na concentração inicial mais baixa (0,4 mM), para os outros ensaios (4, 8 e 12 mM) foram removidos em médias 1100 mg/L de sulfato (40% da concentração inicial). Já para os enriquecimentos de Cd, foi observada uma diminuição gradativa na remoção de sulfato de acordo com o aumento da concentração de Cd, removendo até 2470 mg/L de sulfato (80% de remoção) na concentração de 0,2 mM, esse valor caiu para 750 mg/L de sulfato na maior concentração de 0,7mM. Cobre aparentemente foi o metal mais tóxico à comunidade microbiana testada, pois a remoção de sulfato ficou em torno de 620 mg/L dos 3000 mg/L iniciais para todas as concentrações testadas (0,3; 1,3; 3,0 e 5,0 mM). Já para os enriquecimentos com Zn, foi possível obter a remoção de 2498 mg/L de sulfato na concentração inicial de 0,3 mM e de 635 mg/L na maior concentração testada (10 mM).

Dessa maneira, alíquotas provenientes dos enriquecimentos com concentração inicial de 12 mM de Cr, 0,3 mM de Cd, 5,0 mM de Cu e 3,0 mM de Zn foram utilizados para os ensaios de isolamento de BRS resistentes à metais.

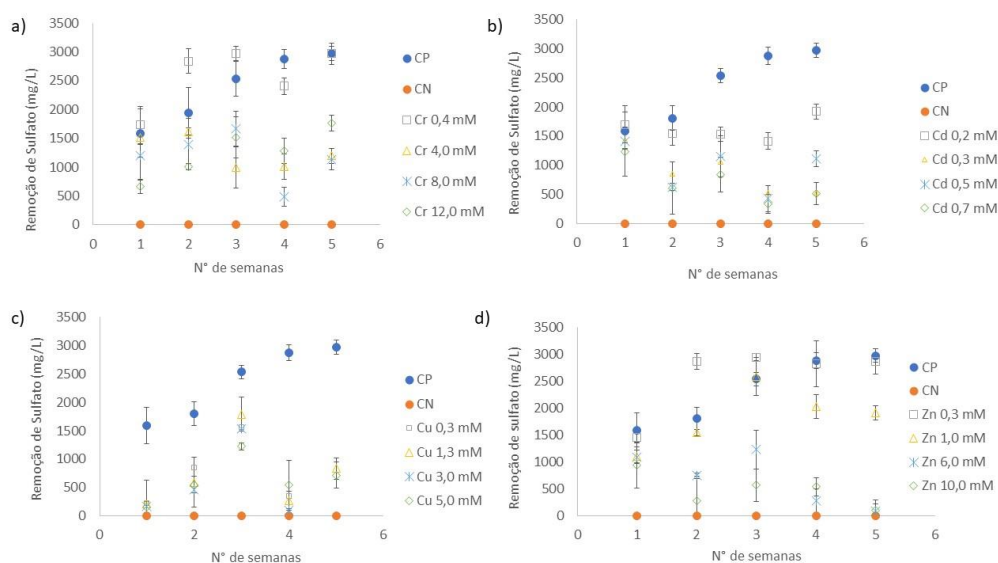


Figura 50 – Porcentagem de remoção de sulfato nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de Cr (a), Cd (b), Cu (c) e Zn (d). CP indica o controle positivo (meio somente com inóculo e sem adição de metais) e CN o controle negativo (meio sem inóculo com adição de metais).

5.5.2. Filogenia e Identificação dos Isolados

Os enriquecimentos com as maiores concentrações de metal que apresentaram atividade redutora de sulfato foram escolhidos como inóculo para o processo de isolamento. Após esse processo, foram isoladas 7 cepas de bactérias redutoras de sulfato (figura 51).

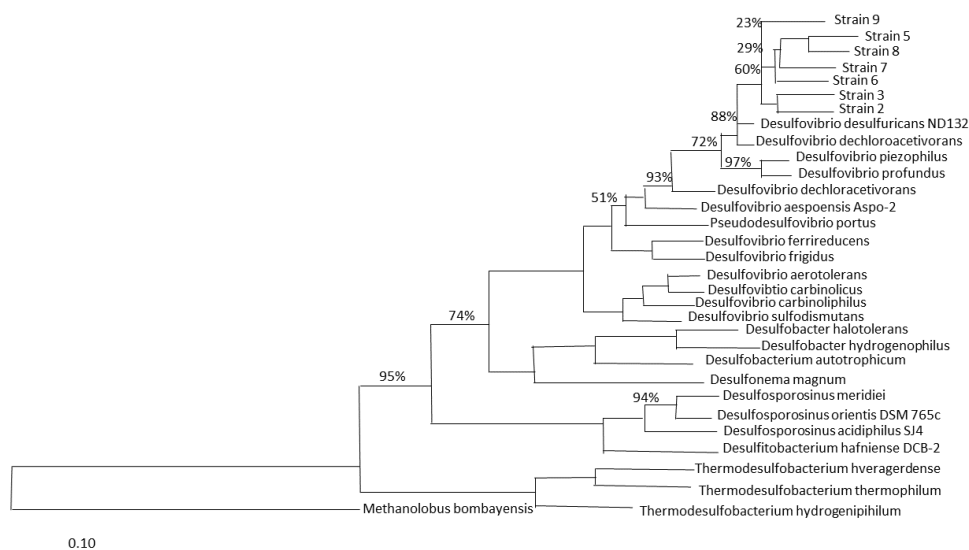


Figura 51 – Árvore filogenética baseada na análise da sequência 16S rDNA, mostrando a localização filogenética das cepas isoladas no presente estudo. A árvore foi construída pelo método estatístico “Neighbor-joining”, e *Methanobacterium thermophilum* foi usado como grupo externo.

A porcentagem de similaridade entre os isolados e as espécies de maior grau de parentesco podem ser visualizadas na tabela 12. A análise do DNA mostrou que todas as 7 cepas isoladas são bactérias do gênero *Desulfovibrio* e com porcentagem de similaridade de 99% entre elas, indicando que todas as cepas são representantes da mesma espécie. Entretanto, essas cepas representam espécie provavelmente nova pois apresentaram entre 96 e 97% de similaridade, e de acordo com Yarza *et al.* (2014) porcentagens inferiores a 98% são indicativas de nova espécie.

Tabela 12 – Porcentagem de similaridade através do método de distância Neighbor-Joining.

	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St7	DsDesu	DsDech
St1	-	0.9916	0.9815	0.9863	0.9901	0.9923	0.9804	0.9760	0.9489
St2	0.9916	-	0.9875	0.9854	0.9886	0.9878	0.9791	0.9743	0.9468
St3	0.9863	0.9854	-	0.9812	0.9917	0.9939	0.9748	0.9640	0.9410
St4	0.9863	0.9854	0.9812	-	0.9894	0.9947	0.9770	0.9667	0.9416
St5	0.9901	0.9886	0.9917	0.9894	-	0.9931	0.9749	0.9750	0.9528
St6	0.9923	0.9878	0.9939	0.9947	0.9931	-	0.9762	0.9771	0.9550
St7	0.9804	0.9791	0.9748	0.9770	0.9749	0.9762	-	0.9679	0.9423
DsDesu	0.9760	0.9743	0.9640	0.9667	0.9750	0.9771	0.9679	-	0.9622
DsDech	0.9489	0.9468	0.9410	0.9416	0.9528	0.9555	0.9426	0.9622	-

* St representam as cepas isoladas; DsDesu (*Desulfovibrio desulfuricans*) e DsDech (*Desulfovibrio dechloroacetivorans*).

A sequência do genoma foi usada para confirmar a presença de uma nova espécie de *Desulfovibrio*. A identidade média dos nucleotídeos (ANI) e os valores de DDH (hibridização DNA-DNA) *in silico* obtidos da comparação pareada das sequências genômicas disponíveis dos membros do gênero *Desulfovibrio* são mostrados na Tabela 13. Para serem indicadas novas espécies existe a recomendação da presença de valores de DDH inferiores a 70% e valores de ANI inferiores a 95% (GORIS *et al.*, 2007), confirmando, então, *Desulfovibrio* sp FE33 como uma nova espécie.

Tabela 13 – Comparação da sequência completa do genoma da cepa *Desulfovibrio* sp FE33 com a espécie filogeneticamente mais próxima (*Desulfovibrio desulfuricans*).

		<i>D. desulfuricans</i>
DDH	1	12.7
	2	20.0
	3	13.1
ANI	4	83.76

A pureza das culturas foi checada utilizando a técnica de ARDRA. Os resultados presentes na figura 52, mostram os padrões de DNA encontrados após o corte com enzima de restrição, todos eles, depois de sequenciados indicaram a presença apenas do gênero *Desulfovibrio* isolado no presente estudo.

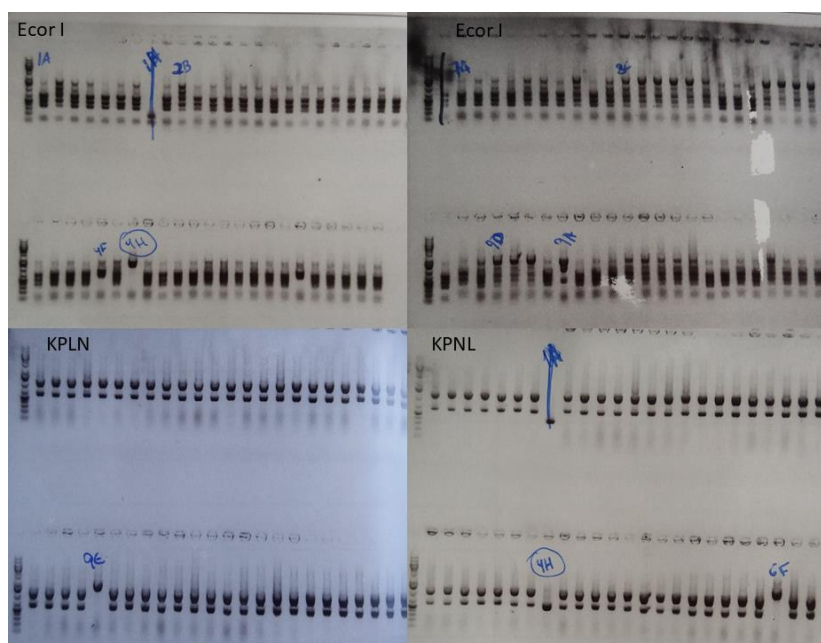


Figura 52- Padrões dos clones após corrido de eletroforese em gel de agarose (1,5%), cada banda representa um fragmento de DNA após serem cortados pelas enzimas de restrição ECOR I e KPNL (1A, 1H, 2B, 4F, 4H, 7H, 8C, 9D, 9A, 9E, 4H e 6F foram os clones que apresentaram padrões diferentes e foram sequenciados para certificação que o DNA presente era da cepa isolada).

5.5.3. Análise de resistência aos metais.

As cepas isoladas foram inoculadas em diferentes concentrações iniciais de Zn, Cr, Cu e Cd. E suas atividades foram monitoradas para saber quais concentrações máximas essas cepas seriam capazes de resistir.

Para o ensaio com Zn, as concentrações iniciais variaram de 0,1 mM até 10 mM. Até a concentração de 4,0 mM foi observado consumo total de lactato (24,5 mM), com remoção de 12,4 mM de sulfato e produção de 26,9 mM de acetato (Tabela 14).

Tabela 14 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de zinco.

Enriquecimento	Lactato (mM)		Sulfato (mM)		Acetato (mM)		Concentração de Zn (mM)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1 (Controle Positivo)	22,1	0,0	18,9	8,6	0,0	20,1	0,0	0,0
2	19,0	0,0	22,1	9,8	0,0	17,4	0,19	0,0
3	20,9	0,0	18,8	9,4	0,0	18,0	0,35	0,0
4	14,4	0,0	22,0	12,2	0,0	12,6	0,8	0,0
5	21,2	0,0	19,9	9,3	0,0	18,2	1,2	0,0
6	32,6	0,0	21,3	4,0	0,0	27,0	2,0	0,0
7	24,5	0,0	20,9	8,5	0,0	26,9	3,9	0,0
8	27,3	27,2	20,4	20,0	0,0	0,0	7,9	7,5
9	22,9	23,1	22,9	23,7	0,0	0,0	10,2	8,1
10 (Controle Negativo)	22,0	22,0	18,5	18,5	0,0	0,0	7,9	7,9

Durante os ensaios, pôde-se perceber visualmente o processo de redução de sulfato devido a reação do ferro presente no meio com o sulfeto produzido, a formação de sulfeto de ferro forma um precipitado preto que é possível ser visualizado nos frascos onde houve crescimento de BRS (Figura 53).



Figura 53 – Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de zinco (0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0). É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro.

Para os ensaios com Cr, foram escolhidas concentrações que variaram de 0,1 até 12 mM. Foi observada atividade de redução de sulfato e precipitação de 100% da concentração inicial de metal até a concentração de 6,0 mM de Cr (Tabela 15).

Tabela 15 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de cromo.

Enriquecimento	Lactato (mM)		Sulfato (mM)		Acetato (mM)		Concentração de Cr (mM)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1 (Controle Positivo)	22,1	0,0	18,7	9,1	0,0	20,1	0,0	0,0
2	10,7	0,0	15,2	9,7	0,0	18,2	0,1	0,0
3	13,4	0,0	13,1	9,5	0,0	15,5	0,3	0,0
4	17,6	0,0	14,0	9,2	0,0	16,8	0,5	0,0
5	14,6	0,0	15,9	10,0	0,0	17,8	0,8	0,0
6	27,8	0,0	15,9	9,4	0,0	19,0	1,5	0,0
7	21,2	0,0	18,9	5,1	0,0	22,9	3,0	0,0
8	27,7	25,0	19,4	18,4	0,0	1,11	6,0	5,8
9	19,0	15,2	18,1	17,0	0,0	2,4	12,0	10,1
10 (Controle Negativo)	21,0	21,5	17,3	17,5	0,0	0,0	10,0	9,5

O precipitado preto formado devido ao crescimento da cepa Fe33 nas concentrações de Cr de 0,1 a 3,0 mM pode ser visualizado na figura 54.



Figura 54 - Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de cromo (0,1; 0,5; 1,5; 3,0 mM). É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro.

Já para os ensaios com Cu, foram escolhidas concentrações iniciais que variaram de 0,1 até 6,5 mM. O enriquecimento com a concentração inicial de Cu de 0,9 mM foi a maior concentração em que foi visualizada consumo total de lactato, redução de sulfato e precipitação de metais (tabela 16).

Tabela 16 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de cobre.

	Lactato (mM)		Sulfato (mM)		Acetato (mM)		Concentração de Cu (mM)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Enriquecimento 1 (Controle Positivo)	22,1	0,0	18,7	9,1	0,0	20,1	0,0	0,0
2	21,2	0,0	10,1	9,9	0,0	18,1	0,1	0,0
3	18,4	0,0	21,1	10,5	0,0	16,6	0,3	0,0
4	20,1	0,0	19,3	9,9	0,0	18,6	0,6	0,0
5	21,5	0,0	19,0	9,1	0,0	18,6	0,9	0,0
6	33,9	32,1	19,2	17,3	0,0	0,0	1,5	0,5
7	30,7	29,4	18,0	17,2	0,0	0,0	2,5	1,5
8	22,7	22,4	18,1	16,8	0,0	0,0	4,5	4,0
9	24,9	25,2	17,5	17,0	0,0	0,0	7,5	6,5
10 (Controle Negativo)	23,0	22,8	17,4	17,5	0,0	0,0	9,0	9,0

Nos enriquecimentos em que houve o crescimento da cepa pode ser observado o precipitado preto formado devido a formação de sulfeto (Figura 55).



Figura 55 - Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de cobre. É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro.

Por fim, nos ensaios com Cd, as cepas isoladas foram capazes de crescer e reduzir sulfato nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5 e 0,6 mM (Tabela 17).

Tabela 17 – Remoção de lactato, redução de sulfato, produção de acetato e precipitação de metal nos enriquecimentos com diferentes concentrações iniciais de cádmio.

Enriquecimento	Lactato (mM)		Sulfato (mM)		Acetato (mM)		Concentração de Cd (mM)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1 (Controle Positivo)	22,1	0,0	18,7	9,1	0,0	20,1	0,0	0,0
2	18,7	0,0	21,2	10,6	0,0	16,8	0,1	0,0
3	21,5	0,0	19,8	9,4	0,0	19,3	0,3	0,0
4	19,6	0,0	20,8	10,6	0,0	17,8	0,5	0,0
5	20,0	0,0	18,7	10,3	0,0	17,6	0,6	0,0
6	30,6	25,2	18,9	18,3	0,0	0,0	0,7	0,5
7	26,7	17,0	21,0	19,2	0,0	0,0	0,8	0,6
8	20,1	19,2	18,6	117,6	0,0	0,0	0,9	0,7
9	22,3	21,8	19,7	17,6	0,0	0,0	1,1	0,8
10 (Controle Negativo)	23,0	22,8	17,4	17,5	0,0	0,0	0,8	0,9

O precipitado preto formado devido ao crescimento da cepa Fe33 nas concentrações de Cd pode ser visualizado na figura 56.



Figura 56 - Ensaio de resistência à diferentes concentrações iniciais de cádmio. É possível visualizar o precipitado preto devido a produção de sulfeto pela *Desulfovibrio* sp Fe33, e formação de sulfeto de ferro que forma o precipitado escuro.

Os ensaios de fermentação foram realizados com as maiores concentrações onde foi observada a atividade de redução de sulfato e consequente precipitação dos metais. Dessa maneira, de acordo com a figura 57, foi possível observar que as bactérias, na ausência de sulfato, utilizam o piruvato como doador de elétrons e fonte de carbono, e os metais continuam dissolvidos no meio do começo ao fim do experimento. Indicando que as cepas, mesmo expostas à toxicidade dos metais dissolvidos durante o período de 28 dias de ensaio, continuam com o metabolismo fermentativo, confirmando a resistência aos metais.

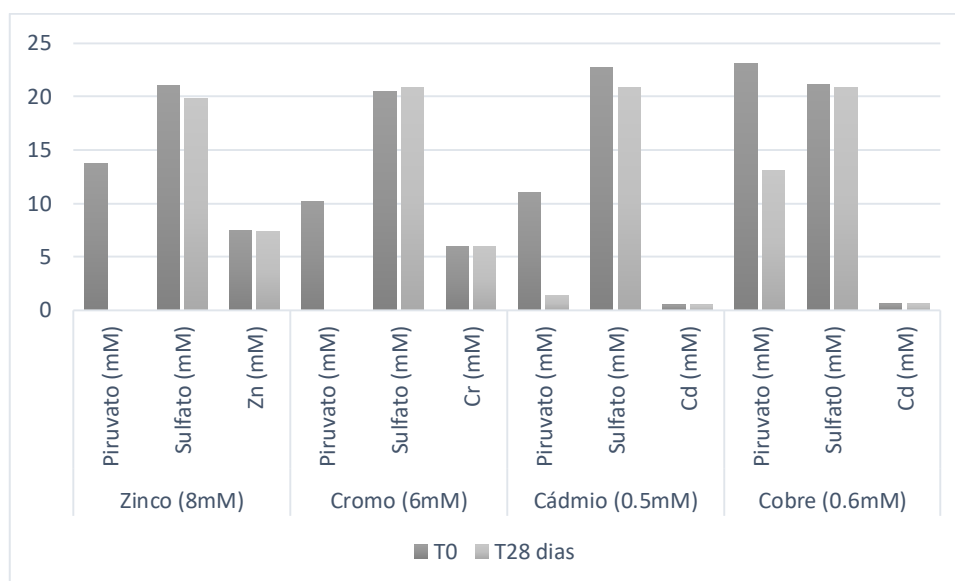


Figura 57 – Concentração de piruvato, sulfato e dos metais (Zn, Cr, Cd e Cu) durante os ensaios de 28 dias de fermentação.

As concentrações de metais em que foi encontrada atividade da cepa isolada foram comparados com estudos semelhantes presentes na literatura (Tabela 18). Pode-se visualizar que as concentrações tóxicas encontradas para outras bactérias redutoras de sulfato são bem inferiores a maior concentração de Zn e Cr em que a *Desulfovibrio* sp Fe33 apresentou atividade metabólica. Já para Cu e Cd foram poucos estudos que apresentaram concentrações tóxicas um pouco acima da concentração onde foi encontrada atividade da cepa isolada no presente estudo.

Tabela 18 – Concentrações tóxicas de metais (mM) que inibem o crescimento de BRS, encontrados na literatura.

Metal	Concentrações tóxicas (mM)	Culturas de BRS	Referência
Cu (II)	>0.16	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	Azabou et al., 2007
	0.15	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> e <i>Desulfovibrio</i> sp.	Cabrera et al. , 2006
	0.03	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Sani et al., 2001
	0.2	Culturas mistas	Utgikar et al., 2003
	0.06-0.32	Culturas mistas	Hao et al. , 1994
	1.3	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> e <i>Desulfohalobium rhabdoformis</i> (Consórcio)	Martins et al., 2009
	0.16	Culturas mistas	Binish et al., 2015

Metal	Concentrações tóxicas (mM)	Culturas de BRS	Referência
Cu (II)	0.03	Culturas mistas	Sinbuathong et al., 2013
	0.8	Culturas mistas	Sheng et al., 2011
	>0.5	<i>Desulforella</i> strain TR1	Florentino et al., 2015
	0.6	<i>Desulfovibrio</i> sp FE33	Presente estudo
Zn (II)	>0.5	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	Azabou et al. , 2007
	0.13	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Cabrera et al., 2006
	0.13	Culturas mistas	Utgikar et al., 2003
	0.09	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Poulson et al., 1997
	0.16-0.26	Culturas mistas	Hao et al., 1994
	1.0	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> e <i>Desulfobulbus rhabdoformis</i> (Consórcio)	Martins et al., 2009
	0.8	Culturas mistas	Guo et al., 2017
	0.2	Culturas mistas	Sinbuathong et al., 2013
	0.09	<i>Desulforella</i> strain TR1	Florentino et al., 2015
	4.0	<i>Desulfovibrio</i> sp FE33	Presente estudo
Cr (VI)	1.0	Culturas mistas	Guo et al., 2017
	0.6	Culturas mistas	Sheng et al., 2011
	3.0	<i>Desulfovibrio</i> sp FE33	Presente estudo
Cd (II)	0.12	Culturas mistas	Binish et al., 2015
	0.2	Culturas mistas	Sinbuathong et al., 2013
	0.5	<i>Desulfosarcina</i> sp.	Bharathi et al., 1990
	0.4	<i>Desulfovibrio</i> sp FE33	Presente estudo

5.5.4. Análise do genoma e dos genes de resistência encontrados

O genoma encontrado apresenta 24 contigues com tamanho total de 3456749 pb. CheckM identificou o genoma como estando 100% sequenciado e com 0% de contaminação. O conteúdo CG encontrado foi de 60.91%.

A anotação genômica, realizada através do servidor RAST, identificou 25 genes envolvidos com a resistência à antibióticos e componentes tóxicos, destes, 19 são genes envolvidos na resistência metais (figura 58).

Categorias de subsistemas:

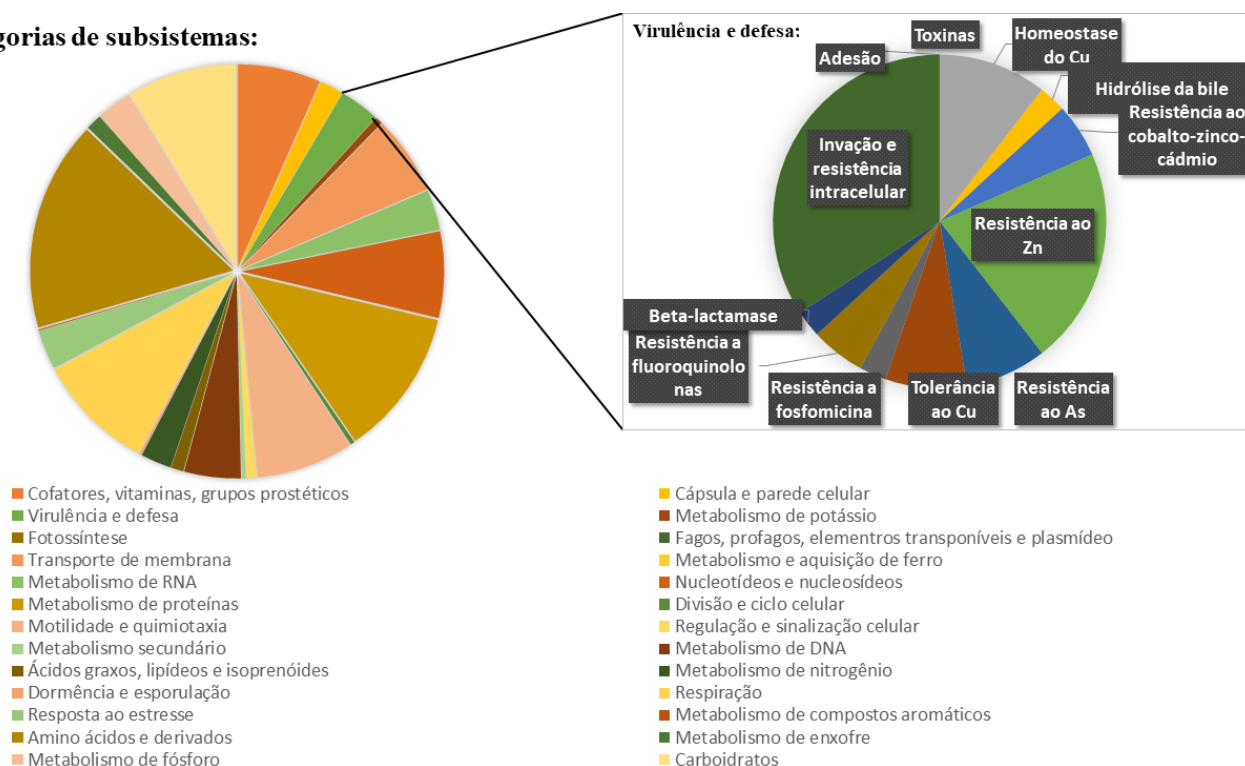


Figura 58 – Gráfico realizado com os dados da anotação genômica mostrando as porcentagens das principais categorias de genes encontrados no genoma da *Desulfovibrio* sp Fe33. No detalhe estão as porcentagens de grupos genes encontrados dentro da categoria dos subsistemas envolvidos na Defesa e Virulência da célula.

Os genes encontrados na cepa isolada (*Desulfovibrio* sp Fe33) foram comparados com outras espécies de BRS que tiverem seu genoma sequenciado (Tabela 19). É possível observar que a *Desulfovibrio* sp Fe33 apresentou maior quantidade de genes envolvidos na resistência a metais.

Tabela 19 – Genes envolvidos na resistência a metais da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 e a comparação da presença desses genes em outras bactérias redutoras de sulfato.

<i>Sistema</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>sp</i> <i>Fe33</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> <i>G20</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>magneticus</i>	<i>Desulfotomaculum</i> <i>acetoxidans</i> <i>DSM 771</i>	<i>Desulfococcus</i> <i>oleovorans</i> <i>Hxd3</i>
Resistência ao arsênio	Arsenato reductase (EC 1.20.4.1)	presente	presente	ausente	presente	ausente	Presente
Resistência ao arsênio	Proteína de resistência ao arsênio - ACR3	presente	presente	ausente	presente	ausente	Presente
Resistência ao Cobalto-zinco-cádmio	Resistência ao Cobalto-zinco-cádmio	presente	presente	presente	presente	presente	Presente
Homeostase do cobre	ATPase do tipo P de translocação de cobre (EC 3.6.3.4)	presente	presente	presente	presente	presente	Presente
Homeostase do cobre	Subunidade do citocromo c heme-liase CcmF	presente	presente	ausente	presente	ausente	Ausente
Tolerância ao Cobre	Proteína de homeostase de Cobre CutE	presente	presente	presente	presente	ausente	Presente
Tolerância ao Cobre	Proteína de efluxo de magnésio e cobalto CorC	presente	presente	presente	presente	ausente	Ausente
Tolerância ao Cobre	Proteína periplasmática cátion divalente tolerante a cobre CutA	presente	presente	ausente	presente	ausente	Ausente
Resistência ao zinco	Regulador de resposta do sistema de dois componentes dependente de zinco sigma-54	presente	presente	ausente	presente	ausente	Presente
Resistência ao zinco	Sistema de dois-componentes da proteína sensora de zinco sigma-54	presente	presente	ausente	presente	ausente	Presente
Resistência ao zinco	Proteína associada à resistência a Zinco	presente	presente	ausente	presente	ausente	Presente
Arsenic resistance	Operon repressor de resistência arsênica	presente	ausente	ausente	presente	ausente	Presente
Resistência à Cobalto-zinco-cádmio	Sistema de efluxo Co/Zn/Cd	presente	ausente	ausente	presente	ausente	Ausente
Homeostase de cobre	Cobre chaperone	presente	ausente	ausente	presente	presente	Presente

Sistema	Objetivo	<i>Desulfovibrio sp Fe33</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans G20</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio magneticus</i>	<i>Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771</i>	<i>Desulfococcus oleovorans Hxd3</i>
Homeostase de cobre	Transportador de resistência multidrogas da família Bcr/CflA	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	Ausente
Resistência relacionada ao cobre	Proteína de resistência ao cromato ChrB	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	Ausente
Mercúrio reductase	Íon reductase de Mercúrio (EC 1.16.1.1)	ausente	ausente	ausente	presente	ausente	Ausente
Resistência ao zinco	Proteína associada de resistência ao Zinco	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	Ausente
Resistência ao cádmio	Proteína acessória para Sistema de efluxo de Cádmio	ausente	ausente	ausente	ausente	presente	Ausente
Resistência ao cádmio	ATPase transportadora de Cádmio (EC 3.6.3.3)	ausente	ausente	ausente	ausente	Presente	Ausente
Resistência à Cobalto-zinco-cádmio	Regulador Transcricional, família MerR	ausente	Ausente	ausente	ausente	Presente	Presente

5.6. DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram como a toxicidade dos metais afeta a atividade de BRS, diminuindo assim sua capacidade de remediação. O presente estudo demonstrou um forte efeito de todos os metais testados na atividade metabólica das BRS, demonstrado através da diminuição na redução de sulfato (Figura 47). Um estudo de Guo *et al.* (2017) teve como objetivo desenvolver um efluente sintético com altas concentrações de Cr^{6+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} e ele observou que havia uma diminuição na eficiência de remoção de sulfato com o aumento das concentrações de metais. Demonstrando assim que metais afetam a capacidade de biorremediação desses microrganismos.

Por isso, a busca por BRS resistentes, que apresentam capacidade de desenvolver alta taxa metabólica mesmo na presença de altas concentrações de metais se torna de extrema importância.

A cepa isolada pertence ao gênero *Desulfovibrio*. *Desulfovibrio* sp é um gênero de BRS muito estudado. Existem trabalhos demonstrando sua aplicação em diversos tratamentos de efluentes contaminados (SAHINKAYA *et al.*, 2015; KOUSI *et al.*, 2015;

HUSSAIN *et al.*, 2016). Sahinkaya *et al.* (2015) relataram remoção de sulfato em amostras de drenagem ácida de minas contendo As, Cu, Fe, Ni e Zn em um reator (up-flow sludge blanket reactor) em condição anaeróbia. O biorreator foi operado por 500 dias com etanol como fonte de carbono e doador de elétron. A eficiência na remoção de sulfato foi de 99% com uma remoção de metais de 98-100% para As e 99% para Cu, Fe, Ni e Zn. As espécies redutoras de sulfato identificadas na coluna do reator foram *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfomicrobium baculatum*.

Entretanto, diversos trabalhos mostram que sua atividade fica restrita a certas faixas de concentração inicial de metais (SANI *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2006; BINISH *et al.*, 2015), como pode ser visualizado nas tabelas de 13 a 16. A cepa isolada no presente estudo foi capaz de crescer em faixas com concentrações significativas de metais, demonstrando um alto potencial para usos futuros.

O longo tempo de exposição a metais pode favorecer o desenvolvimento de mecanismos de resistência eficientes. Outros estudos confirmam que em áreas onde existem maior tempo de exposição são encontradas microrganismos mais resistentes (YAO *et al.*, 2017). Um estudo de Chen *et al.* (2018) demonstrou em áreas que foram expostas por longo tempo à contaminação por diversos metais (Hg, Pb, Cu, As, Zn, Cd e Cr), apresentavam uma quantidade significativamente maior de genes de resistência envolvidos no efluxo de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e na redução de mercúrio.

O sequenciamento do genoma é capaz de revelar a presença de genes envolvidos em diversos mecanismos de resistência. Zinco foi o metal em que a cepa isolada apresentou maior resistência, e seu genoma revelou vários genes envolvidos nessa resistência, por exemplo, o gene de proteínas associadas a resistência ao zinco (ZraP). Essas proteínas são metalo-chaperonas de ligação a Zn^{2+} produzidas apenas quando as células estão na presença de altas concentrações de Zn^{2+} ou Pb^{2+} (NOLL *et al.*, 1998; LEONHARTSBERGER *et al.*, 2001). O ZraP é uma proteína associada à membrana que sofre uma clivagem induzida por Zn^{2+} para liberar 12 kDa de ligação carboxi terminal ao Zn^{2+} na região do periplasma (NOLL *et al.*, 1998). O papel real dessas metalo-chaperonas ainda não é muito compreendido, sua função pode ser sequestrar metais tóxicos para proteger proteínas periplásmicas e transmembranares ou eles podem cooperar com outras proteínas de resistência a metais transferindo íons metálicos para desintoxicação (HYNNINEN, 2010).

Cádmio apresentou-se como um metal mais tóxico à cepa isolada. Tem sido reportado que Cd^{2+} se liga a grupos tiol (NIES, 2003), induz estresse oxidativo

(BANJERDKIJ *et al.*, 2005) e também inibe o processo de reparação de DNA, resultando em elevado grau de mutação (JIN *et al.*, 2003). O principal determinante par as células bacterianas serem resistentes ao estresse causado pelo Cd^{2+} são os sistemas de efluxo (BRAZ & MARQUES, 2005). Bactérias gram-negativas (como *Desulfovibrio*) exibem pelo menos 3 famílias de proteínas transportadoras de membrana que estão envolvidos na expulsão de metais para fora da célula: ATPases tipo P, facilitador de difusão de cátion e a família Resistência-Nodulação-Divisão celular (RND) (BRAZ & MARQUES, 2005; JIN *et al.*, 2003; BANJERDKIJ *et al.*, 2005). Foram observados na cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 genes pertencentes a essas famílias.

A cepa isolada apresentou elevada resistência à Cobre também. A cepa isolada obteve crescimento em uma concentração inicial de Cu de 0,6 mM enquanto que a média de concentração tóxica de Cu encontra para outras BRS foi de 0,36 mM (Tabela 18). O Cu é um micronutriente requerido como co-fator de várias proteínas. Essa molécula participa de reações redox como transporte de elétrons, respiração oxidativa, denitrificação, entre outras (ARGÜELLO *et al.*, 2013). Dessa maneira, as células precisam suprir essas proteínas com esses íons de Cu, por exemplo através da compartimentalização através de transportes pela membrana (ARGÜELLO *et al.*, 2012). Mas, da mesma forma, a célula precisa manter a homeostase do Cu através da quelação de moléculas com alta afinidade com o Cu, que se ligam a ele, evitando que o Cu ultrapasse níveis seguros à célula. Esse mecanismo é de extrema importância uma vez que o Cu pode participar de reações deletérias, como a produção de radicais oxigênio altamente reativos e interferência em grupos de proteínas Fe-S (MACOMBER & IMLAY, 2009; DUPONT *et al.*, 2011). Os genes responsáveis por esses mecanismos foram encontrados no genoma da cepa isolada (tabela 18).

O cromo pode existir em dois diferentes íons: Cr (VI) ou Cr (III). Cr (VI), na sua maioria em pH neutros ou alcalinos na forma de CrO_4^{2-} , são carcinogênicos e mutagênicos aos microrganismos (GANGULI & TRIPATHI, 1999). Já o Cr (III), na sua maioria aparece na forma de $\text{Cr}(\text{OH})_3$, em pH neutros são 100 vezes menos tóxicos e 1000 vezes menos mutagênicos que sua forma hexavalente, devido principalmente a sua solubilidade. Portanto, muitos microrganismos para tolerar a toxicidade do Cr são capazes de reduzir Cr (VI) à Cr (III) (KIM *et al.*, 2001).

Em condições anaeróbias, várias espécies de *Desulfovibrio* são capazes de realizar esse processo de transformação do Cr devido à similaridade da estrutura do CrO_4^{2-} ao SO_4^{2-} (ambos têm 4 oxigênios em arranjo tetraédrico e duas cargas negativas). Dessa

maneira, essas BRS reduzem Cr (VI) a Cr (III) diretamente através de seus citocromos (BARRERA-DÍAZ *et al.*, 2012).

As cromo-redutases são as enzimas capazes de catalisar esse processo e podem ser codificadas pelos genes: ChrR, YieF, NemA e LpDH, geralmente presentes em bactérias resistentes à Cr (BALDIRIS *et al.*, 2018). Na cepa identificada foi encontrado o gene LpDH que pode ser o responsável por essa resistência.

A presença desses genes e dessa capacidade de redução em BRS são de grande importância do ponto de vista biotecnológico. Muitas atividades, como galvanoplastia, curtumes e mineração, acabam gerando efluentes ricos em sulfato e cromo. Dessa maneira, BRS resistentes ao Cr seriam capazes de diminuir o teor dessas duas substâncias do efluente, realizando assim seu tratamento (QIAN *et al.*, 2016).

Ainda vale ressaltar a importância do isolamento de uma nova espécie proveniente de amostras ambientais brasileiras. No Brasil existem poucos grupos de pesquisa que tem como o objetivo o isolamento de BRS, em grande parte devido a essa dificuldade de trabalhar com microrganismos com crescimento fastidioso e que não crescem na presença de oxigênio. Dessa maneira, são poucos trabalhos que apresentam sucesso no isolamento de representantes desse grupo. Warthmann *et al.* (2005) isolou uma nova espécie, *Desulfovibrio brasiliensis*, de sedimentos da Lagoa Vermelha, uma lagoa hipersalina no estado do Rio de Janeiro. Rampinelli *et al.* (2007) também desenvolveu um trabalho realizando o isolamento e caracterização de bactérias redutoras de sulfato, e conseguir isolar a espécie *Desulfovibrio fructosovorans*. Além desses, não foi encontrado nenhum outro trabalho publicado com isolamento e identificação de BRS isoladas de amostras brasileiras.

O Brasil é um país mega diverso com um potencial muito grande para serem encontrados microrganismos com características importantes para diversas aplicações biotecnológicas (MMA, 2017). É preciso aumentar esforços para isolar novas espécies para assim, além de conhecer a microbiota presente em diversas amostras ambientais no Brasil, também ter acesso a novas moléculas, novas rotas metabólicas ou novas características genéticas que possam ajudar a solucionar problemas nos mais diversos campos. O presente trabalho consegue trazer uma nova espécie de BRS, o que indica o potencial no Brasil como fonte de novas espécies.

5.7. CONCLUSÃO

Foi isolada a cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, uma nova espécie do gênero *Desulfovibrio* altamente resistente aos metais testados. Especialmente em relação ao Zn a cepa foi capaz de resistir a concentrações bem mais altas comparativamente a outras espécies de bactérias redutoras de sulfato. O mesmo aconteceu para cromo, cádmio e cobre. A análise do genoma demonstrou alguns genes envolvidos nessa resistência. A resistência ao Zn se deve principalmente a classes de genes de proteínas associadas a resistência ao zinco (ZraP). Para Cd 3 classes de genes estão envolvidas na sobrevivência dessa cepa na presença desse metal: ATPases tipo P, facilitador de difusão de cátion e a família Resistência-Nodulação-Divisão celular (RND). Já em relação à resistência ao Cu, o principal grupo de genes envolvidos nessa resistência são aqueles que promovem a homeostase do cobre, uma vez que esse metal é essencial à célula mas seus níveis precisam ser controlados pois podem ser tóxicos à célula quando em maiores concentrações. A presença desse alto nível de resistência e o conhecimento dos seus mecanismos em bactérias redutoras de sulfato é de extrema importância para o uso biotecnológico dessas cepas principalmente no tratamento de efluente. BRS resistentes a metais são capazes de fazer a precipitação de metais, facilitando sua remoção, em efluentes que apresentam alta concentração inicial de metais. Essa característica pode aumentar a eficiência no tratamento de efluentes contaminados com metais. Ainda vale ressaltar que o Brasil, por suas características ambientais, apresenta uma grande diversidade de microrganismo ainda não estudados. Dessa maneira, esforços para isolamento de novas espécies e contribuições para o conhecimento da microbiota nos mais diversos ambientes se torna cada vez mais importante.

CAPÍTULO 6

CARACTERIZAÇÃO DA *Desulfovibrio* sp Fe33– UMA BACTÉRIA REDUTORA DE SULFATO RESISTENTE A METAIS

6.1. RESUMO

As bactérias redutoras de sulfato compreendem o maior grupo de bactérias anaeróbias. Elas têm uma aplicação biotecnológica importante devido sua capacidade de redução de sulfato e precipitação de metais. É muito importante o conhecimento de espécies desse gênero, especialmente no Brasil, onde existe uma grande diversidade ainda pouco explorada. Dessa maneira, o objetivo desse capítulo foi caracterizar uma nova espécie de *Desulfovibrio* representado pela cepa *Desulfovibrio* sp Fe33. A cepa isolada apresenta rápido crescimento, em uma média de 3 dias. A temperatura ótima para seu crescimento está entre 30-40°C. Assim como a maioria das bactérias redutoras de sulfato, o pH neutro é o pH que otimiza seu crescimento. Por ter sido isolada em ambiente marinho, a cepa Fe33 não cresce bem com 0% de NaCl, sendo assim, seu crescimento ótimo acontece com a porcentagem de 1,5% de sal. Além do sulfato, essa bactéria pode utilizar outros aceptores de elétrons, como: sulfito, tiosulfato, arsenato, nitrato e fumarato. *Desulfovibrio* sp Fe33 também pode utilizar diversos tipos de doadores de elétrons como lactato, acetato, glicose, etanol, piruvato, glicerol, glucose e frutose. Portanto a cepa isolada apresenta-se bem versátil e de fácil crescimento em laboratório, sendo possível seu uso em futuras aplicações biotecnológicas.

6.2. ABSTRACT

Sulfate-reducing bacteria are a large group of anaerobic bacteria. They have an important biotechnological application due to their sulfate reduction and metal precipitation capabilities. The knowledge of species of this group is very important, especially in Brazil, where there is a great diversity still little explored. Thus, the purpose of this chapter was to characterize a new species of *Desulfovibrio* represented by the *Desulfovibrio* sp Fe33 strain. The isolated strain presents rapid growth in an average of 3 days. The optimum temperature for its growth is between 30-40 ° C. Like most sulfate-reducing bacteria, neutral pH is the pH that optimizes their growth. Because it has been isolated in a marine environment, the Fe33 strain does not grow well with 0% NaCl, so its optimum growth happens with 1.5% salt. In addition to sulfate, this strain may use other electron acceptors such as sulfite, thiosulfate, arsenate, nitrate and fumarate. *Desulfovibrio* sp Fe33 may also utilize various types of electron donors such as lactate, acetate, glucose, ethanol, pyruvate, glycerol, glucose and fructose. Therefore, the isolated strain is very versatile and easy to grow in the laboratory, being possible its use in future biotechnological applications.

6.3.INTRODUÇÃO

Desulfovibrio sp é uma *Deltaproteobacteria* que pertence à família *Desulfovibrionaceae*. Apresenta-se como um bacilo Gram-negativo anaeróbio, não fermentador, redutor de sulfato, caracterizado pela presença de um pigmento, a dessulfovirdina, que fluoresce vermelho em pH alcalino e azul esverdeado em pH ácido. É característico por apresenar um forte odor de enxofre em meio caldo, devido a produção de sulfeto. Foi um dos primeiros gêneros descritos e é o gênero mais estudado entre as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (MADIGAN & MARTINKO, 2005).

As BRS apresentam importância numérica e funcional em muitos ecossistemas, incluindo sedimentos marinhos, ambientes poluídos, tais como plantas de tratamento anaeróbias, locais de extração de petróleo, campos de arroz e fontes hidrotermais profundas (MUYZER & STAMS, 2008; OLLIVIER *et al.*, 2007; RABUS *et al.*, 2006).

As BRS estão presentes em quase todos os ecossistemas do planeta. Nestes ecossistemas, as BRS tem que lidar com condições físico-químicas drásticas (por exemplo, alta pressão e temperatura, baixo pH). Dessa maneira, esse grupo apresenta um metabolismo versátil que, por exemplo, contribui para a completa oxidação de matéria orgânica em diversos ambientes, mesmo nos mais hostis (BARTON & FOUQUE, 2009). Dessa maneira, seu metablismo pode ser explorado para tratamento de efluentes e outras aplicações biotecnológicas já discutidas anteriormente.

No Brasil, existem poucas espécies descritas e poucos grupos de pesquisas trabalhando no isolamento de bactérias anaeróbias estritas, especialmente do grupo de redutoras de sulfato. Esse fator se deve, principalmente, devido à dificuldade no isolamento de bactérias anaeróbias que necessitam de tecnologias específicas para evitar a entrada de oxigênio durante seu cultivo.

Grande parte dos estudos desse grupo de microrganismos no Brasil está relacionado a sua capacidade de bio corrosão de canos industriais, principalmente na indústria de petróleo (SOUZA *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2006; HEGGENDORN *et al.*, 2018). Ou ainda estudos que caracterizam comunidades de BRS no ambiente através de métodos independentes de cultivo (VARON-LOPEZ *et al.*, 2013).

Em contrapartida, bactérias redutoras de sulfato, como já foram descritas em capítulos anteriores, tem uma fisiologia única e apresentam aplicações extremamente relevantes para o tratamento de resíduos contaminados por metais, sulfato ou que tenham pH extremamente baixo. Isso tudo por serem capazes de reduzir sulfato, produzir sulfetos

que se ligam aos metais e provocam sua precipitação e também por tornarem seu meio mais alcalino devido a utilização de íons H^+ nesse processo (BAI *et al.*, 2013). Portanto o isolamento e a caracterização de cepas pertencentes a esse grupo são muito importantes para facilitar a utilização desses microrganismos em processos de biorremediação.

No capítulo anterior foi discutido o isolamento de uma espécie de BRS que tem um potencial para aplicações futuras em processos biotecnológicos. Dessa maneira, o objetivo desse capítulo foi caracterizar a nova espécie *Desulfovibrio* sp Fe33, identificada no capítulo 5. Conhecendo-se suas principais características e exigências para crescimento fica muito mais fácil e eficiente os estudos para aplicações futuras dessa cepa.

6.4. MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1. Caracterização morfológica e bioquímica

A caracterização morfológica foi feita através da visualização da cultura pura em microscópio de luz em aumento de 1000x. Para a caracterização bioquímica a cepa identificada utilizou-se do kit de teste de bioquímica API® 20A (Biomérieux) de acordo com as instruções do fabricante. Foram feitas determinações morfológicas para identificar o tipo de bactéria (gram positiva ou negativa) e formação de esporos, além dos testes de catalase, urease e glucase.

6.4.2. Caracterização fisiológica

Para caracterização da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, foi utilizado o mesmo meio de cultura descrito na seção 5.4.3 do capítulo 5 (STAMS *et al.*, 1993). Para a determinação da faixa de temperatura em que a cepa era capaz de crescer foram inoculadas 0,5 mL de uma cultura estoque em tubos Hungate contendo 5 mL do meio de cultura. Os tubos foram incubados, em triplicata, nas seguintes temperaturas: 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C.

Para determinação da faixa de pH, a cepa também foi inoculada em tubos Hungate contendo o mesmo meio de cultura, mas com pH ajustado com HCl ou NaOH, para obtenção dos pHs: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0.

Para determinação da faixa de salinidade ideal para o crescimento, a cepa foi inoculada em tubos Hungate contendo 5mL do mesmo meio de cultura, mas cada tubo foi

adicionado NaCl para obtenção de porcentagens finais de salinidade de: 0, 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o crescimento foi monitorado através de medição de densidade óptica, com auxílio de densímetro celular BIOCHROM WPA C08000®.

Para determinação dos doadores de elétrons utilizados pela cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, foram testados os seguintes compostos: H₂/CO₂, acetato (10 mM), piruvato (20 mM), glicerol (10 mM), propionato (10 mM), lactato (20 mM), fumarato (10 mM), succinato (10 mM), malato (10mM), N-Butirato (10 mM), valerato (10 mM), citrato (10 mM), benzoato (10 mM), metanol (20 mM), etanol (20m M), N-Butanol (20 mM), propanol (20 mM), isobutirato (20 mM), glucose (20 mM), frutose (20 mM), maltose (20 mM) e xilose (20 mM). Para todos esses experimentos foi utilizado sulfato como acceptor final de elétrons. O monitoramento do crescimento foi feito através da análise da concentração do sulfato utilizando um Cromatógrafo de íons Dionex ICS-1000 equipado com uma coluna IonPac AS22 e com carbonato 4,5 mM-1,4 mM bicarbonato a um caudal de 1,2 mL min⁻¹ (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). A análise da utilização de cada um dos compostos foi realizada através da determinação de cada um dos compostos por um Cromatógrafo líquido de alta eficiência (“High-performance Liquid Chromatograph”-HPLC) LKB com coluna Varian Metacarb 67H 300 mm e H₂SO₄ 0,01 N com vazão de 0,8 mL min⁻¹.

Para análise de fermentação com diferentes substratos, foi feito meio de cultura sem nenhuma fonte de sulfato. Foram testados os seguintes substratos: lactato, metanol, piruvato, fumarato, etanol e cisteína. O monitoramento do crescimento e a confirmação da utilização dos compostos foi feita através da análise da utilização de cada um dos compostos, através da determinação de cada um dos compostos por HPLC.

Também foram testados diferentes aceptores finais de elétrons: sulfato, enxofre, sulfito, tiosulfato, Fe (III), arsenato, nitrato, nitrito e fumarato. Para esses experimentos foi utilizado lactato com fonte de carbono e doador de elétrons. A utilização desses compostos foi monitorada através da análise das respectivas concentrações com utilização do cromatógrafo de íons (Dionex).

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Desulfovibrio* tradicionalmente são representados por organismos com formato arredondado, com motilidade, sem formação de esporos, gram negativos e com um tamanho médio de 0,7 μm (DEVEREUX *et al.*, 1990). Pertencem ao heterogêneo grupo de bactérias redutoras de sulfato e já foram descritas mais de 30 espécies (GOLDSTEIN *et al.*, 2003). As mesmas características foram observadas na espécie isolada, *Desulfovibrio* sp Fe33 consiste em uma bactéria de formato arredondado de tamanho pequeno (Figura 59). É gram-negativa, catalase negativa, oxidase negativa e urease negativa.

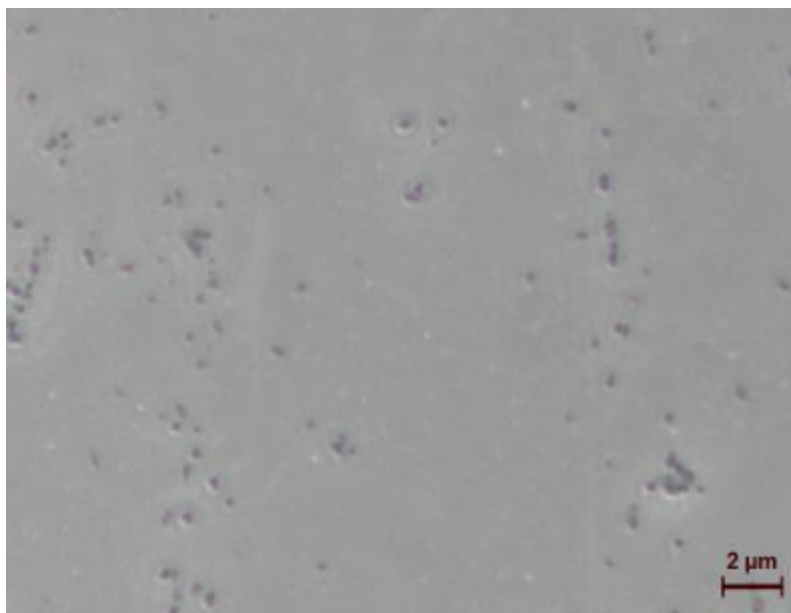


Figura 59 – Imagem da cultura de *Desulfovibrio* sp Fe33 sob microscópio de luz em aumento de 100x.

O crescimento celular para o grupo de BRS é relativamente lento (cerca de, no mínimo, uma semana sob condições ideais), visto que o metabolismo quimioautotrófico é mais fastidioso do que o heterotrófico (KANTACHOTE & INNUWAT, 2004). Alguns gêneros podem levar meses para se desenvolver, como a *Desulfurella amilsii* (FLORENTINO *et al.*, 2019). A cepa Fe33 apresenta um crescimento rápido comparando com outros representantes desse grupo, sendo capaz de crescer em 60 h e consumir todo seu substrato em 90 h.

O gênero *Desulfovibrio* não é capaz de fazer a conversão completa de lactato à CO_2 , portanto o lactato consumido é convertido em acetato, na proporção de 1 para 1,

como pode ser visualizado na figura 60. Nesse caso, o lactato é oxidado parcialmente a acetato e CO_2 e os elétrons são transportados por enzimas até a membrana celular e então para enzimas responsáveis pela redução do SO_4^{2-} no citoplasma (SANCHÈZ-ANDREA *et al.*, 2013). A equação geral pode ser observada a seguir (Equação 5).

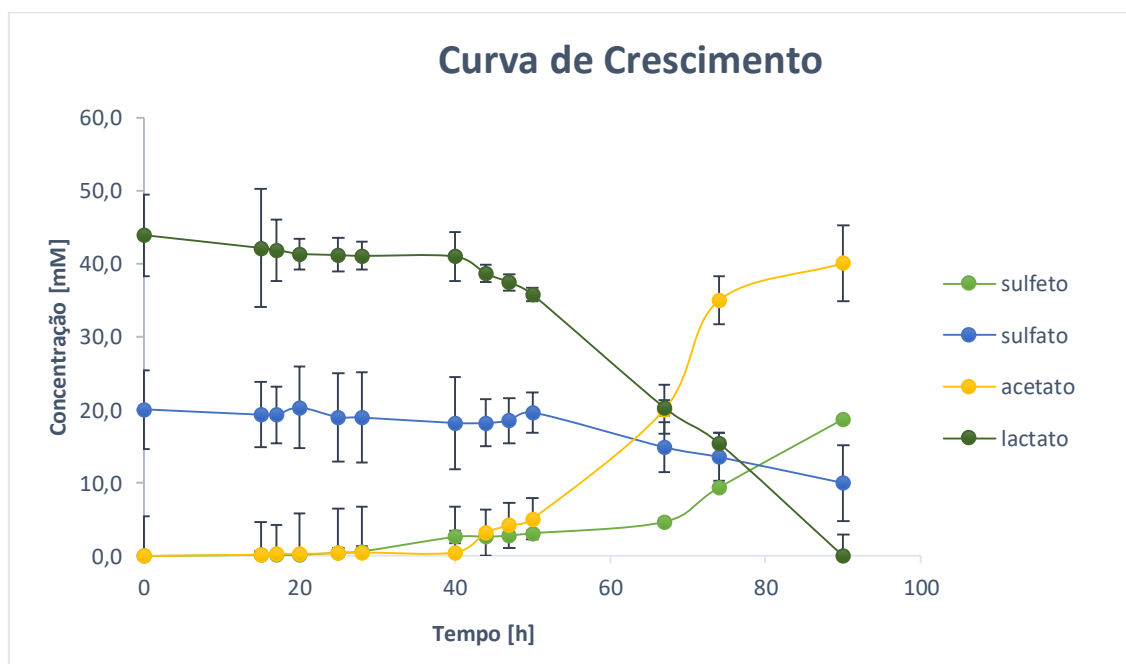


Figura 60 – Curva de crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, com o consumo de sulfato e lactato e produção de sulfeto e acetato.

Em relação as suas capacidades metabólicas essa nova espécie foi comparada com as espécies mais próximas também pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* (Tabela 20). É possível observar que essa BRS é capaz de crescer usando como doador de elétrons fontes inorgânicas como H_2/CO_2 , substratos orgânicos como lactato, acetato, piruvato, fumarato, glicerol, propionato, succinato, malato, N-butirato, citrato e benzoato. Também é capaz de usar alguns álcoois como etanol, metanol, N-butanol e propanol, além de açúcares como glucose, frutose, maltose e xilose.

Sua versatilidade também permite que essa bactéria seja capaz de, na ausência de sulfato, realizar um metabolismo fermentativo, utilizando piruvato, fumarato ou cisteína como fonte de carbono.

A *Desulfovibrio* sp Fe33 pode utilizar, além do sulfato, outros compostos como aceptores finais de elétrons, são eles: enxofre, sulfito, tiosulfato, arsenato, nitrato, fumarato e FeII.

Tabela 20 – Caracterização do novo isolado *Desulfovibrio* sp Fe33, em comparação com espécies filogeneticamente mais próximas (*D. desulfuricans*, *D. dechloracetivorans*, *D. caledoniensis*).

		Novo Isolado	Espécies próximas		
		Fe33	<i>D. desulfuricans</i>	<i>D. dechloracetivorans</i>	<i>D. caledoniensis</i>
Características	Fonte do isolamento	Sedimento do Porto de Santos (Brasil)	Sedimento do fundo da Baía de Chesapeake	Lamas de maré de Palo Alto Baylands	
	Tamanho da célula		~4,0um	0,4–0,6 × 2,5–5,0	0,4–0,6 × 1,3–2,0
	Posição do endósporo	Sem esporos	Sem esporos	Sem esporos	Sem esporos
	Motilidade	Presente	Presente	Presente	Presente
	Faixa de temperatura (°C)	25-45	30-37	25-37	20–39
	Temperatura ótima (°C)	30	32	30	34-37
	Faixa de pH	6,0- 8,5	6,8-8,2	6,8-7,1	5,8–8,5
	pH ótimo	7,0	7,8	7,0	6,8–7,5
	Faixa de NaCl	0-3,5	0-3,0	0,16-2,5	0.20-1.1
	Faixa ótima de NaCl	1,5-2,0%	2,0	-	0,2-0,3
	Conteúdo de DNA G+C	61,9%	55%	61,9%	52,4%
Doadores de elétrons com sulfato					
Inorgânico	H ₂ /CO ₂	+	+	+	+
Orgânico	Acetato (10 mM)	+	-	+	+
	Piruvato (20 mM)	+++	+++	+	+
	Glicerol (10 mM)	+++	-	+	-
	Propionato	+++	NT	+	-
	Lactato (20 mM)	+++	+++	+	+
	Fumarato (10 mM)	++	++	+	+
	Succinato	+++	-	-	+
	Malato (10 mM)	+++	-	-	+
	N-Butirato (10 mM)	++	-	-	-
	Valerato	NT	NT	NT	NT
	Citrato	+++	NT	NT	NT
	Benzoato	+	NT	-	NT

		Novo Isolado	Espécies próximas		
		Fe33	<i>D. desulfuricans</i>	<i>D. dechloracetivorans</i>	<i>D. caledoniensis</i>
Álcoois	Metanol	+	NT	NT	NT
	Etanol	++	-	+	-
	N-Butanol	+	NT	+	-
	Propanol	+	NT	+	-
	Isobutirato	-	NT	NT	NT
Açúcares	Glucose	+++	NT	NT	NT
	Frutose	+++	NT	-	-
	Malotose	+	NT	NT	NT
	Xilose	+++	NT	NT	NT
Fermentação na ausência de sulfato					
	Lactato (30-60 mM)	-	-	-	-
	Metanol	-	NT	NT	NT
	Piruvato (30-60 mM)	+++	+	NT	NT
	Fumarato (30-60 mM)	+	+	+	+
	Etanol (30-60 mM)	-	-	NT	NT
	Cisteína	+	-	NT	NT
Aceptores de elétrons com lactato					
	Sulfato (20mM)	+++	+	+	NT
	Enxofre (10 mM)	-	-	-	NT
	Sulfito (50 mM)	+	+	+	NT
	Tiosulfato (20 mM)	+	+	+	NT
	Fe(III) (50mM)	-	+	NT	NT
	Arsenato	+	NT	NT	NT
	Nitrato (10 mM)	++	-	+	NT
	Nitrito	-	NT	NT	NT
	Fumarato (10 mM)	+++	-	+	NT

No ambiente essa versatilidade no uso de diferentes doadores e aceptores de elétrons é crucial. O ciclo biogeoquímico do carbono está intimamente ligado a outros ciclos como o do Fe, S, N, O, devido a essa complexa utilização de doadores e aceptores de elétrons pelas bactérias. A disponibilidade no ambiente de todos esses doadores e

aceptores de elétrons pode mudar drasticamente a composição microbiana de BRS (KWON *et al.*, 2016).

No ambiente marinho, onde a cepa Fe33 foi isolada, existe uma grande disponibilidade de sulfato, crucial para o crescimento de BRS. Esse fator, atrelado a grande capacidade do gênero *Desulfovibrio* em usar diversas substâncias como aceptoras e doadoras de elétrons, contribui com o sucesso desse grupo na mineralização da matéria orgânica no ambiente marinho. Além disso, essa versatilidade contribui para que as espécies desse gênero sejam largamente utilizadas em processos biotecnológicos (ZOUCH *et al.*, 2017).

Os processos de biorremediação que usam bactérias redutoras de sulfato podem ser aperfeiçoados com a utilização de doadores e aceptores de elétrons adequados ao grupo de microrganismos a ser utilizado, além do custo final do tratamento também ser mais viável de acordo o valor comercial de cada uma dessas substâncias (LIN & LIN, 2005). Por isso é de extrema importância o conhecimento desses fatores que influenciam no crescimento da cepa a ser utilizada.

A faixa de temperatura de crescimento da Fe33 está entre 25 e 40° (figura 61), apresentando uma faixa mais ampla do que outras espécies próximas do mesmo gênero (tabela 18). Apesar disso, a temperatura ótima para crescimento é de 30°C, que é de maneira geral a temperatura ideal para crescimento da maioria das bactérias redutoras de sulfato.

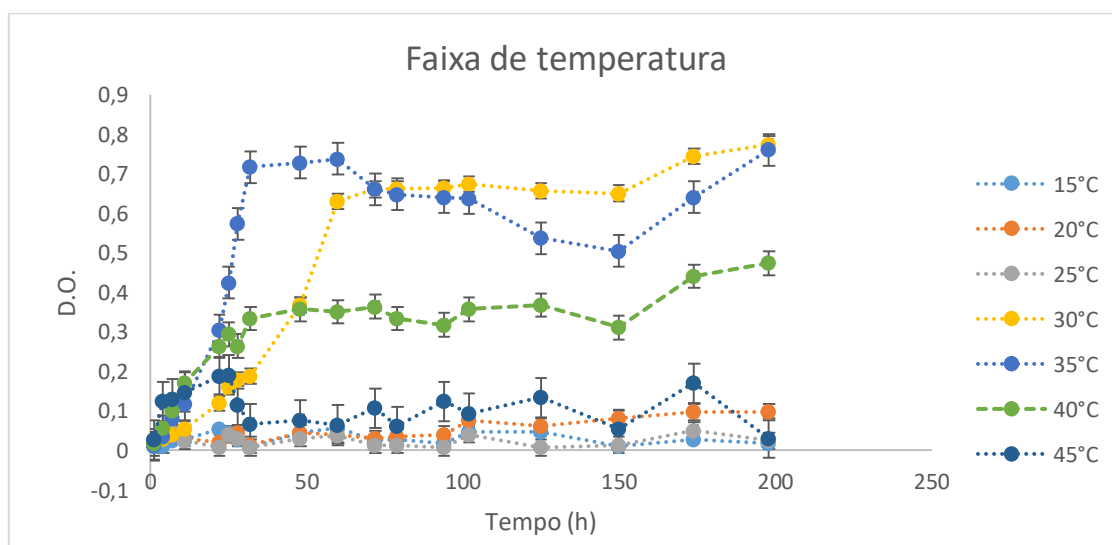


Figura 61- Curva do crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 em faixas de temperaturas que variaram de 15 a 45°C durante 200h.

A maioria das espécies redutoras de sulfato descritas são mesofílicas, entretanto, diversos estudos já identificaram espécies de BRS que tem habilidades de crescer em habitats geotermiais e fontes termais. Espécies como *Desulfotomaculum*, *Thermanaeromonas*, *Thermincola*, *Thermovenabulum* e *Moorella*, podem crescer entre 50 e 80 °C (KAKSONEN *et al.*, 2006). A bactéria isolada no presente estudo não teve crescimento significativo a partir dos 45 °C.

Da mesma maneira, existem BRS psicrófilas, que são capazes de realizar a redução de sulfato em temperaturas extremamente baixas. Por exemplo, a espécie *Desulfobacter psychrotolerans* que tem temperaturas ótimas de crescimento próximas a 10 °C (FINSTER, 2008). A cepa isolada no presente estudo já não apresentou crescimento significativo em temperaturas a partir dos 25 °C.

Sabe-se que as BRS, em sua grande maioria, se desenvolvem preferencialmente em pHs neutros (WIDDEL, 1988). Não é diferente para espécie aqui descrita. Seu pH ótimo de crescimento é 7,5 e sua faixa de pH varia de 6,0 a 8,5 (figura 62).

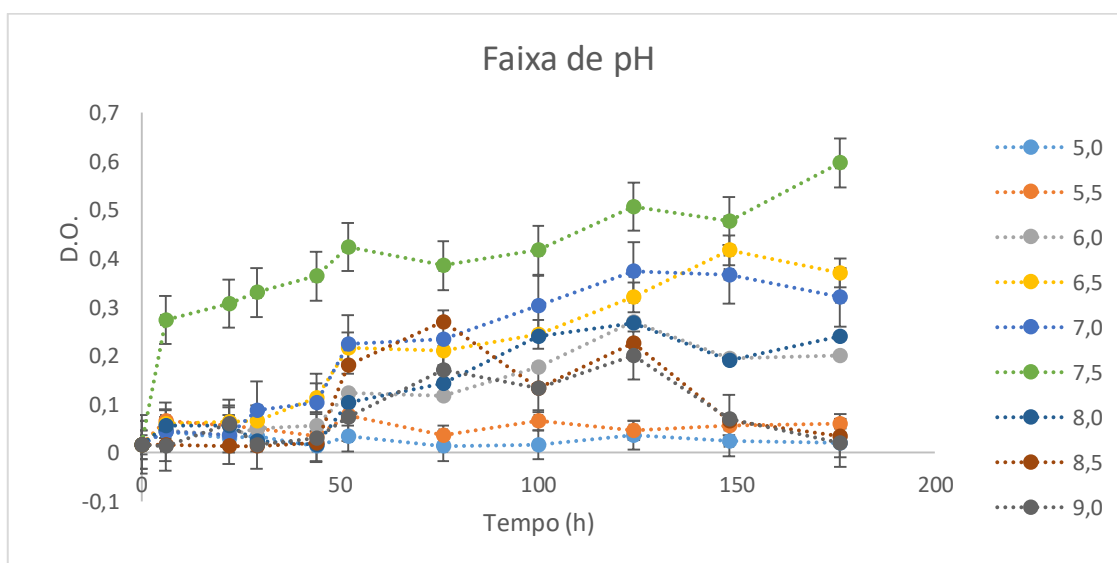


Figura 62 - Curva do crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 em diferentes condições de pH (5,0 – 9,0) durante 180h.

Apesar disso, alguns estudos já demonstraram a redução de sulfato em pH >9,5, por exemplo, *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* (ZHILINA *et al.*, 1997), *Desulfonatronospira thiodismutans* (SOROKIN *et al.*, 2008) e em pH <5,0, como por exemplo *Desulfosporosinus* spp (SANCHÈZ-ANDREA, 2013). Ambas com aplicações biotecnológicas interessantes (SOROKIN *et al.*, 2008; SANCHÈZ-ANDREA, 2013).

A cepa Fe33 foi isolada de ambiente marinho, dessa maneira se desenvolve melhor em porcentagens maiores de sal (halofílicas). O crescimento ideal dessa bactéria se deu em meios de cultura contendo 1,5% de NaCl. Já a faixa de crescimento se deu de 0 a 3% (figura 63).

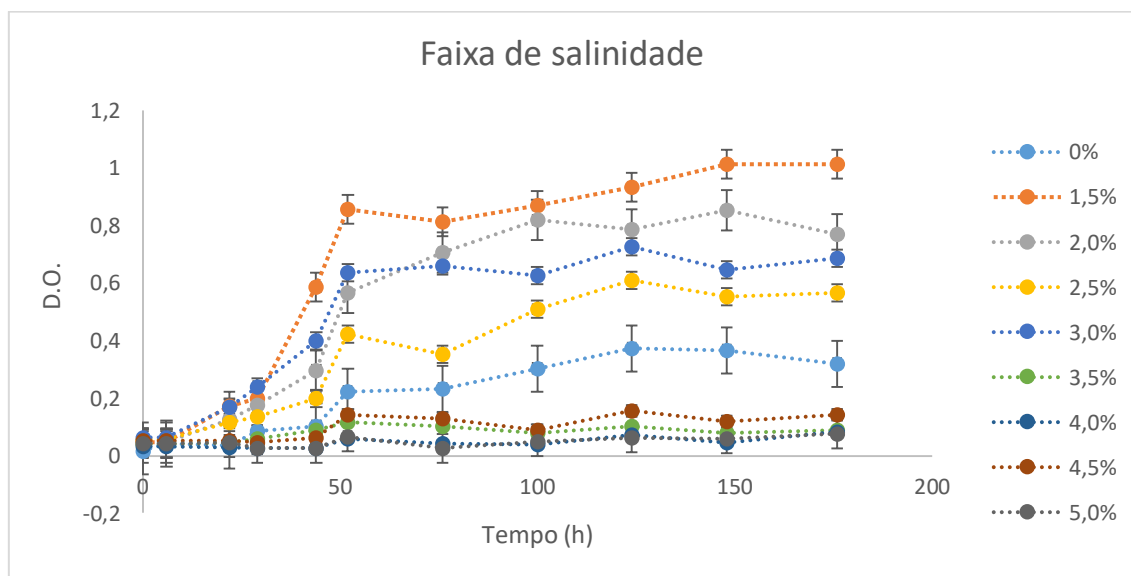


Figura 63 - Curva do crescimento da cepa *Desulfovibrio* sp Fe33 em faixas de salinidade que variaram de 0 à 5% durante 180h.

Em ambientes marinhos, especialmente nos sedimentos, as BRS contribuem significativamente com mineralização da matéria orgânica, podendo ser responsáveis por 50% de sua degradação (JØRGENSEN, 1982). Por serem extremamente abundantes em regiões marinhas, não é incomum encontrar BRS que tenham crescimento ótimo em meios salinos.

Vale ressaltar, a importância da caracterização de cepas isoladas, principalmente daquelas com potencial para uso em processos biotecnológicos. Conhecer as características e o comportamento de cada cepa (como pH, temperatura e salinidade ótimas para seu crescimento) permite a otimização desses processos, tornando-os, dessa maneira, mais eficientes e com maior potencial de sucesso (MUZZUCOTELLI *et al.*, 2013).

6.6. CONCLUSÃO

A cepa *Desulfovibrio* sp Fe33, apresenta crescimento rápido e fácil em laboratório. Como a maioria das BRS, não apresenta bom crescimento em pH ácido. Seu crescimento ótimo ocorre em temperaturas entre 30 e 40°C, sendo mesófila, também

como todas outras espécies do gênero. Apresenta grande versatilidade de crescimento pois usa diversos tipos de aceptores e doadores de elétrons, além de também usar o metabolismo fermentativo na ausência de sulfato. Outra grande vantagem dessa cepa é que ela apresenta rápido crescimento, principalmente quando comparado com o tempo de crescimento de outras anaeróbias, as quais podem demorar meses para se desenvolver. Essa versatilidade torna o manuseio dessa cepa fácil e facilita sua aplicação em futuros estudos biotecnológicos.

CAPÍTULO 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ambiente marinho sofre inúmeras pressões antrópicas e uma das mais sérias é aquela gerada por metais liberados no ambiente devido a uma série de atividades ligadas especialmente à indústria.

Áreas portuárias realmente são áreas onde existe um acúmulo maior desse tipo de poluente. Tanto que nas duas áreas portuárias escolhidas foram observadas concentrações de metais significativamente maiores quando comparada a área pristina.

Foi observado que os metais causam alterações significativas na comunidade microbiana, tanto em relação à estrutura: em que táxons diferentes são encontrados em maior ou menor abundância devido à presença desses metais; quanto na diversidade de espécies.

As análises de correlação e multiavariadas sugerem que alguns grupos como *Thermomonosporaceae*, *Thermodesulfovibrionaceae*, *Desulfovibrionaceae* e *Rhodobacteraceae* podem ser encontrados em maior abundância as áreas portuária comparativamente a área pristina. O mesmo acontece com alguns importantes filos como actinobactérias, cianobactérias e termodesulfobactérias. Em contrapartida, alguns grupos foram mais sensíveis como *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* e *Saprospiraceae*; ou filo como *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Plactomyces* e tiveram uma abundância menor nas áreas portuárias.

Essas alterações podem implicar numa alteração do funcionamento do ecossistema como um todo uma vez que bactérias são fundamentais para ciclagem de nutrientes além de fazer parte de diversos ciclos biogeoquímicos.

Portanto, de acordo com a hipótese inicial, foi possível verificar que essas alterações ocorrendo em áreas portuárias. Dessa maneira, é possível afirmar que áreas portuárias devem ser monitoradas uma vez que essa poluição pode trazer riscos ao ecossistema aquático em que essas áreas estão inseridas.

O padrão de resistência da comunidade microbiana que foi exposta a essas áreas contaminadas acaba se tornando mais alto. Nessas regiões, ocorre a seleção dos microrganismos capazes de sobreviver nesse ambiente hostil através de genes capazes de

fornecer ferramentas que previnem a toxicidade dos metais a nível celular. Portanto nas áreas portuárias foi possível observar esse aumento na frequência de resistência através da porcentagem de cepas resistentes principalmente aos metais que foram encontrados em maiores concentrações no ambiente estudado.

Além disso, os sedimentos dessas áreas foram importantes para o estudo de bactérias redutoras de sulfato com resistência a metais. As áreas marinhas são fontes interessantes para o estudo de BRS por apresentarem componentes importantes para seu crescimento, como alto teor de sulfato e matéria orgânica. Portanto nessas áreas a comunidade de BRS é fundamental na ciclagem dessa matéria orgânica.

No caso do presente trabalho, devido as áreas portuárias escolhidas serem cronicamente contaminadas por esse tipo de poluição, a comunidade acabou tendo que se adaptar a toxicidade gerada pelos metais. Essa adaptação fez com que pudesse ter sido observada uma atividade alta da comunidade de BRS nos enriquecimentos em laboratório, mesmo com concentrações iniciais altas de metais quando comparada com outros estudos.

Foi importante analisar que os metais testados apresentam toxicidade diferentes à comunidade de BRS. Dessa maneira, cada metal afeta o crescimento de BRS em diferentes níveis. Cd e Cu foram os metais que mais influenciaram na atividade de BRS.

O gênero de BRS que foi mais tolerante e conseguiu crescer em abundância mesmo em concentrações altas de metais foi o gênero *Desulfovibrio*. A abundância desse gênero permitiu que fosse isolada uma nova espécie (*Desulfovibrio* sp Fe33) altamente resistente aos metais testados e que tem um enorme potencial para ser usada no tratamento de efluentes contaminados. Isso se deve ao fato das BRS serem capazes de precipitar os metais como foi detalhadamente descrito nos capítulos anteriores, porém o mais importante é que essa nova cepa isolada é capaz de realizar essa atividade mesmo em altas concentrações iniciais de alguns metais, o que já uma vantagem extremamente grande.

Muitos mecanismos genéticos estão envolvidos nesse processo de resistência. Muitos deles ainda precisam ser estudados em detalhe para favorecer sua utilização em processos futuros. O sequenciamento completo do genoma tem sido uma ferramenta importante para estudar os genes de resistência presentes nas bactérias, uma vez que é possível analisar todos os genes que conferem vantagem em situações deste tipo de toxicidade. Esse novo método permite uma resolução melhor de análise dos genes envolvidos na resistência, permitindo mais informações sobre esse importante processo.

Vale ressaltar, a importância de, após realizar o isolamento, realizar a caracterização de cepa isolada, principalmente da cepa isolada que apresenta potencial para uso em processos biotecnológicos. Conhecer as características e o comportamento da cepa em diferentes pHs, temperaturas e salinidades permite a otimização do seu crescimento, dessa maneira tornando o uso dessa cepa em algum futuro processo mais eficiente e com maior potencial de sucesso.

A comunidade microbiana brasileira ainda precisa ser sistematicamente estudada. Existem muitos microrganismos ainda não conhecidos que podem ter alto potencial para serem utilizados em diversas aplicações biotecnológicas. O sequenciamento realizado nas diversas amostras, que mostrou uma alta quantidade de sequências não filiadas a nenhum grupo taxonômico, e a descoberta de uma nova espécie são pistas de como ainda é necessário estudo da diversidade da nossa microbiota.

A contaminação por metais gera um grave problema ambiental e os microrganismos podem ter duas funções cruciais na luta contra esse tipo de contaminação: 1) o de bioindicadores, uma vez que essa comunidade pode apresentar alterações rápidas na sua estrutura que indicam futuros danos ao ecossistema; 2) serem utilizadas para tratar efluentes, resíduos e ambientes contaminados por metais. O tratamento de efluentes é crucial para que esses metais não cheguem até o ecossistema e a utilização de BRS pode auxiliar para que isso aconteça.

Essa tese contribui com mais informações sobre níveis de tolerância a diferentes metais além de características de crescimentos específicas de uma espécie de *Desulfovibrio*, isso facilita a aplicação desse grupo de bactérias em processos de tratamento. Esses seriam os primeiros passos para assim tentar escalonar esses processos até que seja possível a utilização desses microrganismos em escalas maiores, fazendo então o tratamento de resíduos e efluentes na prática.

Por fim, foi possível verificar como bactérias podem fornecer informações importantes sobre o ambiente e como a alteração da sua comunidade pode trazer prejuízos para o ecossistema como um todo. Entretanto, através do estudo dessas alterações e do conhecimento da fisiologia de diferentes grupos é possível utilizar esses microrganismos como ferramenta de soluções de problemas ambientais graves.

8. REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, S., RAOUFI, Z., FAGHIRI, I., SAVARI, A., NIKPOUR, Y., & MANSOURI, A. Contamination levels and spatial distributions of heavy metals and PAHs in surface sediment of Imam Khomeini Port, Persian Gulf, Iran. *Marine Pollution Bulletin*, v. 71, p. 336–345, 2013. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.025
- ABESSA, D.M.S.; CARR, R.S.; SOUZA, E.C.P.M.; RACHID, B.R.; ZARONI, L.P.; GASPARRO, M.; PINTO, Y.A.; BICERO; HORTELLANI, M.A.; SARKIS, J.E.; MUNIZ, P. Integrative ecotoxicological assessment of contaminated sediments in a complex tropical estuarine system. In: Hoffer, T.N. (Ed). *Marine Pollution: New Research*. New York: Nova Science Publishers Inc, 2008.p.125-159.
- ABESSA, D.M.; RACHID, B.R.; MOSER, G.A.; OLIVEIRA, A.J.F. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. *O Mundo da Saúde*, v. 36, n. 4, p. 643-661, 2012.
- ADORNO, M.A.T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.A. Development and Validation of two methods to quantify volatile acids (C₂-C₆) by GC-FID: Headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 5, n. 7, p. 406-414, 2014.
- ADRIANO, D.C. *Trace elements in the terrestrial environment: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. New York: Springer, 2001. 867p.
- AGER, D.; EVANS, S.; LI, H.; LILLEY, A. K.; VAN DER GAST, C. J. Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environ. Microbiol.*, v. 12, p. 670–678, 2010. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02107.x
- AHMAD, S. & YADAVA, J.N.S. Infectious mercury resistance and its co-transfer among *E. coli* strains. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 26, p. 601-605, 1988.
- AHMADI, R.; REZAEI, A.; ANVARI, M.; HOSSINI, H.; RASTEGAR, S.O. Optimization of Cr(VI) removal by sulfate-reducing bacteria using response surface methodology. *Desalin Water Treat.*, 2015.
- AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, n. 2, p. 177-182, 2007.
- ALLOWAY B.J. (1995): *Heavy Metals in Soils*. Chapman & Hall, London.
- ALMEIDA, W. I.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; SILVEIRA, C. B.; COSTA, R. G. et al. Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay. *Extremophiles*, v. 13, p. 263–271, 2009.

- AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 231-236, 2001).
- AMARAL, A.C.Z.; MIGOTTO, A.E.; TURRA, A. & SVHAEFFER-NOVELLY, Y. Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 1-47, 2010.
- AMARAL, A.C.Z.; TURRA, A.; CIOTTI, A.M.; WONGTSCHOWSKI, C.L.D.B.R.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (Eds.) Life in Araçá Bay: diversity and importance. 1. ed. São Paulo: Lume, 2016. 100 p.
- ANDREOTE FD, JIME NEZ DJ, CHAVES D, DIAS ACF, LUVIZOTTO DM, et al. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLoS ONE* 7(6): e38600, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038600
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M. Metal transport across biomembranes: emerging models for a distinct chemistry. *J. Biol. Chem.* v. 287, p. 13510–13517, 2012. doi: 10.1074/jbc.R111.319343
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, 2013. doi:10.3389/fcimb.2013.00073
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Microbial Ecology – fundamentals and applications*. Redwood city: Benjamin- Cummings Publishing Co., 1993.
- AYANGBENRO, A. S.; OLANREWAJU, O. S.; BABALOLA, O. O. Sulfate-Reducing Bacteria as an Effective Tool for Sustainable Acid Mine Bioremediation. *Front Microbiol.*, 9: 1986, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.01986
- AYDIN ONEN, S.; KUCUKSEZGIN, F.; KOCAK, F. Temporal and spatial biomonitoring of heavy metals in eastern Aegean coastal waters using Amphibalanus amphitrite. *Mar Pollut Bull*, v. 62, p. 2548–2556, 2011.
- AZABOU, S.; MECHICHI, T.; SAYADI, S. Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. *Mineral engineering*, v. 20, p. 173-178, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.08.008>
- BAARS, J. K. *Over Sulfaatreductie door Bacterien*. Dissertation, W. D. Meinema, N. V., Delft, 1930.
- BAI, H.; KANG, Y.; QUAN, H.; HAN, Y.; SUN, J.; FENG, Y. Treatment of acid mine drainage by sulfate reducing bacteria with iron in bench scale runs. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 818–822, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.070

BALDIRIS, R.; ACOSTA-TAPIA, N.; MONTES, A.; HERNÁNDEZ, J.; VIVAS-REYES, R. Reduction of Hexavalent Chromium and Detection of Chromate Reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 406, 2018. doi:10.3390/molecules23020406

BANJERDKIJ, P.; VATTANAVIBOON, P.; MONGKOLSUK, S. Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, p. 1843–1849, 2005.

BARBOSA, L. P.; BERTOLINO, S. M.; FREITAS, P. C.; OLIVEIRA, V. A.; PINA, P. D.; LEÃO, V. A.; TEIXEIRA, M. C. Effects of different COD/sulfate ratios on the growth of metal tolerant sulfate reducing bacteria (SRB). *Advanced Materials Research*, p. 71-73, p. 569-72, 2009.

BARNES, L. J.; SCHEEREN, P. J. M.; BUISMAN, C. J. N. Microbial removal of heavy metals and sulfate from contaminated groundwaters. In: MEANS, J. L.; HINCHEE, R. E., editors. *Emerging Technology for Bioremediation of Metals*. CRC Press; Boca Raton, FL, USA, Volume 2, 1994. pp. 1–160.

BARRERA-DÍAZ, C. E.; LUGO-LUGO, V.; BILYEU, B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *J Hazard Mater*, v. 15, p. 1–12, 2012.

BARTON, L. L., & FAUQUE, G. D. Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, p. 41–98, 2009. doi:10.1016/s0065-2164(09)01202-7

BHATTACHARYA, S. K.; UBEROI, V.; MADURA, R. L.; HAGHIGHI-PODEH, M. R. Effect of cobalt on methanogenesis. *Environ. Technol.*, v. 16, p. 271. 1995.

BERTOLINO, S.M.; RODRIGUES, I.C.B.; GUERRA-SÁ, R.; AQUINO, S.F.; LEÃO, V.A. Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. *J Environ Manage*, v.103, p.15.23, 2012.

BIJMANS, M. F. M.; BUISMAN, C. J. N.; MEULEPAS, R. J. W.; LENS P. N. L. Sulfate reduction for inorganic waste and process water treatment. In: *Comprehensive Biotechnology Murray M-Y* (ed.). 2nd edn, Academic Press, Burlington, pp. 435-46, 2011.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol*, v. 63, p. 2647–2653, 1997.

BUTLIN, K. R., ADAMS, M. E., THOMAS, M. The isolation and cultivation of sulfate-reducing bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, v. 3, p. 46–59, 1949.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem

como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, p. 1 - 23. Available from: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Access in: 21 Nov. 2012.

BRATKOVA, S.; KOUMANOVA, B.; BESCHKOV, V. Biological treatment of mining wastewaters by fixed-bed bioreactors at high organic loading. *Bioresour. Technol.*, v. 137, p. 409–413, 2013. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.177.

BRAZ, V. S.; MARQUES, M. V. Genes involved in cádmium resistance in *Caulobacter crescentus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 251, p. 289-295, 2005 <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.013>

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A. et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol*, v. 157, p. 752–762, 2006.

BROOKS, B.; MUELLER, R. S.; YOUNG, J. C.; MOROWITZ, M. J.; HETTICH, R. L.; BANFIELD, J. F. Strain-resolved microbial community proteomics reveals simultaneous aerobic and anaerobic function during gastrointestinal tract colonization of a preterm infant. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 654, 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.00654

BRUCE, T.; DE CASTRO, A., KRUGER, R., THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L. (2012) Microbial diversity of Brazilian Biomes. In: Nelson KE, Jones-Nelson B (eds) *Genomics applications for the developing world*. Springer, Berlin, pp 217–247

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

BRUSCHI, M.; GOULHEN, F. New bioremediation technologies to remove heavy metals and radionuclides using Fe(III), sulfate- and sulfur- reducing bacteria. In: S.N. SINGH; R.D. TRIPATHI (Ed.). *Enviromental Bioremediation Technologies*. New York: Springer, 2007. p. 35-56.

BEIJERINCK, W. M. uber *Spirillum desulfuicans* als Ursache von Sulfatreduktion. *Zbl. Bakt. (2. Abt.)*, 1, 1, 49, 104, 1895.

BURUAEM, L. M.; HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ABESSA, D. M. S. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.64, p. 479–488, 2012.

CABRERA, G.; PEREZ, R.; GOMEZ, J.M.; ABALOS, A.; CANTERO D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *J Hazard Mater*, v.135, p.40-46, 2006.

CAMARGO, F.A.O. et al. Uso de microrganismos para remediação de metais. In: CERETTA, C.A.; SILVA, L.S.; REIHCEERT, J.M. (Ed.). *Tópicos especiais em Ciencia do solo*. Vicosa: Editora SBCS, 2007. V. 5, p. 468-496.

- CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Scientific Reports*, 3 : 1624. DOI: 10.1038/srep01624
- CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, v.40, n.3, p.735-744, 2010.
- CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H. et al. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Ecology*, v. 31, p. 1-9, 2000.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7, p. 335–336, 2010.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 4516–4522, 2011.
- CARVALHO, F.; VAZOLLER, R.; FORONDA, A.; PELLIZARI, V. Phylogenetic study of species in pristine and polluted aquatic samples from a tropical Atlantic Forest ecosystem. *Curr Microbiol*, v. 55, p. 288–293, 2007.
- CBH-BS. Comitê da Bacia Hidrográfica da Baixada Santista. Relatório de situação: recursos hídricos da Baixada Santista, 2011. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBH-BS/1573/rs%202011%20cbh-bs%20versao%20final.pdf>
- CETESB. Companhia De Tecnologia De Saneamento Ambiental. 2001. Sistema Estuarino Santos-São Vicente. Relatório Técnico, 178 p.
- CETESB. Companhia De Tecnologia De Saneamento Ambiental. 2018. Qualidade das águas costeiras no estado de São Paulo. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-costeiras/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Costeiras-do-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf> ; Acessado em: 13 de janeiro de 2020.
- CHISTOSERDOVA, L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 10, p. 1351–9, 2010.
- CBD, 2013. Convention on Biological Diversity. Brazil—Country profile/ Overview. <http://www.cbd.int/countries/profile/default.shtml?country=br>. Accessed 13 August 2013.
- CCME. Canadian environmental quality guidelines, National Guidelines and Standards Office. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment, 12 p., 2002.
- CHOUERI, R.B., CESAR, A., TORRES, R.J., ABESSA, D.M.S., MORAIS, R.D., PEREIRA, C.D.S., NASCIMENTO, M.R.L., MOZETO, A.A., RIBA, I., DELVALLS,

T.A. Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 72, p. 1824–1831, 2009.

CLEMENTINO, M. M.; FERNANDES, C. C.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; POLYCARPO, C. R. et al. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. *J Appl Microbiol*, v. 103, p.141–151, 2007.

CODESP. Companhia Docas do estado de São Paulo)Porto de Santos: Relatório anual 2011, 2011. Disponível em: <http://201.33.127.41/down/relatorio/Relatorio2011.pdf>

CUNHA, Í. Conflito ambiental em águas costeiras: Relação porto–cidade no Canal de São Sebastião. *Ambiente & Sociedade, São Paulo*, v. VI, n. 2, p. 83-98, jul./dez. 2003.

CURY, J. C.; ARAUJO, F. V.; COELHO-SOUZA, S. A.; PEIXOTO, R. S.; OLIVEIRA, J. A. L. et al. Microbial diversity of a Brazilian Coastal Region influenced by an upwelling system and anthropogenic activity. *PLoS One* 6:e16553, 2011.

DASH, H.R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S.; DAS S. Marine bacteria: potential candidates for 131 enhanced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 97, p. 561-571, 2013.

DDS System. Solução em automação. Portifólio. Petrobrás/Transpetro – TEBAR – Terminal Aquaviário Almirante Barroso. Disponível em: <<http://dds.pro.br/Portif%C3%B3lio---TEBAR.php>>. Acesso em: 08 de nov. de 2013.

De CASTRO, A. P.; ARAUJO, S. D.; REIS, A. M. M.; MOURA, R. L.; FRANCINI, R. B. et al. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from Eastern Brazil. *Microb Ecol*, v. 59, p. 658–667, 2010.

DEGRASSI, S. The seaport network Hamburg. 2001. Tese (Doutorado)-Universidade de Hamburgo, Hamburgo, 2001.

DELDEN, A. VAN. Beitrag zur Kenntnis der Sulfat-reduktion durch Bakterien. *Zbl. Bakt. (2. Abt.)*, 11, 31, 113, 1903.

DELL`ANNO, A.; MEI, M. L.; IANNI, C.; DANOVARO, R. Impact of bioavailable heavy metals on bacterial activities in coastal marine sediments. *World J. Microbiol. Biot.*, v. 19, p. 93-100, 2003.

DELVALLS, T.A; CONRADI, M. Avances en Ecotoxicología Marina: Comparación entre tests de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. *Ciencias Marinas*, Ensenada, v.26, n.1, p.39-64, 2000.

DETMAN, A.; MIELECKI, D.; CHOJNACKA, A.; SALAMON, A.; BLASZCZYK, M. K.; SIKORA, A. Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microb Cell Fact.* 2019. doi: 10.1186/s12934-019-1085-1

DEVEREUX, R.; HE, S. H.; DOYLE, C. L.; ORKLAND, S.; STAHL, D. A.; LEGALL, J.; WHITMAN, W. B. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology*, v. 172p. 3609-3619, 1990.

DHARIWAL, A., CHONG, J., HABIB, S., KING, I. L., AGELLON, L. B., AND XIA, J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.*, v. 45, p. 180–188, 2017. doi: 10.1093/nar/gkx295

DUFFUS, J.H. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 75, p. 1357, 2012.

DUPONT, C. L.; GRASS, G.; RENSING, C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance-new insights and applications. *Metallomics*, v. 3, p. 1109–1118, 2011. doi: 10.1039/c1mt00107h

DURISCH-KAISER E, KLAUSER L, WEHRLI B, SCHUBERT C. Evidence of intense archaeal and bacterial methanotrophic activity in the Black Sea water column. *Appl Environ Microbiol.*, v. 71, p. 8099–8106, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.12.8099-8106.2005.

ELOFSSON, K. Management of eutrophicated coastal ecosystems: a synopsis of the literature with emphasis on theory and methodology. *Ecological Economics*, v. 47, p. 1-11, 2003.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de Solo. 2 ed. rev. atual. Rio de Janeiro, 1997. 212 p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1).

FANG, H. P.; HUI, H. H. Effect of heavy metals on the methanogenic activity of starch-degrading granules. *Biotechnol Lett.*, v. 16, p. 1091–1096, 1994. doi: 10.1007/bf01022409.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 30, p. 137-145, 1999.

FEDURCO, M. et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research*, v.34, n.3, p.e22, 2006. Disponível em: . Acesso em: 5 jun. 2009. doi: 10.1093/nar/gnj023.

FINSTER, K. Anaerobic Bacteria and Archaea in Cold Ecosystems. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, p. 103–119, 2008. doi:10.1007/978-3-540-74335-4_7

FLORENTINO, A. P.; WEIJMA, J.; STAMS, A. J.; SÁNCHEZ-ANDREA, I. Sulfur reduction in acid rock drainage environments. *Environmental Science and Technology*, v. 49, p. 11746-11755, 2015.

FLORENTINO, A. P., PEREIRA, I. A. C., BOEREN, S., VAN DEN BORN, M., STAMS, A. J. M., & SÁNCHEZ-ANDREA, I. Insight into the sulfur metabolism of

Desulfurella amilsii by differential proteomics. *Environmental Microbiology*, 2018. doi:10.1111/1462-2920.14442

FONTANA, L. F.; MENDONÇA FILHO, J. G.; PEREIRA NETTO, A. D.; SABADINI-SANTOS, E.; DE FIGUEIREDO, J. R. A.G. et al. Geomicrobiology of cores from Suruí Mangrove – Guanabara Bay – Brazil. *Mar Pollut Bull*, v. 60, p. 1674–1681, 2010.

FRANK, Y. A.; KADNIKOV, V. V.; LUKINA, A. P.; BANKS, D.; BELETSKY, A. V.; MARDANOV, A. V.; RAVIN, N. V. Characterization and Genome Analysis of the First Facultatively Alkaliphilic Thermodesulfovibrio Isolated from the Deep Terrestrial Subsurface. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.02000

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 92, p. 407–418, 2011.

FUHRMAN, J. A.; SCHWALBACH, M. S.; STINGL, U. Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Microbiol*, v. 6, p. 488–494, 2008.

GALKUS, A.; JOKSAS, K.; STAKENIENE, R.; LAGUNAVICIENE, L. Heavy Metal Contamination of Harbor Bottom Sediments. *Pol. J. Environ. Stud.*, v. 21, p. 1583–1594, 2012.

GANGULI, A.; TRIPATHI, A. K. Survival and chromate reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* in industrial effluent. *Lett Appl Microbiol*, v. 28, p. 76–80, 1999.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 29, p. 354 – 360, 2002.

GAUDETTE, H.E.; FLIGHT, W.R; TONER, L. & FOLGER, D.W. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *Journal of Sedimentary Petrology*, v. 44, n. 1, p. 249–253, 1974.

GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D. V. D.; VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v.66, p. 194–205, 2006.

GERMAINE, K.J.; MCGUINNESS, M.; DOWLING, D.N. Improving phytoremediation through plant-associated bacteria. In: BRUIJN, F.J. (Ed.). *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Volume 1. 2 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p.963–974.

GERRITSE, J.; GOTTSCHAL, J. C. Oxic and anoxic growth of a new *Citrobacter* species on amino acids. *Archives of Microbiology*, v. 160, n. 1, p. 51–56, 1993.

- GIBOSN, G. R. Physiology and Ecology of the sulfate-reducing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 69, p. 769-797, 1990.
- GILLAN, D. C.; ROOSA, S.; KUNATH, B.; BILLON, G.; WATTLEZ, R. The long-term adaptation of bacterial communities in metal-contaminated sediments: a metaproteogenomic study. *Environmental Microbiology*, v. 17, p. 1991–2005, 2015.
- GILLER, K.E. *et al.* Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, v. 30, p. 1389-1414, 1998.
- GLASS, E. M.; WILKENING, J.; WILKE, A.; ANTONOPULOS, D.; MEYER, F. Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010. doi:10.1101/pdb.prot5368
- GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M.; PERAINO, V. A.; CROSS, S. A. *Desulfovibrio desulfuricans* Bacteremia and Review of Human *Desulfovibrio* Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 2752–2754, 2003. doi:10.1128/jcm.41.6.2752-2754.2003
- GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. et al Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 66, p. 96–109, 2008.
- GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K.; KLAPPENBACH, J.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 57, p. 81–91, 2007.
- GUERRA-GARCIA J.M., GARCIA-GOMEZ J.C. Assessing pollution levels in sediments of a harbour with two opposing entrances. Environmental implications. *J. Environ. Manage.* 77, 1, 2005
- GUEVARA-RIBA, A., SAHUQUILLO, A., RUBIO, R., RAURET, G. Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Sci. Total Environ.*, v. 321, p. 241–255, 2004.
- GUO, H.; NASIR, M.; LV, J.; DAI, Y.; GAO, J. Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 144, p. 300-336, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.048>
- GUO, J., KANG, Y., & FENG, Y. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. *Journal of Environmental Management*, v. 203, p. 278–285, 2017. doi:10.1016/j.jenvman.2017.07.075
- HANDELSMAN, J. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, n. 4, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, v. 5, n. 10, p. R245–9, 1998.

HARDOIM, C. C. P.; COSTA, R.; ARAUJO, F. V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R. et al. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, p. 3331–3343, 2009.

HYNNINEN, A. Zinc, cadmium and lead resistance mechanisms in bacteria and their contribution to biosensing. Academic Dissertation in Microbiology. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, 2010. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/48a7/c452bf3415e230511ecf9d7521b5b487c8a7.pdf>. Acessado em: 01/1/2019.

HOBBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, 1225-1228.

HORTELLANI, M.A., SARKIS, J.E.S., ABESSA, D.M.S., SOUSA, E.C.P.M. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos – São Vicente. *Quim. Nova*, v. 31, p.10–19, 2008.

HUA, J.; FENG, Y.; JIANG, Q.; BAO, X.; TIN, Y. Shift of bacterial community structure along different coastal reclamation histories in Jiangsu, Eastern China. *Scientific reports*, v. 7, p. 1-10, 2017.

HUGHES, M.N. & POOLE, R. K. *Metals and Micro-organism*. Chapman and Hall, London, 280 p, 1980.

HUSON, D. H.; AUCH, A. F.; QI, J.; SCHUSTER, S. C. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.*, v. 17, p. 377-386, 2007.

HUSSAIN, A.; QAZI, J. I. Metal-induced functional stress in sulphate-reducing thermophiles. *Biotech.*, v. 6, p. 1-17, 2016. doi: 10.1007/s13205-015-0342-1

HWANG, S. K.; JHO, E. H. Heavy metal and sulfate removal from sulfate-rich synthetic mine drainages using sulfate reducing bacteria. *Science of The Total Environment*, v. 635, p. 1308–1316, 2018. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.231

IGIRI, B. E.; OKODUWA, S. I. R.; IDOKO, G. O.; AKABUOGU, E. P.; ADEYI, A. O.; EJIUGU, I. B. Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *J. Toxicol.*, 2018, doi: 10.1155/2018/2568038

IMCHEN, M.; KUMAVATH, R.; BARH, D.; VAZ, A.; GÓES-NETO, A.; TIWARI, S.; GHOSH, P.; WATTAM, A. R.; AZEVEDO, V. Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems. *Scientific reports*, v. 8, p.1-15, 2018.

JAEKEL, U.; ZEDELIOUS, J.; WILKES, H.; MUSAT, F. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments. *Front. Microbiol.* 6:116, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00116

JAHAN, S.; STREZOV, V. Water quality assessment of Australian ports using water quality evaluation indices. *PLoS ONE* 12(12): e0189284, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189284>

JAIN, R. K.; CUI, Z. C.; DOMEN, J. K. Environmental impacts of mining”, in *Environmental Impact of Mining and Mineral Processing*. Boston: Butterworth-Heinemann; p. 153–157, 2016. Doi: 10.1016/B978-0-12-804040-9.00004-8

JESUS, H.C., COSTA, E.A., MENDONÇA, A.S.F., ZANDONADE, E. Distribuição de metais em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória-ES. *Quim. Nova* v. 27, p. 378–386, 2004.

Jl, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 14, p. 2707- 2708, 1995.

JIMÉNEZ, E.I. & GARCIA, V.P. Relationships between organic carbon and total organic matter in municipal solid wastes and city refuse composts. *Biores. Technol.*, v. 41, p. 265- 272, 1992.

JIN, Y.H.; CLARK, A.B.; SLEBOS, R.J.; AL-REFAI, H.; TAYLOR, J.A.; KUNKEL, T.A.; RESNICK, M.A.; GORDENIN, D.A. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet.*, v. 34, p. 326–329, 2003.

JOHNSTON, E.; ROBERTS, D.A. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: a review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 1745 - 1752, 2009.

JOO, J. OCK; CHOI, J.-H.; KIM, I. H.; KIM, Y.-K.; OH, B.-K. Effective bioremediation of Cadmium (II), nickel (II), and chromium (VI) in a marine environment by using *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 20, n. 5, p. 937–941, 2015. doi:10.1007/s12257-015-0287-6

JØRGENSEN, B. B. Mineralization of organic matter in the sea bed-the role of sulphate reduction. *Nature*, v. 296, p. 643–645, 1982. doi: 10.1038/296643a0

KAKSONEN, A. H.; PLUMB, J. J.; ROBERTSON, W. J.; SPRING, S.; SCHUMANN, P.; FRANZMANN, P. D.; PUHAKKA, J. A. Novel Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria from a Geothermally Active Underground Mine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 5, p. 3759–3762, 2006. doi:10.1128/aem.72.5.3759-3762.2006

KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Eng. Life Sci.*, v. 7, p. 541-564, 2007.

KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K.J. Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunchon Bay. *South Korea. Biotechnol.*, v. 7, p. 149–152, 2008.

KANTACHOTE, D.; INNUWAT, W. Isolation of *Thiobacillus* sp for use in treatment of rubber sheet wastewater. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, v. 26, p. 649 – 657, 2004.

KHARRAT, H., KARRAY, F., BARTOLI, M., BEN HANIA, W., MHIRI, N., FARDEAU, M. L., et al. *Desulfobulbus aggregans* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from marine sediment from the Gulf of Gabes. *Curr. Microbiol.*, v. 74, p. 449–454, 2017. doi: 10.1007/s00284-017-1211-4

KIEU, H.T.Q.; MÜLLER, E.; HORN, H. Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Res.*, v. 45, p. 3863–3870, 2011. doi: 10.1016/j.watres.2011.04.043.

KIM, B. S.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUSHI, S.; SIEGLE, E.; OLIVEIRA, R.; ALCANTARA-CARRIO, J.; FIGUEIRA, R. C. L. Organic and inorganic contamination in sediments from Araçá Bay, São Sebastião, Brazil. *Ocean & Coastal Management*, v. 164, p. 42-51, 2018.

KIM, C.; ZHOU, Q.; DENG, B.; THORNTON, E. C.; XU, H. Chromium(VI) Reduction by Hydrogen Sulfide in Aqueous Media: Stoichiometry and Kinetic. *Environ Sci Technol*, v. 35, p. 2219–2225, 2001.

KIM, H.; CHOI, J.; JOO, J. O.; KIM, Y.; CHOI, J.; OH, B. Research Article Review jmb Development of a Microbe-Zeolite Carrier for the Effective Elimination of Heavy Metals from Seawater. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 25, p. 1542–1546, 2015. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1504.04067>

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:e1.

KLUG, M. J.; REDDY, C.A. Current Perspectives in Microbial Ecology. Current Perspectives in Microbial Ecology. *American Society for Microbiology* (1984)

KORLEVIĆ M., ZUCKO J., DRAGIĆ M. N., BLAŽINA M., PUSTIJANAC E., ZELJKO T. V., et al. Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 38, p. 189–197, 2015. 10.1016/j.syapm.2015.03.001

KOZDRÓJ, J. & van ELSAS, J.D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology*, v. 17, p. 31-42, 2001.

KRUMHOLZ, L. R.; ELIAS, D. A.; SUFLITA, J. M. Immobilization of cobalt by reducing bacteria in subsurface sediments. *Geomicrobiol. J.*, v. 20, p.61–72, 2003.

KWON, M. J.; O'LOUGHLIN, E. J.; BOYANOV, M. I.; BRULC, J. M.; JOHNSTON, E. R.; KEMNER, K. M.; ANTONOPOULOS, D. A. Impact of Organic Carbon Electron Donors on Microbial Community Development under Iron- and Sulfate-Reducing Conditions. *PLOS ONE*, 11(1), e0146689, 2016.. doi:10.1371/journal.pone.0146689

LANDIM MIPF, HINGST-ZAHER E. Brazil's biodiversity crisis. *The International Council of Museums Magazine, Paris*, v. 63, n. 2, p. 14–15, 2010.

LEONHARTSBERGER, S.; HUBER, A.; LOTTSPREICH, F.; BÖCK, A. The hydH/G genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J Mol Biol*, v. 307, p. 93-105, 2001.

LI, D.; SHARP, J. O.; SAIKALY, P. E.; ALI, S.; ALIDINA, M.; ALARAWI, M. S.; KELLER, S.; HOPPE-JONES, C.; DREWERS, J. E. Dissolved Organic Carbon Influences Microbial Community Composition and Diversity in Managed Aquifer Recharge Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 6819-6828, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01223-12.

LI, Z.; KIM, D. D.; NELSON, O. D.; OTWELL, A. E.; RICHARDSON, R. E.; CALLISTER, S. J.; LIN, H. Molecular dissection of a putative iron reductase from *Desulfotomaculum reducens* MI-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.467, p. 503-508, 2015.

LIN, C.Y, Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Water Res*, v. 26, p.177–183, 1992.

LIN, C. Y. Effect of heavy metals on acidogenesis in anaerobic digestion. *Water Res*, v. 27, p. 147–152, 1993.

LIN, C. C.; LIN H. L. Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd²⁺). *J. Hazard. Mater.*, v. 122, p. 7–15, 2005. 10.1016/j.jhazmat.2005.02.017

LINS-DE-BARROS, M.; VIEIRA, R.; CARDOSO, A.; MONTEIRO, V.; TURQUE, A. et al. Archaea, bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. *Microb Ecol*, v. 59, p. 523–532, 2010.

LIU, W.T.; STHAL, D.A. Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity and Phylogeny. In: *Manual of Environmental Microbiology*, p.114, 2002.

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci*, v. 104, p. 11436–11440, 2007.

LUPTAKOVA, A.; KUSNIEROVA, M. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. *Hydrometallurgy*, v.77, p.97–102, 2005.

MACIEL-SOUZA, M. D.; MACRAE, A.; VOLPON, A. G. T.; FERREIRA, P. S.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Chemical and microbiological characterization of

- mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Braz J Microbiol*, v. 37, p. 262–266, 2006.
- MACOMBER, L.; IMLAY, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 106, p. 8344–8349, 2009. doi: 10.1073/pnas.0812808106
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. et al. *Microbiologia de Brock*. São Paulo, Prentice Hall, 2005.
- MALIK, A.; JAISWAL, R. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.16, p. 177-182, 2000.
- MARKOWITZ, V. M.; IVANOVA, N. N.; SZETO, E.; PALANIAPPAN, K.; CHU, K.; DALEVI, D.; CHEN, M. A.; GRECHKIN, Y.; DUBCHAK, I.; ANDERSON, I.; LYKIDIS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C. IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic Acids Research*, v. 36, p. 534–538, 2008. doi:10.1093/nar/gkm869
- MARTINS, M.; FALEIRO, M. L.; VERÍSSIMO, A. R.; BARREIROS, M. A.; COSTA, M. C. Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 706-713, 2009.
- MATYAR, F.; KAYA, A.; DINÇER, S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 279–285, 2008.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H.-P.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, v. 14, n. 1, p. 60, 2013. doi:10.1186/1471-2105-14-60
- MENDES, L. W.; TSAI, S. M. Variations of Bacterial Community Structure and Composition in Mangrove Sediment at Different Depths in Southeastern Brazil. *Diversity*, v. 6, p. 827-843, 2014. doi:10.3390/d6040827
- MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, *Brazil. Microbiol Res*, v. 165, p. 466–482, 2010.
- MITTERMIEER RA et al (2004) *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX & Agrupacion Sierra Madre, Cidade do México, p 392
- MMA, 2017. Ministério do Meio Ambiente. A biodiversidade na Zona Costeira e Marinha do Brasil. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/informma/item/6618-a-biodiversidade-na-zona-costeira-e-marinha-do-brasilh>. Acessado em: 13 de junho de 2017.

MMA, 2010. Ministério do Meio Ambiente. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil / Secretaria de Biodiversidade e Florestas/Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. – Brasília: MMA/SBF/GBA, 2010. 148 p.; 29 cm. Disponível em:

http://www.mma.gov.br/estruturas/205/_publicacao/205_publicacao03022011100749.pdf. Acessado em: 13 de junho de 2016.

MUNIZ, P., DANULAT, E., YANNICELLI, B., GARCÍA-ALONSO, J., MEDINA, G., BÍCEGO, M.C. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environ. Int.*, v.29, p.1019–1028, 2004.

MUSAT, N.; WERNER, U.; KNITTEL, K.; KOLB, S.; DODENHOF, T.; VAN BEUSEKOM, J. E. E.; MANN, R. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, p. 333–348, 2006. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.006

MUYZER, G.; STAMS, A. J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol.*, v. 6, p. 441-54, 2008. doi: 10.1038/nrmicro1892

MAZZUCOTELLI, C.A.; PONCE, A.G.; KOTLAR, C.E.; MOREIRA, M. D. R. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Food Sci. Technol*, v. 33, n.2, p. 295-303, 2013.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*, v. 27, p. 313-339, 2003.

NOLL, M.; PETRUKHIN, K.; LUTSENKO, S. Identification of a novel transcription regulator from *Proteus mirabilis*, PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, v. 273, p. 21393-401, 1998.

OCHOAHERRERA, V.; LEON, G.; BANIHANI, Q.; FIELDA, J.A.; SIERRAALVAREZ, R. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Sci. Total Environ.*, p.380e385, 2011.

OLIVEIRA, A.J.F.C.; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water research*, v. 42, n. 8-9, p. 2242-50, abr. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.002>

OLLIVIER, B.; CAYOL, J. L.; FAUQUE, G. Sulphate-reducing bacteria from oil fields environments and deep-sea hydrothermal vents. In “*Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*” (L. L. Barton and W. A. Hamilton, Eds.), pp. 305–328. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

OTWELL, A.E.; SHERWOOD, R.W.; ZHANG, S.; NELSON, O.D.; LI, Z.; LIN, H.; CALLISTER, S.J.; RICHARDSON, R.E. Identification of proteins capable of metal reduction from the proteome of the Gram-positive bacterium *Desulfotomaculum*

reducens MI-1 using an NADH-based activity assay. *Environ Microbiol*, v. 17, p. 1977–1990, 2015.

ØVREÅS, L. Population and community levels approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecology letters*, v. 3, p. 236-251, 2000.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News*, v. 51, p. 4–12, 1985.

PAULO L. M.; STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z. Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, v. 14, p. 537- 553, 2015.

PEREIRA, C.D.S., ABESSA, D.M.S., ZARONI, L.P., GASPARRO, M.R., BAINY, A.C.D., BÍCEGO, M.C., TANIGUCHI, S., FURLEY, T.H., SOUSA, E.C.P.M. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião-SP-Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 26, p. 462–469, 2007.

PINTO, A. B., PAGNOCCA, F. C., PINHEIRO, M. A. A., FONTES, R. F. C., & DE OLIVEIRA, A. J. F. C.. Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the southern-central coast of São Paulo State, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 96, p. 410–417, 2015.doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.014

PITONDO-SILVA, A.; GONÇALVES, G. B.; STEHLING, E. Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. *APMIS*, v. 124, p. 681-688, 2016.

POOLE, R. K. & GADD, G. M. *Metals: Microbe Interactions*. IRL Press, Oxford, 1989 p. 1-37.

PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, v. 25, p. 943-948, 1980.

POSTGATE, J.R. *The Sulphate-reducing bacteria*. 2nd ed. London: Cambridge University Press, 1984.

PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, v. 28, p. 1823–1829, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts252

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; ORTEGA, J. M.; AMARAL, A. M.; TÓTOLA, M. R.; HIRSCH, P. R.; ROSADO, A. S.; GÓES-NETO, A.; SILVA, A. L. C.; ROSA, C. A.; MORAIS, D. K.; ANDREOTE, F. D.; DUARTE, G. F.; MELO, I. S.; SELDIN, L.; LAMBAIS, M. R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R. S.; TSAI, R. H.; AZEVEDO, V. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity—Challenges and Prospects. *Microb Ecol*, v.67, p.237–241, 2014.

QIAN, J.; WEI, L.; LIU, R.; JIANG, F.; HAO, X.; CHEN, G.-H. An Exploratory Study on the Pathways of Cr (VI) Reduction in Sulfate-reducing Up-flow Anaerobic Sludge Bed (UASB) Reactor. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 2016. doi:10.1038/srep23694

QUERO, G. M.; CASSIN, D.; BOTTER, M.; PERINI, L.; LUNA, G.M. Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Front. Microbiol.* 6:1053. doi: 10.3389/fmicb.2015.01053

RABUS, R.; STRITTMATTER, A. Functional genomics of sulphate-reducing prokaryotes. In “*Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*” (L. L. Barton and W. A. Hamilton, Eds.), pp. 117–140. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

RAJKUMAR, M., et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 30, p. 1562-1574, 2012.

RASCHE, F.; HOLD, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, B. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 56, p. 219-235, 2006.

REIS, A. M. M.; ARAÚJO, S. D. J. R.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS, G. et al. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *J Appl Microbiol*, v. 106, p.1378–1387, 2009.

RIBA, I., BLASCO, J., JIMENEZ-TENORIO, N., DELVALLS, T.A. Heavy metal bioavailability and effects: I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cadiz (SW, Spain). *Chemosphere*, v. 58, p. 659–669, 2005.

ROCHA, L. L.; COLARES, G. B.; NOGUEIRA, V. L. R.; PAES, F. A.; MELO, V. M. M. Distinct Habitats Select Particular Bacterial Communities in Mangrove Sediments. *International Journal of Microbiology*, p. 1-6, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3435809>

ROESCH, L. F.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A.; FARMERIE, W. G.; TRIPLET, A. E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*, v. 1, p. 283–290, 2007.

RONAGHI, M. et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, v.281, p.363–365, 1998. doi: 10.1126/ science.281.5375.363

SAIKI, R. K.; GEFLAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-489, 1988.

SALVA-SIÈRRRA, F.; SVENSSON-STADLER, L.; BUSQUETS, A.; JAÉN-LUCHORO, D.; KARLSSON, R.; MOORE, E. R. B.; GOMILA, M. A protocol for

extraction and purification of high-quality and quantity bacterial DNA applicable for genome sequencing: a modified version of the Mamur procedure. *Protocol Exchange*, 2018. DOI: 10.1038/protex.2018.084

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; STAMS, A. J.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. *Environ Microbiol Rep*, v. 5, p. 672-678, 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANY, S.B.T., SALLEH, A., SULAIMAN, A.H. et al. Heavy metal contamination in water and sediment of the Port Klang coastal area, Selangor, Malaysia. *Environ Earth Sci*, v. 69, p. 2013- 2025, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-2038-8>

SARIOGLU, M.; AKKOYUN, S.; BISGIN, T. Inhibition effects of heavy metals (copper, nickel, zinc, lead) on anaerobic sludge. *Journal Desalination and Water Treatment*, v. 23 p. 1-3, 2010. <https://doi.org/10.5004/dwt.2010.1950>

SCHEID, D.; STUBNER, S. Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *Fems Microbiology Ecology*, v. 36, p. 175-183, 2001.

SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol*, v. 173, p. 4371–4378, 1991.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; HORN, D. J. V.WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl.Environ. Microbiol.*, v.75, p. 7537-7541, 2009.

SILVER, S. Plasmid-determined metal resistance mechanisms: Range and overview. *Plasmid*, v. 27, p. 1-3, 1992.

SLATER, J.; CAPONE, D. G. Effects of metals on nitrogen fixation and denitrification in slurries of anoxic saltmarsh sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 18, p. 89-95, 1984.

SMA. 2017. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Gerenciamento Costeiro. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/zoneamento/gerenciamento-costeiro/>. Acessado em: 13 de junho de 2017.

SOUZA, A. F. C. Caracterização molecular e avaliação de resistência a chumbo e cádmio em bactérias isoladas de rizosferas de plantas coletadas em santo amaro (BA). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2013.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Heavy Metals, Bacterial Resistance. In: *Encyclopedia of Microbiology*, Schaechter, M. (Ed.). 3rd Edn., Elsevier, Oxford, UK., ISBN-13: 9780123739445, pp: 220-227, 2009.

SOBOLEV, D.; BEGONIA, M. F. T. Effects of Heavy Metal Contamination upon Soil Microbes: Lead-induced Changes in General and Denitrifying Microbial Communities as Evidenced by Molecular Markers. *Int J Environ Res Public Health*, v.5, p. 450–456, 2008.

SOROKIN, D.Y.; TOUROVA, T.P.; HENSTRA, A.M.; STAMS, A.J.M.; GALINSKI, E.A.; MUYZER, G. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp. nov. – a novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes. *Microbiology*, v. 154, p. 1444– 1453, 2008.

SOUSA, O. V.; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; GOMES, N. C. M.; VIEIRA, R. H. S. F. et al. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. *Mar Pollut Bull*, v. 52, p.1725–1734, 2006.

STAMS, A. J. M.; VAN DIJK, J. B.; DIJKEMA, C.; PLUGGE, C. M. Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, v. 59, p. 1114-1119, 1993.

STAMS, A. J. M.; DIJKEMA, C.; PLUGGE, C. M.; LENS, P.N.L. Contribution of ¹³C-NMR spectroscopy to the elucidation of pathways of propionate formation and degradation in methanogenic environments. *Biodegradation*, v. 9, p. 463-473, 1998.

SUGUIO, K. 1973. *Introdução à sedimentologia*. Editora Edgard Blucher Ltda /EDUSP.

SUN, S.; CHEN, J.; LI, W.; ALTINTAS, I.; LIN, A.; PELTIER, S.; STOCKS, K.; ALLEN, E. E.; ELLISMAN, M.; GRETHE, J.; WOOLEY, J. Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. *Nucleic Acids Res.*, v. 39, p. 546-551, 2011. doi: 10.1093/nar/gkq1102.

TAM, N.F.Y. & WONG, Y.S. Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. *Journal of Environmental Pollution*, v. 110, p. 195-205, 2000.

TEILING, C., TECOTZKY, R. BaseSpace: Simplifying metagenomic analysis. Illumina, Inc., San Diego, CA., 2011.

TEKAYA, E. B.; TIPAYNO, S.; CHANDRASEKARAN, M.; YIM, W.; TONGMIN, S. Actinobacteria Isolation from Metal Contaminated Soils for Assessment of their Metal Resistance and Plant Growth Promoting (PGP) Characteristics. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, v. 45, p. 593-601, 2012. <http://dx.doi.org/10.7745/KJSSF.2012.45.4.593>

TESSLER, M. G.; FIGUEIRA, R. C. L.; MAHIQUES, M. M.; FUKOMOTO, M. M.; CIAPINA, E. M. P. Sedimentation rates and contamination levels by heavy metals at the shallow sedimentary columns from Santos Estuary and Bay, SP, Brasil. *J. Coast. Res. Spec.*, v. 29, p. 713-717, 2006.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

THOMPSON, F.; BRUCE, T.; GONZALEZ, A.; CARDOSO, A.; CLEMENTINO, M. et al. Coastal bacterioplankton community diversity along a latitudinal gradient in Latin America by means of V6 tag pyrosequencing. *Arch Microbiol*, v. 193, p. 105–114, 2011.

THOMPSON F, KRÜGER R, THOMPSON CC, BERLINCK RGS, COUTINHO R, LANDELL MF, PAVÃO M, MOURÃO PAS, SALLES A, NEGRI N, LOPES FAC, FREIRE V, MACEDO AJ, MARASCHIN M, PÉREZ CD, PEREIRA RC, RADIS-BAPTISTA G, REZENDE RP, VALENTI WC, ABREU PC and BioTecMar Network (2018) Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation. *Front. Mar. Sci.* 5:236. doi: 10.3389/fmars.2018.00236

TIMMERS, P. H., GIETELING, J., WIDJAJA-GREEFKES, H. C., PLUGGE, C. M., STAMS, A. J., LENS, P. N., et al. Growth of anaerobic methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in a high-pressure membrane capsule bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.81, p. 1286–1296, 2015. doi: 10.1128/AEM.03255-14

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol Biochem*, v. 12, p. 15–21, 1980.

TORSVIK, V. & ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr. Opinion Microbiol.*, v. 5, p. 204-245, 2002.

TURCATTI, G. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic acids research*, v.36, e25, 2008. Disponível em: . Acesso em: 5 jun. 2009. doi: 10.1093/nar/gkn021.

TREVORS, J.T., ODDIE, K.M. & BELLIVEAU, B.H. Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 32, p. 39-54, 1985.

TROZZI C.; VACCARO R. Environmental impact of port activities. In: Brebbia CA, Olivella J, editors. *Maritime Engineering and Ports II*, Rome, Italy; 2000: 151–161. Available
Fom: <https://www.witpress.com/Secure/elibrary/papers/PORTS00/PORTS00013FU.pdf>

TURQUE, A. S.; CARDOSO, A. M.; SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; FREITAS, F. A. D. et al. Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Biol*, v. 155, p. 135–146, 2008.

TURQUE, A. S.; BATISTA, D.; SILVEIRA, C. B.; CARDOSO, A. M.; VIEIRA, R. P. et al. Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. *PLoS One* 5:e15774, 2010.

TYSON, G.W.; BANFIELD, J. F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *TRENDS in microbiology*, v. 13, p. 411-415, 2005.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1994. Method 3051. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges. Soils and oils. Revision 0. September.

UTGIKAR, V. P.; TABAK, H. H.; HAINES, J. R.; GOVIND, R. Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 3, p. 306–312, 2003. doi:10.1002/bit.10575

VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, p. 327-338, 2002.

VAN DEN HURK, P., EERTMAN, R.H.M., STRONKHORST, J. Toxicity of harbour canal sediments before dredging and after off-shore disposal. *Mar. Pollut. Bull.*, v.34, p. 244-249, 1997.

VIEIRA, R.; CLEMENTINO, M.; CARDOSO, A.; OLIVEIRA, D.; ALBANO, R. et al Archaeal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. *Microb Ecol*, v. 54, p. 460–468, 2007.

VIEIRA, R. P.; GONZALEZ, A. M.; CARDOSO, A. M.; OLIVEIRA, D. N.; ALBANO, R. M. et al Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. *Environ Microbiol*, v. 10, p. 189–199, 2008.

VIRGA, R. H. P.; GERALDO, L.P. Investigação dos teores de metais em espécies de siris azuis do gênero *Callinectes* sp. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.2, n.4, p. 943-948, 2008.

VITORINO, L.C.; BESSA, L. A. Microbial Diversity: The Gap between the Estimated and the Known. *Diversity*, 10, 46, 2018. doi:10.3390/d10020046

WANG, J.; XIA, F-F.; BAI, Y.; FANG, C. R.; SHEN, D. S.; HE, R. Methane oxidation in landfill waste biocover soil: kinetics and sensitivity to ambient conditions. *Waste Manag.*, v. 31, p. 864–870, 2011. doi: 10.1016/j.wasman.2011.01.026.

WARTHMAN, R.; VASCONCELOS, C.; SASS, H.; MCKENZIE, J. A. *Desulfovibrio brasiliensis* sp. nov., a moderate halophilic sulfate-reducing bacterium from Lagoa Vermelha (Brazil) mediating dolomite formation. *Extremophiles*, v. 9, n.3, p. 255–261, 2005. doi:10.1007/s00792-005-0441-8

WESTRAM, R.; BADER, K.; PRÜSSE, E.; KUMAR, Y.; MEIER, H.; GLÖCKNER, F. O.; et al. “ARB: a software environment for sequence data,” in *Handbook of*

Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches, ed. F. J. de Bruijn (Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell), p. 399–406, 2011.

WIDDEL, F.; PFENNIG, F. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systemic bacteriology*, vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 663–679, 1984.

WONG, Y.S., TAMJ, N.F.Y., LAU, P.S., XUE, X.Z. The toxicity of Marine sediments in Victoria Harbour, Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 31, p. 464–470, 1995.

WWF, 2017. Zona Costeira. Disponível em: http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_costeiro/. Acessado em: 13 de junho de 2017.

YAO, X.; ZHANG, J.; TIAN, L.; GUO, J. The effect of heavy metal contamination on the bacterial community structure at Jiaozhou Bay, China. *Brazilian Journal of Environmental Microbiology*, n 48, p. 71-78, 2017.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLOCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHEIFER, K.; WHITMAN, W. B.; EUZEBY, J.; AMANN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature reviews*, v. 12, p. 635-645, 2014.

YI, Y.; YANG, Z.; ZHANG, S. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. *Environ. Pollut.*, v. 159, p. 2575-2585, 2011.

YIN, H.; NIU, J.; REN, Y.; CONG, J.; ZHANG, X.; FAN, F.; XIAO, Y.; ZHANG, X.; DENG, J.; XIE, M.; HE, Z.; ZHOU, J.; LIANG, Y.; LIU, X. An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. *Scientific Reports*, 5:14266, 2015. DOI: 10.1038/srep14266

YILMAZ, P.; PARFREY, L. W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; PRUESSE, E.; QUAST, C., et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.*, v. 42, p. 643–648, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1209

ZAMPIERI, B.D.B.; OLIVEIRA, R.S.; PINTO, A. B.; ANDRADE, V.C.; BARBIERI, E.; CHINELLATO, R.M.; OLIVEIRA, A.J.F.C. Comparison of bacterial densities and resistance in different beach compartments: should water be our main concern? *O Mundo da Saúde*, v.40A, p. 461-482, 2017.

ZAMPIERI, B. D. B.; PINTO, A. B.; SCHULTZ, L.; OLIVEIRA, M. A.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. *Microbial Ecology*, v. 72, p. 582–594, 2016.

ZHANG, W.; WANG H. Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. *Miner Eng*, v. 92, p. 63–71, 2016.

ZHILINA, T.; ZAVARZIN, G.; RAINEY, F.; PIKUTA, E.; OSIPOV, G.; KOSTRIKINA, N. Desulfonatronovibrio hydrogenovorans gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, v. 47, p. 144–149, 1997.

ZOUCH, H.; KARRAY, F.; ARMOUGOM, F.; CHIFFLET S., HIRSCHKER-RÉA, A.; KHARRAT, H.; KAMOUN, L.; HANIA, W. B.; OLLIVIER, B.; SAYADI, S.; QUÉMÉNEUR, M. Microbial Diversity in Sulfate-Reducing Marine Sediment Enrichment Cultures Associated with Anaerobic Biotransformation of Coastal Stockpiled Phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Front. Microbiol.* 8:1583, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01583.

ANEXO 1 – Composição do meio de cultura Postgate C

Sais e Reagentes	Quantidades em 1000 mL de água ultrapurificada
NH₄Cl	1,0 g
KH₂PO₄	0,5 g
MgCl₂.6H₂O	0,1 g
CaCl₂.6H₂O	0,06 g
Na₂SO₄	4,5 g
MgSO₄	0,06 g
Lactato de sódio	6,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
C₆H₅O₇Na₃ (Citrato de Sódio)	0,3 g
Solução de Resazurina	1,0 mL

ANEXO 2 – Composição da solução de oligoelementos ácidos e básicos utilizadas no meio anóxico basal.

Solução Estoque Ácida (1L)

HCl	1,8 g
H₃BO₃	61,8 mg
MnCl₂	61,25 mg
FeCl₂	943,5 mg
CoCl₂	65,5 mg
NiCl₂	12,86 mg
ZnCl₂	67,7 mg
CuCl₂	13,35 mg

Solução Estoque Básica (1L)

NaOH	400,0 mg
Na₂SeO₃	17,3 mg
Na₅WO₄	29,4
Na₂MoO₄	20,5 mg

ANEXO 3 - Composição da solução de vitaminas utilizadas no meio anóxico basal.

Biotina	20 mg
Nicotinamida	200 mg
Ácido aminobenzóico	100 mg
Tiamina (Vitamina B1)	200 mg
Ácido pantotênico	100 mg
Piridoxamina	500 mg
Cianocobalamina (Vitamina B12)	100 mg
Riboflavina	100 mg