

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização molecular de comunidades bacterianas
de rejeitos siderúrgicos com diferentes concentrações
de zinco**

ORIENTADA: FLAVIANE ALVARENGA PINHEIRO

ORIENTADORA: ANDRÉA MARIA AMARAL NASCIMENTO

CO-ORIENTADOR: EDMAR CHARTONE DE SOUZA

BELO HORIZONTE

Abril – 2010

Caracterização molecular de comunidades bacterianas de rejeitos siderúrgicos com diferentes concentrações de zinco



Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética.

ORIENTADORA: ANDRÉA MARIA AMARAL NASCIMENTO

CO-ORIENTADOR: EDMAR CHARTONE DE SOUZA

BELO HORIZONTE

ABRIL - 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha gratidão pelo dom da vida, pela saúde, por iluminar o meu caminho e dar forças para alcançar essa vitória.

Aos meus pais, Nilza e Marcelo, que são meu alicerce, agradeço pelo amor e pelo apoio a cada dia. Ao meu irmão Igor, agradeço por todo carinho e incentivo. Amo muito vocês!

À minha querida orientadora Andréa Maria Amaral Nascimento, por ter me dado essa oportunidade e por poder compartilhar a cada dia da sua amizade e de seus ensinamentos. Obrigada pela brilhante orientação e por todo carinho.

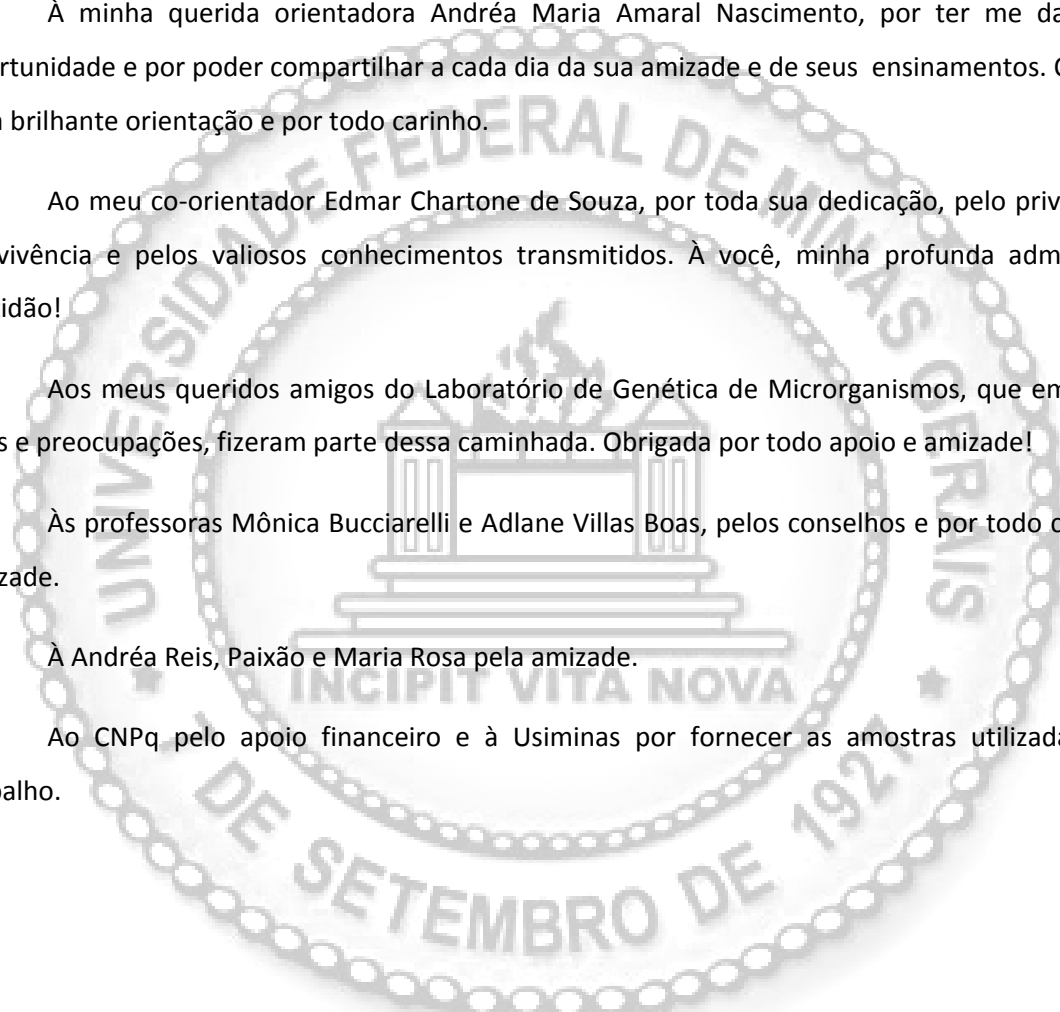
Ao meu co-orientador Edmar Chartone de Souza, por toda sua dedicação, pelo privilégio da convivência e pelos valiosos conhecimentos transmitidos. À você, minha profunda admiração e gratidão!

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, que em meio a risos e preocupações, fizeram parte dessa caminhada. Obrigada por todo apoio e amizade!

Às professoras Mônica Bucciarelli e Adlane Villas Boas, pelos conselhos e por todo carinho e amizade.

À Andréa Reis, Paixão e Maria Rosa pela amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e à Usiminas por fornecer as amostras utilizadas neste trabalho.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Culturas enriquecidas em meio Leathen.....	23
Figura 2 - Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S da cultura enriquecida do rejeito Lama Fina.....	28
Figura 3 - Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S da cultura enriquecida do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	29
Figura 4 - Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S do rejeito Lama Fina.....	33
Figura 5 - Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	34
Figura 6 - Curva de rarefação representando a cobertura observada das bibliotecas de clones.....	35
Figura 7- Árvore filogenética dos clones obtidos da cultura enriquecida da Lama Fina.....	37
Figura 8 - Árvore filogenética dos clones obtidos da cultura enriquecida da Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	38
Figura 9 - Árvore filogenética dos clones obtidos do rejeito Lama Fina.....	39
Figura 10 - Árvore filogenética dos clones obtidos do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	40
Figura 11 - Espectroscopia de fluorescência de raio X das amostras tratadas com o consórcio bacteriano.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições da termociclagem para amplificação do gene de rRNA 16S de bactérias.....	19
Tabela 2 - Composição química dos rejeitos Lama Fina e Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	22
Tabela 3 - Análise dos clones, diversidade das sequências e cobertura das bibliotecas de clones da Lama Fina e Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	25
Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da cultura enriquecida da Lama Fina.....	26
Tabela 5 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da cultura enriquecida da Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	27
Tabela 6 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos do rejeito Lama Fina.....	31
Tabela 7 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização.....	32



SUMÁRIO

Resumo	7
1 - Introdução	8
1.1 - Caracterização do Problema.....	8
1.2 - Biolixiviação	9
2 – Objetivos.....	15
2.1 - Geral	15
2.2 – Específicos.....	15
3 – Material e Métodos.....	16
3.1 – Coleta e caracterização química dos rejeitos.....	16
3.2 – Enriquecimento de cultura.....	16
3.3 – Coloração de Gram.....	16
3.4 - Extração de DNA total	17
3.5 – Amplificação do gene de rRNA 16S.....	17
3.6 – Construção da biblioteca do gene de rRNA 16S de bactéria.....	18
3.7 - Extração do DNA plasmidiano	18
3.8 - Validação da biblioteca dos clones	19
3.9 - Sequenciamento do gene de rRNA 16S e análise filogenética	19
3.10 - Ensaio de biolixiviação	20
4 – Resultados e Discussão.....	21
4.1 – Caracterização química dos rejeitos	21
4.2 – Enriquecimento das culturas.....	21
4.3 – Extração de DNA, amplificação, construção e análise das bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S de bactéria.....	22
4.4 - Diversidade das bibliotecas de clones das culturas enriquecidas.....	24
4.5 - Diversidade das bibliotecas de clones dos rejeitos.....	30
4.6 – Estimativa da diversidade bacteriana dos rejeitos e das culturas enriquecidas	34
4.7 – Comparação das bibliotecas de clones dos rejeitos e das culturas enriquecidas ...	35
5. Biolixiviação.....	41
6. Conclusão	42
7. Referências Bibliográficas.....	43

Resumo

O processo siderúrgico gera 700 Kg de rejeitos por tonelada de aço e esses rejeitos possuem altas concentrações de metais indesejáveis, que dificultam sua reciclagem, com sérias conseqüências econômica e ambiental. A remediação feita através de microrganismos tem sido utilizada para tentar solucionar problemas causados pela liberação de rejeitos industriais e tem se mostrado eficiente na recuperação de diversos metais, além de ser menos agressiva ao ambiente. A análise filogenética do gene de rRNA 16S das comunidades bacterianas de dois rejeitos siderúrgicos com diferentes concentrações de zinco, lama fina (LF, 2,3%) e estação de tratamento de efluentes da galvanização (ETEG, 25-50%), revelou a ocorrência de cinco filos: Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, presentes em ambos os rejeitos e Cyanobacteria e Bacteroidetes, presentes em LF e ETEG, respectivamente. Os 131 clones das bibliotecas construídas a partir dos rejeitos (LFR e ETEGR) se agruparam em 45 OTUs, sendo 30 de LFR e 15 de ETEGR. O número de OTUs e os índices de diversidade de Shannon e Simpson mostraram que LFR apresenta mais diversidade que ETEGR. A análise filogenética do gene de rRNA 16S das bactérias cultivadas através do método de enriquecimento de cultura em meio Leathen (pH 2) identificou os filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Deinococcus-Thermus. Os 193 clones analisados das bibliotecas das culturas enriquecidas (LFC e ETEGC) se agruparam em 49 OTUs, 30 de ETEGC e 19 de LFC. De acordo com o número de OTUs e com os índices de diversidade, ETEGC mostrou maior diversidade. Em todas as bibliotecas de clones Proteobacteria foi o filo predominante, 50% nas bibliotecas dos rejeitos e 92% nas bibliotecas das culturas enriquecidas, tendo três de suas classes representadas, α , β e γ -Proteobacteria. A identificação das bactérias pela análise do gene de rRNA 16S dos clones das quatro bibliotecas construídas, revelou gêneros com potencial biotecnológico, como por exemplo *Ochrobactrum anthropi*, que possui capacidade de biorremediação de cromo, cádmio e cobre. Finalmente, os rejeitos LF e ETEG originais, foram tratados por 30 dias com os consórcios bacterianos obtidos pelo enriquecimento de cultura e a caracterização química dos rejeitos lixiviados, realizada através da fluorescência de raio X, detectou a redução de mais de 90% do teor de zinco em ambos os rejeitos. Portanto, os dados obtidos sugerem potencial biotecnológico para mediar processos industriais, considerando os aspectos ecológicos e econômicos.

1 - Introdução

1.1 - Caracterização do Problema

O aço é um dos materiais mais importantes do mundo contemporâneo tendo papel essencial no desenvolvimento dos diversos países. As indústrias siderúrgicas brasileiras produzem aproximadamente 34 milhões de toneladas de aço anuais, gerando, infelizmente, 700 Kg de rejeitos por tonelada de aço produzida. O grande problema é a presença de altas concentrações de zinco (Zn), cobre (Cu), fósforo (P), cromo (Cr) ou outros elementos indesejáveis que dificultam a reciclagem desses rejeitos para reutilização na produção de aço, constituindo fonte potencial de contaminação ambiental. A contaminação dos ecossistemas terrestres e aquáticos com metais pesados é consequência da urbanização e industrialização tornando-se um grave problema para o ambiente. Os metais pesados persistem no ambiente por vários anos, já que não são degradados (Kumar, *et. al.*, 2009). Alguns destes metais, como chumbo (Pb) e mercúrio (Hg), são potencialmente tóxicos, mesmo em baixas concentrações, e podem causar sérios riscos à saúde humana se entrarem na cadeia alimentar. Já existem muitas investigações a respeito da extensão da poluição causada por metais pesados em solos, águas superficiais e subterrâneas, ar e vegetação, sendo essa contaminação associada à mineração e atividades industriais, particularmente siderúrgicas e minas de carvão a céu aberto (Rehman, *et. al.*, 2008).

A destinação desses resíduos que não podem ser reciclados é uma fonte de preocupação para as indústrias, pois requerem destinação adequada a fim de se evitar problemas de poluição ambiental. Uma alternativa de disposição são os aterros industriais controlados, que são projetados para impedir a contaminação de solos, de lençóis freáticos e da atmosfera.

Outra alternativa para reduzir a quantidade de metais presentes seria o tratamento especial dos rejeitos siderúrgicos antes de serem liberados (Solisio *et. al.*, 2006). Assim, processos de tratamento que visem à redução de compostos químicos tóxicos ou que permitam a redução de sua quantidade podem ser atrativos, tanto do ponto de vista econômico como ambiental (Ramos *et. al.*, 2006). Portanto, a recuperação desses rejeitos, antieconômicos e poluidores do ambiente, deve ser considerada como prioridade e parte dos processos de mineração e siderúrgico.

Tradicionalmente, a remoção e a recuperação dos metais podem ser realizadas através de processos químicos, com pH muito baixo, em torno de 1,5 a 2,0, destacando-se dentre eles a extração de metais utilizando ácidos orgânicos e inorgânicos e extração de metais através de agentes quelantes, como por exemplo o EDTA. Esses processos têm sido usados na remediação de solos, lamas e sedimentos contaminados com metais pesados e são úteis para reduzir o volume de

resíduos tóxicos (Babel, *et. al.*, 2006). Alguns metais como Pb, Cr, cádmio (Cd) e níquel (Ni) podem ser reduzidos por esses métodos, mas esses tratamentos são favoráveis somente quando os metais estão presentes em altas concentrações, e, além disso, é necessário um controle contínuo do processo (Solisio *et. al.*, 2002). Outras características, como alto custo, dificuldades operacionais e o grande consumo de agentes químicos tornam esses métodos pouco atrativos (Xiang *et. al.*, 2000).

O processo siderúrgico para a produção de aço gera uma grande quantidade de rejeitos sólidos. Durante o processo de fusão do aço, o forno atinge temperaturas de 1600°C ou mais, e componentes como Zn são volatilizados, passando para a fase de vapor. Uma grande quantidade de pó é gerada quando este vapor é resfriado e coletado. O Zn é um metal pesado e apresenta maior valor econômico em relação aos demais presentes nesse rejeito (Vigano *et. al.*, 2004). Ele é também um dos metais mais encontrados nos efluentes industriais envolvidos na galvanização, chapeamento (por meio de eletrólise), produção de baterias e outras indústrias metalúrgicas. Como forma metálica, tem uma disponibilidade limitada e não apresenta nenhum risco ecológico. Entretanto, o Zn pode reagir com outras substâncias como ácidos e oxigênio para formar compostos, que podem se tornar potencialmente tóxicos (Radhika *et al.*, 2006). Além disso, pode apresentar sérios riscos à saúde humana se ingerido além do recomendado, causando, por exemplo, náusea, problemas gastro-intestinais, fadiga e alterações na resposta imune (Fosmire, 1990).

Atualmente, a técnica mais utilizada para extrair Zn metálico é o processo Roast-Leach-Electrowinning (RLE), o qual é responsável por mais de 85% da produção total de Zn no mundo. Contudo, a alta emissão de SO₂ e o grande consumo de ácido sulfúrico associados a esse processo estão mudando a aceitabilidade dessa técnica para o futuro (Xia, *et. al.*; 2009). Essa tecnologia ainda possui outras desvantagens, como o alto custo (Le-xian *et, al.*, 2008).

1.2 - Biolixiviação

Para tentar solucionar ou minimizar os problemas causados pela liberação de rejeitos industriais, várias técnicas já estão sendo utilizadas, porém, a remediação feita através de microrganismos tem se mostrado mais eficiente, no que se diz respeito à menor agressão ao ecossistema envolvido (Carlos *et. al.*, 2007). Assim, um sistema alternativo aos métodos químicos é oferecido pela lixiviação bacteriana, ou biolixiviação, que é um processo biotecnológico que se fundamenta na utilização de microrganismos capazes de solubilizar metais pela oxidação de sulfetos metálicos (Francisco *et. al.*, 2007). A contribuição microbiana para a oxidação de minerais foi descoberta há mais de 50 anos. Desde então, pesquisadores vêm investigando as possibilidades de explorar essa capacidade bacteriana para realizar a biolixiviação de minerais em escala industrial.

Contudo, foram identificados poucos microrganismos capazes de tolerar as concentrações de metais tipicamente presentes em ambientes ácidos de minas e em reatores de biolixiviação (Watkin, *et. al.*, 2009).

Muitos metais são tóxicos para os microrganismos através de múltiplas vias bioquímicas. Uma das formas de toxicidade acontece devido à substituição de íons metálicos em sítios de ligação específicos, o que pode alterar ou destruir a função biológica da molécula alvo. Outra forma de toxicidade envolve a participação de metais de transição, como Cu, Ni e Fe, em reações que produzem espécies reativas de oxigênio, como H₂O₂ e OH⁻. Esses compostos são altamente reativos e podem danificar macromoléculas biológicas (Harrison *et. al.*, 2007).

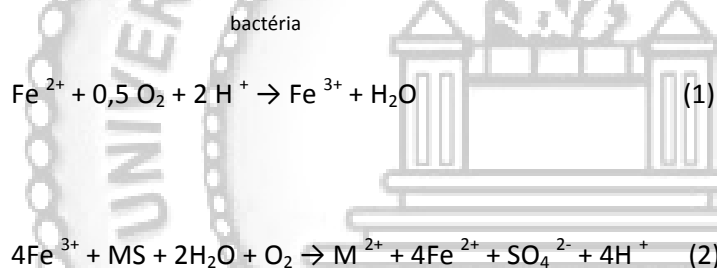
Os sistemas de resistência bacteriana a metais têm sido estudados há muitos anos, sendo a maioria deles codificados por genes encontrados em plasmídios. Essa resistência encontra-se elevada, como resultado da poluição antropogênica e industrial, mas, provavelmente, surgiu logo que a vida começou, num mundo já poluído por atividades vulcânicas e outras fontes geológicas. Os mecanismos de resistência a metais pesados são, geralmente, detoxificação enzimática e bombas de efluxo, convertendo os íons metálicos em formas menos tóxicas ou diminuindo a sua disponibilidade, respectivamente. Não há nenhum mecanismo geral para resistência a todos os metais pesados (Silver, 1996, Nascimento & Chartone-Souza, 2003).

Uma estratégia que os microrganismos podem usar para sobreviver em ambientes contaminados por metais tóxicos é a formação de biofilmes. As populações em biofilmes são protegidas pela ação combinada de fenômenos químicos, físicos e fisiológicos. Há muitos estudos que mostram um gradiente metabólico existente nos biofilmes, uma estratificação relacionada à difusão de nutrientes, oxigênio e metabólitos através da comunidade. Isso resulta numa distribuição não uniforme do pH extracelular e restringe a taxa de crescimento microbiano em algumas partes do biofilme, levando a um crescimento mais lento. Essa heterogeneidade metabólica pode explicar a resistência a certos antibióticos, cujo mecanismo de ação está relacionado a altas taxas de crescimento bacteriano e pode explicar também, em partes, a tolerância a íons metálicos (Harrison *et. al.*, 2007). Os microrganismos acidofílicos que vivem em condições extremas encontram pressões seletivas para desenvolver mecanismos de resistência, o que lhes garante uma vantagem competitiva (Watkin, *et. al.*, 2009).

A maioria das interações metais-microrganismos tem sido significativa para remoção, recuperação e detoxificação de compostos orgânicos e inorgânicos ou radionuclídeos poluidores. A solubilização por meio da biolixiviação pode tornar possível a remoção dos metais de matrizes sólidas, como solos, sedimentos, lixo e rejeitos industriais (Gadd, 2004). Este método tem melhorado a eficiência das indústrias de processamentos de minerais (Quatrini *et. al.*, 2005), podendo ser

considerado uma “tecnologia limpa” (Krebs *et. al.*, 1997) e reduzindo ainda os custos em 80%, quando comparado aos métodos químicos tradicionais (Xiang *et. al.*, 2000). Essa tecnologia tem sido usada para tratar minerais específicos, principalmente Cu e ouro (Au). Além disso, a lixiviação bacteriana tem sido aplicada com sucesso na metalurgia do urânio (U), prata (Ag), na recuperação de Zn. Novos processos têm sido desenvolvidos para a recuperação de cobalto (Co) (Makita *et. al.*, 2004). Os benefícios da biolixiviação comercial do Zn são muito importantes, visto que a exploração de minérios de baixo teor de Zn são processos difíceis de serem realizados pelas tecnologias convencionais, como, por exemplo, a fundição direta, que não seria eficiente devido ao baixo teor do metal contido no minério (Mousavi, *et. al.*, 2008).

O seguinte processo mostra o efeito da solubilização biológica nos sulfetos metálicos (Couillard *et. al.*, 1994):



Observa-se na equação 2 que o íon férrico (Fe^{3+}), formado na equação 1, reage quimicamente com o sulfeto metálico (MS). Como consequência ocorrerá a solubilização do metal por oxidação do sulfeto metálico para sulfato, formando ácido sulfúrico. O íon férrico é reduzido para ferroso (Fe^{2+}), sendo este novamente reoxidado pela bactéria, fechando o ciclo (França *et. al.*, 2004). Depois que os metais são liberados dos rejeitos sólidos, eles podem ser recuperados em uma fase líquida. Uma forma de imobilização dos metais seria através de bactérias redutoras de sulfato. Essas bactérias são heterotróficas, crescem sob condições anaeróbicas e reduzem sulfato a sulfeto. A maioria dos sulfetos metálicos possui uma solubilidade muito baixa e conseqüentemente eles precipitam (Bosio *et. al.*, 2007). Outro exemplo de imobilização é a co-precipitação de metais com carbonatos (HCO_3^- e CO_3^{2-}) que são produzidos durante a respiração bacteriana, resultando na deposição de sulfetos metálicos inorgânicos e carbonatos metálicos (Harrison *et. al.*, 2007). Sendo

assim, os processos integrados que envolvem a solubilização e subsequente precipitação podem ser usados na recuperação de metais (Bosio *et. al.*, 2007).

A lixiviação bacteriana é atualmente aplicada em escala industrial para recuperação de metais como Cu, U e Au, em países como: EUA, Rússia, Chile, Espanha, Canadá, África do Sul, Austrália entre outros. A lixiviação bacteriana do Cu tem sido muito estudada em minerais sulfetados. Apesar da calcopirita (CuFeS_2) ser o mineral sulfetado de Cu mais abundante na natureza, existem outros dois minerais sulfetados também importantes economicamente, a calcocita (Cu_2S) e a covelita (CuS) (Teixeira *et. al.*, 2005). A mina de Cerro Verde, no Peru, processa por biolixiviação aproximadamente 32000 toneladas de minério de Cu por dia. No Brasil, a principal mina que se encontra em atividade é a mina de São Bento, em Minas Gerais, que opera desde 1990, processando cerca de 150 toneladas de Au por dia. Além dos metais citados, outro metal que vem ganhando interesse em estudos de biolixiviação é o molibdênio (Mo), que possui múltiplas e importantes aplicações tecnológicas como baterias no estado sólido, lubrificantes, catalisadores, entre outras (Francisco, *et. al.*, 2007).

Os microrganismos que são metabolicamente ativos em ambientes extremamente ácidos compreendem uma grande diversidade de bactérias autotróficas e heterotróficas. As bactérias acidofílicas quimiolitotróficas foram e continuam sendo o foco de muitas pesquisas, principalmente devido ao papel que desempenham na oxidação de minerais sulfetados, o que, na biotecnologia, é conhecido como biomineração (Ghauri *et. al.*, 2007). Esses microrganismos estão presentes em ambientes terrestres e aquáticos e seus substratos podem ser encontrados nos mais variados ambientes (Pathak, *et. al.*, 2009). Bactérias acidofílicas desempenham um papel importante nos sistemas ambientais e industriais, incluindo os problemas de drenagem ácida de minérios, de rochas e os processos biotecnológicos da biolixiviação. O uso dessas bactérias para recuperar metais tem se desenvolvido com sucesso e crescido muito atualmente (Zhiguo He *et. al.*, 2007).

Acidithiobacillus ferrooxidans foi o primeiro organismo isolado em ambientes de biolixiviação e é o mais estudado dentre os que estão envolvidos nesse processo (Goebel *et. al.*, 1994). É uma bactéria acidofílica, quimiolitotrófica, ou seja, obtém sua energia através da oxidação de substratos inorgânicos, basicamente íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos. A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é usada pela bactéria para a fixação do CO_2 atmosférico, sua fonte de carbono. *A. ferrooxidans* é uma bactéria mesófila, possui um crescimento ótimo a aproximadamente 30°C e tolera altas concentrações de metais pesados (Zeng *et. al.*, 2007). Essa capacidade de oxidação faz dela um microrganismo apropriado para o uso em biominas com a finalidade de recuperar metais. Várias linhagens dessa espécie têm sido isoladas de fontes naturais, como rochas e água de minas, e se diferenciam pelo tipo de substrato que usam como fonte de energia (Hong Chen *et. al.*, 2007).

Outros microrganismos considerados importantes no processo de biooxidação mineral são as bactérias sulfo-oxidantes, como, por exemplo, *Acidithiobacillus thiooxidans*, e bactérias ferro-oxidantes, como por exemplo, *Leptospirillum ferrooxidans*, ambas mesófilicas (Makita *et. al.*, 2004). Uma indicação da importância desses outros dois microrganismos na biolixiviação é que uma cultura mista de *L. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* poderia oxidar e solubilizar metais de uma forma mais rápida quando comparada à oxidação realizada por uma cultura contendo somente *A. ferrooxidans* (Olson *et. al.*, 2003). Em muitos ecossistemas são formadas comunidades onde existem microrganismos de diferentes espécies que realizam associações metabólicas, formando um consórcio. Esse tipo de associação pode ser benéfico para todos os constituintes, favorecendo a sobrevivência em locais com pouca disponibilidade de nutrientes e sob outros tipos de estresse ambiental (Souza, *et. al.*, 1998).

São conhecidos também *Acidiphilium spp.*, *Ferrimicrobium acidiphilum* e *Acidocella spp.* que desempenham um papel importante no processo de dissolução de minerais sulfetados. *Acidiphilium spp.* são os heterotróficos acidófilicos mais encontrados em águas ácidas de minas (Ghauri *et. al.*, 2007). Recentemente, estudos moleculares mostraram que outros microrganismos ferro-oxidantes como, por exemplo, *Acidimicrobium ferrooxidans* e *Ferroplasma spp.* são importantes na geração de ambientes ácidos.

A maioria das bactérias acidofílicas é sensível a substâncias orgânicas e cresce muito lentamente em meios de cultura sólidos, o que dificulta o seu cultivo. Embora as técnicas baseadas em cultivo sejam de grande importância para se conhecer as características fisiológicas dos microrganismos isolados, para um estudo mais completo da biodiversidade elas não são satisfatórias, visto que menos de 1% dos microrganismos pode ser cultivado em laboratório (Gui-Liang Tan, *et. al.*, 2008). Estudos mostram que as seqüências dos genes de rRNA 16S amplificados diretamente de amostras ambientais apresentam uma diversidade muito maior do que a encontrada em cultivo, mostrando a importância de se usar técnicas moleculares independentes de cultivo, como as bibliotecas de clones (Chunbo *et. al.*, 2007). Deve-se salientar que amostras de 1 grama de solo possuem entre 3.000 e 11.000 genomas, e somente uma pequena proporção destes podem ser obtidos através do cultivo (Schmeisser *et. al.*, 2007).

Os genes de rRNA são bastante conservados e sofrem lenta evolução, funcionando assim como uma importante ferramenta para a história evolutiva. As bactérias apresentam três tipos de genes de rRNA – 5S, 16S e 23S – sendo que, dentre esses, o gene de rRNA 16S tornou-se o mais utilizado para análises filogenéticas por apresentar tamanho satisfatório e regiões altamente conservadas entre as espécies (Dahllof, 2002). Assim sendo, as ferramentas moleculares, como as bibliotecas de clones de rRNA 16S, são úteis para se conhecer e estudar a diversidade de procariontes presentes em amostras ambientais.

O Zn é um metal economicamente importante devido a suas propriedades anticorrosivas. Por esta razão, sua principal utilização é como uma fina camada protetora do aço e do ferro na indústria automobilística, processo conhecido como galvanização. Na siderurgia, esse processo gera grande quantidade de resíduos ricos em Zn que contaminam o ambiente e são impróprios para a reutilização na produção de aço devido à sua grande concentração. Conseqüentemente, toneladas desses rejeitos são descarregados diariamente formando grandes depósitos. A biolixiviação é uma alternativa para atenuar esse problema, tanto na descontaminação ambiental, quanto na reutilização para a produção de aço e possível recuperação de Zn.



2 – Objetivos

2.1 - Geral

Avaliar a diversidade genética das comunidades bacterianas de dois rejeitos siderúrgicos, com diferentes concentrações de Zn, e também de suas culturas enriquecidas.

2.2 – Específicos

2.2.1 Construir bibliotecas de clones dos genes de rRNA 16S diretamente das amostras dos rejeitos e também de suas respectivas culturas enriquecidas.

2.2.2 – Analisar os clones das bibliotecas por meio do sequenciamento parcial dos genes de rRNA 16S e construir árvores filogenéticas.

2.2.3 – Obter um consórcio bacteriano com potencial para lixiviar zinco.

2.2.4 – Detectar, após ensaio de biolixiviação in vitro, a concentração de Zn nos rejeitos siderúrgicos.



3 – Material e Métodos

3.1 – Coleta e caracterização química dos rejeitos

Amostras de rejeitos siderúrgicos, com diferentes concentrações de Zn, foram coletadas assepticamente no interior de uma indústria siderúrgica. A coleta foi realizada em triplicata de dois tipos de rejeitos que foram liberados durante o processo de produção de aço: lama fina (LF) e estação de tratamento de efluentes da galvanização (ETEG), que se encontravam depositados, dentro da siderúrgica, por um período de até três dias. A caracterização química desses rejeitos foi realizada pela técnica de espectroscopia de fluorescência de raio X.

3.2 – Enriquecimento de cultura

Dez gramas de cada amostra de rejeito foram colocados, separadamente, em frascos Erlenmeyers contendo 100 ml de meio Leathen (Xiang, *et. al.*, 2000), cuja composição é a seguinte (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,45, K_2HPO_4 0,15, KCL 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01. Foi acrescentado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 g/l) como fonte de energia e o pH foi ajustado com H_2SO_4 para 2,0. As culturas do rejeito LF (LFC) e do rejeito ETEG (ETEGC) foram mantidas sob agitação (200 rpm) a 30°C, por 40 dias, sendo o pH foi monitorado diariamente.

3.3 – Coloração de Gram

Para observar o crescimento bacteriano nas culturas foi realizado o método de coloração de Gram. Uma gota da cultura foi espalhada sobre uma lâmina e flambada no fogo para sua fixação. Durante o processo de coloração cobriu-se toda a lâmina com a solução cristal de violeta. A lâmina ficou repousando por dois minutos e posteriormente foi lavada com água corrente. Adicionou-se a solução de lugol sobre a superfície da lâmina, após 2 minutos, enxaguou-se a lâmina retirando toda a solução adicionando sobre ela três gotas de éter acetona, deixando-o agir por 30 segundos a 1 minuto. Posteriormente, a lâmina foi lavada cuidadosamente de forma que toda a sua superfície ficasse transparente. A seguir, adicionou-se a solução de safranina e deixando-a agir por 5 segundos, lavando-a, posteriormente, com água corrente. Finalmente, a lâmina foi colocada para secar

seguinte-se à sua visualização ao microscópio óptico, para observar a presença e densidade de bactérias Gram-positivas (cor roxa) ou Gram-negativas (cor rosa).

3.4 - Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada diretamente dos rejeitos e também das culturas após os 40 dias de incubação, utilizando, respectivamente, Power MaxTM Soil DNA Isolation KIT Sample e Power MaxTM Water DNA Isolation KIT Sample (MO Bio Laboratories), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 – Amplificação do gene de rRNA 16S

O gene de rRNA 16S foi amplificado por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), utilizando os iniciadores específicos para bactérias 8F 5`- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3` e 907R 5`- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3` (Lane, 1991). Os reagentes para a PCR foram constituídos de 0,4 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e 40 ng de DNA bacteriano. As condições de termociclagem estão descritas na Tabela 1. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e foram eluídos do gel utilizando o DNA Extraction KIT (Fermentas).

Tabela 1: Condições da termociclagem para amplificação do gene de rRNA 16S de bactérias

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	94	5
Desnaturação	94	1
*Anelamento dos iniciadores	53	1
Extensão	72	3
Extensão final	72	10

* A temperatura de anelamento cai 1°C a cada 2 ciclos até atingir a 45°C. O último ciclo repete 11 vezes.

3.6 – Construção da biblioteca do gene de rRNA 16S de bactéria

Os amplicons purificados do gene de rRNA 16S de bactérias foram clonados no vetor pJET (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante e transformados em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . As bactérias transformadas foram selecionadas em placas contendo meio Luria Bertani-LB (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. Identificou-se o crescimento apenas das colônias contendo os plasmídios com os insertos de interesse, uma vez que a presença do inserto levou à perda da função letal do gene. Essas colônias foram coletadas com palitos esterilizados e depositadas em microplacas com 96 poços, contendo 250 μ L de meio LB suplementado com ampicilina (50 μ g/ml) e glicerol (15% v/v). As placas foram seladas, incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente, estocadas em ultrafreezer a - 80°C.

3.7 - Extração do DNA plasmidiano

O DNA plasmidiano foi isolado de acordo com o protocolo de minipreparação descrito por Sambrook *et al.*, (1989), com a introdução do uso do filtro PVDF \pm 0,2 μ m (Millipore, EUA) para purificação do material.

3.8 - Validação da biblioteca dos clones

Dez clones de cada biblioteca foram analisados para a presença do inserto contendo os genes de rRNA 16S. O DNA plasmidiano dos clones (50 ng) foi utilizado como molde em reações de PCR tendo como iniciadores pJET-2F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') e pJET-2R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG - 3') que se anelam no vetor que flanqueia a região do inserto clonado. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), visualizados sob luz ultra-violeta.

3.9 - Sequenciamento do gene de rRNA 16S e análise filogenética

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o DYEEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT for MegaBACE DNA Analysis Systems (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante do sequenciador MegaBace (GE Healthcare). A análise das seqüências foi feita usando-se os programas Phred/ Phrap/ Consed, em sistema operacional Linux, para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20), alinhamento e edição, para gerar uma seqüência consenso de alta qualidade. Em seguida, as seqüências foram submetidas ao banco de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information), pela ferramenta blastn (Nucleotide-nucleotide BLAST) para análise de similaridade. Para o alinhamento das seqüências obtidas, foram usados os programas CLUSTAL W e MEGA 4,0 (Kumar *et al.*, 2004). As OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) foram definidas a partir do programa DOTUR (Schloss e Handelsman, 2005), considerando o nível de distância genética de 0,03 ou 3%, uma vez que níveis $\geq 97\%$ de similaridade entre seqüências têm sido proposto para classificar um microrganismo no nível de espécie (Drancourt *et al.*, 2000). A cobertura das bibliotecas foi calculada usando-se a equação $C = 1 - (n / N) \times 100$, onde n significa o número de OTUs e N o número de seqüências analisadas na biblioteca (Good, 1953).

3.10 - Ensaio de biolixiviação

O ensaio de biolixiviação foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 ml, onde foram adicionados 180 ml de meio Leathen, 10 gramas de rejeito autoclavado (10% p/v) e 20 ml de cultura enriquecida (10% v/v) sendo os frascos mantidos sob agitação (200 rpm), a 30°C por 30 dias. O pH inicial foi ajustado para 2, usando H₂SO₄. Frascos controles, contendo o rejeito autoclavado, foram mantidos sob as mesmas condições do experimento, sem nenhum inóculo bacteriano. A análise química dos rejeitos foi realizada após esse período através da espectroscopia de fluorescência de raio X.



4 – Resultados e Discussão

4.1 – Caracterização química dos rejeitos

A análise química dos rejeitos foi realizada pela técnica de fluorescência de raio X e mostrou que os rejeitos possuem diferentes composições, como descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Composição química dos rejeitos LF e ETEG (%).

	ZnO	Fe	MgO	CaO	C	SiO ₂	Na	K	MnO	Zn(OH)	CaSO ₄	Fe(OH) ₂	Cr(OH) ₃	C ₂₀ H ₁₂
LF	2,3	57	2,5	11	1,3	1,0	0,2	0,1	0,8	NA	NA	NA	NA	NA
ETEG	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25–50	40	1 – 10	1 – 10	10

NA – não avaliado

4.2 – Enriquecimento das culturas

Culturas enriquecidas proporcionam o desenvolvimento de um consórcio bacteriano e diversas atividades metabólicas dessas populações podem ser exploradas como fonte para processos biotecnológicos. As culturas dos rejeitos LF e ETEG (Figura 1) foram enriquecidas por 40 dias. Assim que os rejeitos foram adicionados ao meio de cultura Leathen (pH 2), o pH imediatamente elevou-se para 5 (LF) e 7 (ETEG). Durante a primeira semana foi necessário o monitoramento diário do pH, visto que este não se mantinha estável. Para manter o ambiente favorável ao cultivo de bactérias extremófilas, diariamente foi acrescentado H₂SO₄. Entretanto, observou-se que o pH das culturas estabilizou-se em 2 no quinto (LFC) e sétimo dia (ETEGC). A partir daí, o pH foi medido semanalmente e não houve mais oscilação.

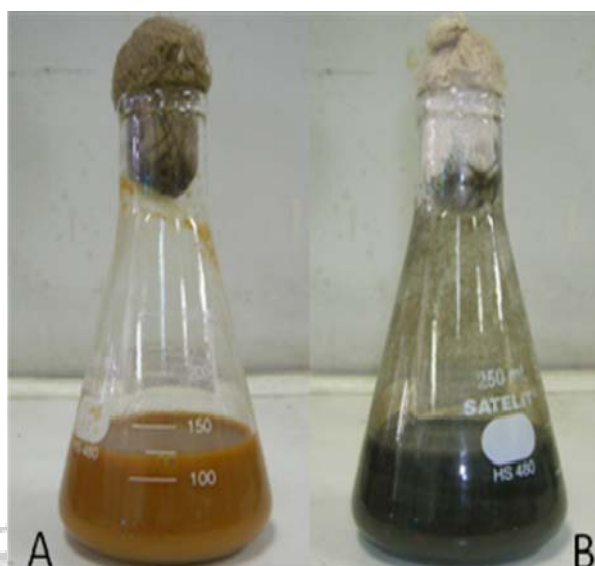


Figura 1: Culturas enriquecidas em meio Leathen (pH 2) após 40 dias a 30° C, (A) Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização (ETEG) e (B) Lama Fina (LF).

O aumento do pH observado durante o ensaio na primeira semana em ambas as culturas pode ser explicado de acordo com Xia *et. al.* (2009), pelo consumo de prótons H^+ que provavelmente ocorreu no sistema, de acordo com a equação $Fe^{2+} + 0,5 O_2 + 2 H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O$. Ainda nessa etapa, pode ocorrer o crescimento bacteriano através da energia obtida na reação de oxidação do Fe^{2+} . O Fe^{3+} formado foi utilizado de acordo com a equação $4Fe^{3+} + MS + 2H_2O + O_2 \rightarrow M^{2+} + 4Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 4H^+$, que teve como resultado a liberação de prótons, compensando o seu consumo e fechando o ciclo. Nesta equação, M pode representar o Zn, nosso metal de interesse. Essa combinação de reações químicas, o aumento da população bacteriana e o acréscimo de H_2SO_4 diariamente, permitiram, posteriormente, a estabilização do pH em 2. O baixo pH favorece o ciclo de oxi-redução do Fe, podendo resultar em altas taxas de solubilização de Zn neste período (Marhual *et. al.*, 2008).

4.3 – Extração de DNA, amplificação, construção e análise das bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S de bactéria

A análise de comunidade bacteriana pelo método independente de cultivo é importante para a identificação e estudo da diversidade dessas comunidades, uma vez que a maioria dos

microrganismos não é cultivável (Gui-Liang Tan, *et. al.*, 2008). Para isso, foi feita a extração de DNA total diretamente das amostras ambientais. Além disso, para determinar a composição filogenética do consórcio bacteriano foi realizada, também, a extração de DNA a partir da cultura enriquecida. A análise da comunidade bacteriana presente nessas culturas permite obter conhecimento a respeito da diversidade de bactérias extremófilas, que sobrevivem em condições de pH muito ácido e informa se nesses rejeitos habitam bactérias com potencial para a biolixiviação.

Os DNAs extraídos diretamente dos rejeitos LF (LFR) e ETEG (ETEGR) e das culturas enriquecidas LF (LFC) e ETEG (ETEGC) não puderam ser visualizados em gel de agarose, mas a amplificação, por PCR, do gene de rRNA 16S específico para bactérias produziu amplicons com tamanho esperado, de 900 pb. As bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S foram construídas e apresentaram, aproximadamente, 3700, 1200, 1200 e 1000 clones para LFC, ETEGC, LFR e ETEGR, respectivamente. Em seguida, foram validadas, observando se tinham ou não os insertos, através de PCR, utilizando os primers pJET-2F e pJET-2R. Todos os clones testados continham o inserto. Um total de 324 clones das quatro bibliotecas foi selecionado, aleatoriamente, e seqüenciados para análise filogenética. Destes, 58 foram identificados como seqüências quimeras e foram excluídas das análises posteriores (Tabela 3). Os clones que apresentaram a mesma seqüência foram considerados como pertencentes a uma mesma OTU, totalizando 94 OTUs, as quais foram afiliadas a cinco filos diferentes.

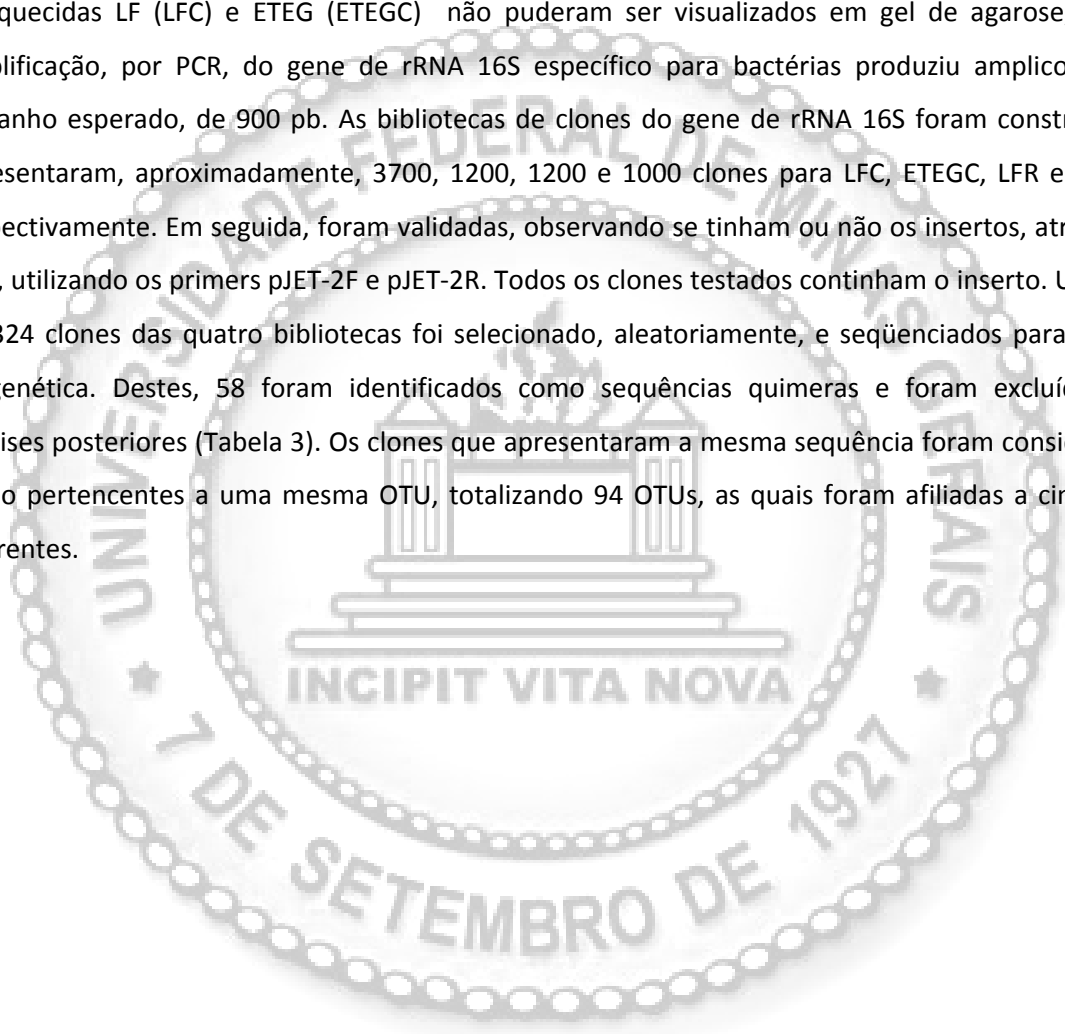


Tabela 3: Análise dos clones, diversidade das sequências e cobertura das bibliotecas de clones da Lama Fina (LF) e Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização (ETEG).

Bibliotecas	LFR	LFC	ETEGR	ETEGC
Clones	71	99	60	94
Chimeras*	7	15	12	24
OTUs	30	19	15	30
Índice de diversidade de Shannon	3,0	1,1	1,94	2,2
Índice de diversidade de Simpson	0,04	0,45	0,13	0,15
Chao1	61	28	15,19	50
ACE	73	25	16,7	63
Cobertura da biblioteca (%)	68	83	89	67

* Sequências quimeras foram incluídas no número total de clones, mas excluídas para análise filogenética.

4.4 - Diversidade das bibliotecas de clones das culturas enriquecidas

Para a análise filogenética das sequências de rDNA 16S das culturas enriquecidas foram selecionados aleatoriamente 193 clones (Tabelas 4 e 5). A análise filogenética revelou diversidade bacteriana nas duas bibliotecas (Figuras 7 e 8). A biblioteca ETEGC foi mais diversa, com pouca ou nenhuma OTU comum às outras bibliotecas. As bibliotecas das culturas enriquecidas continham 49 OTUs distintas, as quais foram afiliadas a cinco filos. A maioria das sequências teve alta identidade com bactérias cultivadas obtidas dos mais variados ambientes (Tabelas 4 e 5). As OTUs das duas bibliotecas foram afiliadas a Proteobacteria (92%) e Firmicutes (5,8%). Bacteroidetes, Actinobacteria e Deinococcus-Thermus foram encontrados em baixa frequência e exclusivamente em uma única biblioteca (Figuras 3 e 4).

Tabela 4: Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da cultura enriquecida da Lama Fina (LFC).

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Microrganismo ou sequência mais próxima	N° Acesso	Identidade	Habitat do microrganismo relacionado
Proteobacteria	OLFC1	14	<i>Shigella sp</i>	GQ403792	99%	Carne de frango de matadouro
Proteobacteria	OLFC2	51	<i>Shigella sp</i>	DQ337523	99%	Efluente de suinocultura
Firmicutes	OLFC3	1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	GU120652	99%	Amostra mineral de mina de feldspato
Proteobacteria	OLFC4	1	Bactéria não cultivável	AY376702	99%	Amostra ambiental
Proteobacteria	OLFC5	1	Bactéria não cultivável	GQ009605	99%	Pele humana
Proteobacteria	OLFC6	1	<i>Alcaligenes faecalis</i>	GQ375789	99%	Solo
Proteobacteria	OLFC7	1	<i>Chromobacterium sp</i>	EF633687	99%	Águas quentes na Índia
Firmicutes	OLFC8	1	<i>Bacillus fusiformis</i>	DQ333300	96%	Sedimentos de uma lagoa na Índia
Firmicutes	OLFC9	1	<i>Bacillus subtilis</i>	AY887082	99%	Solo
Proteobacteria	OLFC10	1	Bactéria não cultivável	EU777772	94%	Fezes de urso
Proteobacteria	OLFC11	2	Bactéria não cultivável	GQ094146	98%	Pele humana
Firmicutes	OLFC12	1	<i>Bacillus cereus</i>	EF032682.1	96%	Pele de cabra
Proteobacteria	OLFC13	1	<i>Pseudomonas japonica</i>	AB126621	98%	Amostra de lama ativada
Proteobacteria	OLFC14	1	Bactéria não cultivável	EU778511	96%	Fezes de panda
Proteobacteria	OLFC15	1	Bactéria não cultivável	EU778511	97%	Fezes de panda
Firmicutes	OLFC16	1	<i>Bacillus altitudinis</i>	FJ973524	99%	Solo

Proteobacteria	OLFC17	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	AM114410	99%	Escarros humanos
Actinobacteria	OLFC18	1	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	AJ243871	98%	Não citado
Proteobacteria	OLFC19	2	<i>Sphingomonas sp</i>	EU448284	96%	Solo de agricultura

Tabela 5: Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da cultura enriquecida da Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização (ETEGC).

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Microrganismo ou sequência mais próxima	Nº Acesso	Identidade	Habitat do microrganismo relacionado
Firmicutes	OETEGC1	3	Bactéria não cultivável	GQ018233.1	99%	Pele humana
Proteobacteria	OETEGC2	27	<i>Chromobacterium sp</i>	AB426118.1	99%	Solo
Proteobacteria	OETEGC3	7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	GU186835.1	99%	Água de rio
Proteobacteria	OETEGC4	4	<i>Aeromonas jandaei</i>	GU003810.1	98%	Lama ativada de reator
Proteobacteria	OETEGC5	2	<i>Chromobacterium sp</i>	AY117566.1	98%	Água de rio
Proteobacteria	OETEGC6	2	<i>Enterobacter sp</i>	EF198245.1	99%	Água
Proteobacteria	OETEGC7	2	<i>Chromobacterium sp</i>	GU195136.1	97%	Lama ativada de águas residuais
Proteobacteria	OETEGC8	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GU294304.1	100%	Água doce
Proteobacteria	OETEGC9	1	<i>Shigella flexneri</i>	FN433027.1	99%	Esterco de elefante
Deinococcus-Thermus	OETEGC10	1	<i>Deinococcus sp</i>	AB242694.1	99%	Folha de tomate
Proteobacteria	OETEGC11	1	<i>Ochrobactrum sp</i>	GU214710.1	99%	Solo
Proteobacteria	OETEGC12	1	<i>Chromobacterium sp</i>	EF633687.1	94%	Água
Proteobacteria	OETEGC13	1	<i>Aeromonas sp</i> não cultivável	EF679189.1	95%	Lodo de esgoto
Proteobacteria	OETEGC14	1	<i>Aeromonas veronii</i>	FJ940850.1	97%	Intestino de carpa
Proteobacteria	OETEGC15	1	<i>Aeromonas popoffii</i>	GU205196.1	95%	Água de lagoa

Proteobacteria	OETEGC16	1	<i>Chromobacterium sp</i>	EU109734.1	96%	Sistema aquático
Firmicutes	OETEGC17	1	<i>Bacillus subtilis</i>	GU056809.1	99%	Raiz
Proteobacteria	OETEGC18	1	<i>Aeromonas sp</i>	AM989270.1	94%	Água de lagoa
Proteobacteria	OETEGC19	1	<i>Brevundimonas diminuta</i>	GU126799.1	99%	Lama ativada de águas residuais
Proteobacteria	OETEGC20	1	<i>Pseudomonas sp</i>	FJ005063.1	94%	Escória contendo Pb/Zn
Proteobacteria	OETEGC21	1	<i>Chromobacterium sp</i>	EU244725.1	96%	Palha de arroz
Proteobacteria	OETEGC22	1	<i>Aquitalea sp</i> não cultivável	FJ717995.1	98%	Água de nascente
Proteobacteria	OETEGC23	1	<i>Chromobacterium sp</i>	AM182544	93%	Musgo
Bacteroidetes	OETEGC24	1	<i>Chryseobacterium gleum</i>	FJ887959	96%	Solo poluído
Proteobacteria	OETEGC25	1	Bactéria redutora de Fe	FJ802339	92%	Sedimento de rio
Proteobacteria	OETEGC26	1	<i>Aeromonas sp</i> não cultivável	EU616634.1	97%	Trato digestivo de sanguessuga
Proteobacteria	OETEGC27	1	<i>Aeromonas sp</i> não cultivável	FJ887896.1	97%	Solo
Proteobacteria	OETEGC28	1	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	AB009828.1	85%	Não citado
Proteobacteria	OETEGC29	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AM992197	96%	Água de nascente
Proteobacteria	OETEGC30	1	<i>Aeromonas punctata</i>	FJ940815	91%	Intestino de carpa

A análise filogenética das sequências de rDNA 16S obtidas da biblioteca LFC revelou que as 19 OTUs afiliaram-se a três diferentes filos: Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria (Tabela 4 e Figura 2). O filo Proteobacteria predominou (92%) e as classes α , β e γ -Proteobacteria estavam presentes. As sequências foram identificadas no nível de gênero e o mais frequente foi *Shigella*, com 77% de predominância, seguido por *Sphingomonas* (2,3%), *Alcaligenes* (1,1%), *Chromobacterium* (1,1%), *Pseudomonas* (1,1%) e *Ochrobactrum* (1,1%). As OTUs OLFC4, OLFC10, OLFC14 e OLFC15 pertencem à família Enterobacteriaceae. Dentre os gêneros encontrados, alguns possuem aplicações biotecnológicas, como *Sphingomonas*, usado na biorremediação de contaminantes ambientais e na degradação de plásticos e *Ochrobactrum anthropi* que possui capacidade de biorremediação de cromo, cádmio e cobre (Ozdemir, et. al., 2003).

As 5 OTUs afiliadas com Firmicutes foram representadas pelo gênero *Bacillus*. O filo Actinobacteria foi representado por 1 OTU, a qual pertencia ao gênero *Rubrobacter* (Tabela 4).

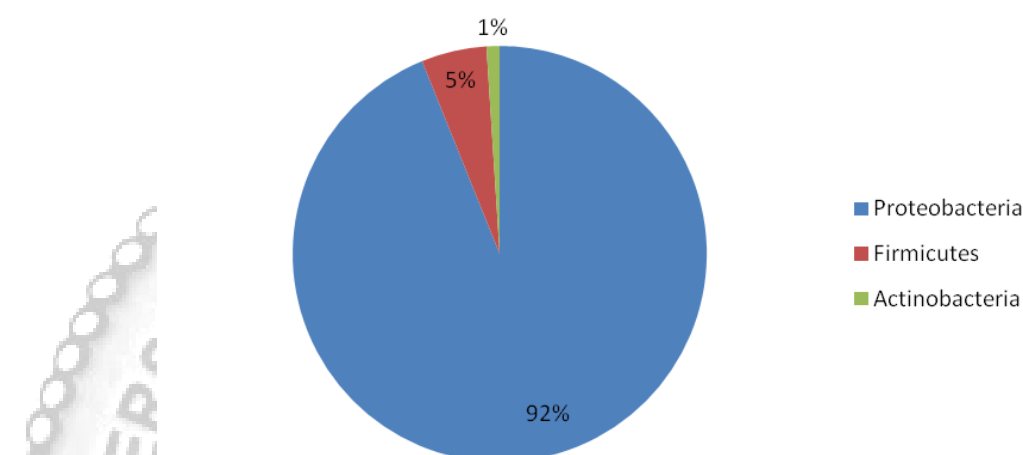


Figura 2: Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S da cultura enriquecida do rejeito Lama Fina (LFC).

A análise filogenética das sequências do rDNA 16S da biblioteca ETEGC apresentou uma diversidade maior tanto no nível de filo, quanto no nível de gênero. As 30 OTUs afiliaram-se a quatro filios: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Deinococcus-Thermus (Tabela 5 e Figura 3). Como na biblioteca LFC, Proteobacteria também predominou na biblioteca ETEGC (91%) e foi representado pelos gêneros *Chromobacterium* (50%), *Aeromonas* (27%), *Enterobacter* (2,8%), *Pseudomonas* (2,8%), *Shigella* (1,4%), *Ochrobactrum* (1,4%), *Brevundimonas* (1,4%), *Aquitalea* (1,4%) e *Hydrogenophylus* (1,4%). Firmicutes foi representado pelo gênero *Bacillus* e os menos frequentes foram Bacteroidetes (*Chryseobacterium*) e Deinococcus-Thermus (*Deinococcus*) (Tabela 5). A bactéria não cultivável representante da OTU OETEGC1 pertence à família Staphylococcaceae. Representantes do filo Deinococcus-Thermus são altamente resistentes às condições ambientais extremas, podendo ser

encontrados em locais que contenham resíduos radioativos e em fontes termais e são capazes de reduzir Fe (Slobodkin, 2005).

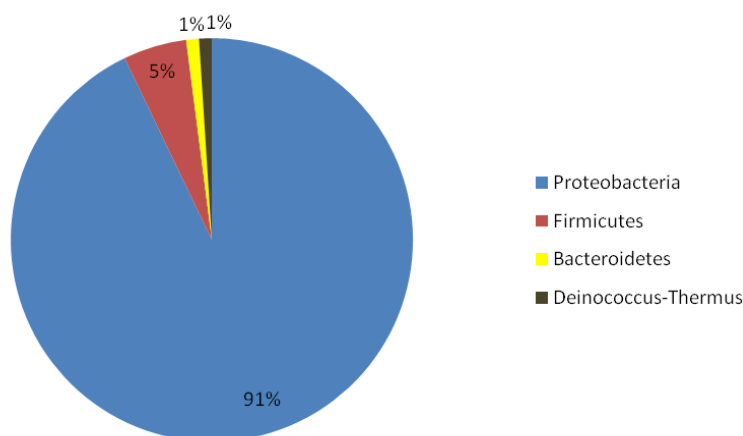


Figura 3: Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S da cultura enriquecida do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização (ETEGC).

O enriquecimento das culturas foi importante para a obtenção dos consórcios bacterianos. Durante os 40 dias de cultivo, os próprios rejeitos foram fontes de nutrientes e de energia, possibilitando a sobrevivência das bactérias em um ambiente tão extremo, com pH 2 e pobre em nutrientes. Além disso, é possível que tenha ocorrido a formação de biofilmes, aumentando a resistência das bactérias às condições hostis do meio. Segundo Yoshida *et. al.* (2009), a maioria dos biofilmes naturais é formado por múltiplas espécies, sugerindo que os mistos sejam melhores que aqueles formados por uma única espécie e frequentemente proporcionem vantagens sob condições de estresse ambiental. Ao serem semeadas em placas de petri com meio Leathen sólido, esses biofilmes poderiam ser rompidos e não havendo mais a interação entre as bactérias do consórcio, não haveria crescimento.

4.5 - Diversidade das bibliotecas de clones dos rejeitos

Para análise filogenética das sequências de rDNA 16S dos rejeitos foram selecionados aleatoriamente 131 clones. De acordo com o índice de diversidade de Shannon e com o número de OTUs (Tabela 3), LFR foi a que apresentou a maior diversidade. A análise filogenética das sequências de rDNA 16S obtidas da biblioteca LFR mostrou que as 30 OTUs afiliaram-se a Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Cyanobacteria (Tabela 6 e Figura 4). O filo mais encontrado em LFR foi Proteobacteria, com 46% dos clones seqüenciados, seguido por Firmicutes, Actinobacteria e Cyanobacteria, que foi o menos freqüente (Figura 4).

As 15 OTUs obtidas da biblioteca ETEGR afiliaram-se a Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria (Tabela 7 e Figura 5). Nesta biblioteca, Proteobacteria também foi o filo predominante, representando 56% dos clones seqüenciados, seguido por Firmicutes e os menos frequentes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Assim como nas culturas, a maioria das sequências teve alta identidade com bactérias cultivadas encontradas nos mais variados ambientes.

Tabela 6: Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos do rejeito Lama Fina (LFR).

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Microrganismo ou sequência mais próxima	Nº Acesso	Identidade	Habitat do microrganismo relacionado
Firmicutes	OLFR1	6	<i>Bacillus pumilus</i>	GU125637.1	99%	Chucrute
Actinobacteria	OLFR2	5	<i>Micrococcus luteus</i>	EU327793.1	94%	Esporocarpo do cogumelo <i>Hebeloma crustuliniforme</i>
Firmicutes	OLFR3	9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GU125640.1	98%	Chucrute
Proteobacteria	OLFR4	8	<i>Burkholderia fungorum</i>	GU144371.1	99%	Solo de floresta
Proteobacteria	OLFR5	4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	EU977715	97%	Chão de uma sala limpa
Proteobacteria	OLFR6	4	<i>Chromobacterium sp</i>	AB426118	99%	Solo
Firmicutes	OLFR7	2	<i>Bacillus sp</i>	GU112210	97%	Solo
Actinobacteria	OLFR8	2	<i>Propionibacterium acnes</i>	AB540664	99%	Lama
Proteobacteria	OLFR9	2	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	EF602567.1	99%	Raiz de cana
Proteobacteria	OLFR10	2	<i>Shigella sonnei</i>	EU723822.1	98%	Água

Proteobacteria	OLFR11	1	<i>Pseudomonas sp</i>	DQ192044.1	99%	Escoa de asfalto
Proteobacteria	OLFR12	1	<i>Methylobacterium sp</i>	GU368371.1	98%	Água potável de encanamento de cobre corroído
Proteobacteria	OLFR13	1	<i>Pseudomonas sp</i>	DQ213044.1	98%	Água de rio
Firmicutes	OLFR14	1	<i>Staphylococcus sp</i>	FJ957639.1	98%	Sala limpa de veículos espaciais
Actinobacteria	OLFR15	1	Bactéria não cultivável	GQ069657.1	94%	Pele humana
Actinobacteria	OLFR16	1	<i>Rothia sp</i>	GU470892.1	100%	Boca humana
Proteobacteria	OLFR17	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FJ976090.1	99%	Local contaminado por metais
Cyanobacteria	OLFR18	1	<i>Chroococcus sp</i>	AM710384.1	92%	Reservatório de água doce
Proteobacteria	OLFR19	1	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	NR_028008.1	96%	Água de cozimento da cortiça
Firmicutes	OLFR20	1	<i>Bacillus subtilis</i>	GQ280076.1	95%	Lamas e efluentes de depuração de sódio
Actinobacteria	OLFR21	1	Bactéria não cultivável	GQ065373	98%	Pele humana
Proteobacteria	OLFR22	1	<i>Sphingomonas sp</i> não cultivável	DQ188452.1	99%	Fluido alveolar de criança com fibrose cística
Proteobacteria	OLFR23	1	<i>Paracoccus sp</i>	AM275338.2	97%	Sedimentos de mar profundo
Firmicutes	OLFR24	1	<i>Bacillus sp</i>	GQ402829.1	92%	Solo próximo a refinaria de petróleo
Proteobacteria	OLFR25	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	EU931555.1	97%	Raiz de cana
Actinobacteria	OLFR26	1	<i>Kocuria sp</i>	DQ358872.1	98%	Sedimentos de mar
Proteobacteria	OLFR27	1	<i>Massilia sp</i>	FJ786054.1	97%	Solo arado e de aterro
Actinobacteria	OLFR28	1	<i>Actinomyces sp</i> não cultivável	FJ976357.1	98%	Boca
Proteobacteria	OLFR29	1	<i>Sphingomonas sp</i>	EU448284.1	98%	Solo de agricultura
Firmicutes	OLFR30	1	Bactéria não cultivável	AB188596.1	94%	Intestino de cupim

Tabela 7: Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização (ETEGR).

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Microrganismo ou sequência mais próxima	Nº Acesso	Identidade	Habitat do microrganismo relacionado
Proteobacteria	OETEGR1	13	<i>Chromobacterium sp</i>	AB426118.1	99%	Solo
Firmicutes	OETEGR2	12	<i>Bacillus sp</i>	FN666885.1	99%	Solo de aterro
Proteobacteria	OETEGR3	3	Bactéria não cultivável	FJ593709.1	99%	Larvas
Proteobacteria	OETEGR4	3	<i>Pantoea sp</i>	FN555402.1	99%	Solo
Proteobacteria	OETEGR5	2	<i>Sphingomonadaceae</i> não cultivável	EF173348.1	98%	Solo com hidrocarbonetos
Bacteroidetes	OETEGR6	2	<i>Bacteroidetes</i> não cultivável	AY792301.1	98%	Lagoa
Proteobacteria	OETEGR7	2	Bactéria não cultivável	EU939439.1	98%	Fezes
Proteobacteria	OETEGR8	2	<i>Leptothrix sp</i>	AB015048.1	98%	Fontes termais
Firmicutes	OETEGR9	2	<i>Bacillus sp</i>	FN666893.1	99%	Solo de aterro
Firmicutes	OETEGR10	2	Bactéria não cultivável	GQ068810.1	98%	Pele
Proteobacteria	OETEGR11	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	EF602552.1	94%	Caule de cana
Actinobacteria	OETEGR12	1	<i>Actinomyces sp</i>	AF287749.1	99%	Boca humana
Proteobacteria	OETEGR13	1	<i>Acinetobacter sp</i>	GU566311.1	98%	Água potável
Actinobacteria	OETEGR14	1	<i>Micrococcus sp</i>	AM988873.1	99%	Água potável tratada
Firmicutes	OETEGR15	1	Bactéria não cultivável	GQ016369.1	99%	Pele

Nas bibliotecas dos rejeitos, as 23 OTUs afiliadas a Proteobacteria foram representadas pelas três classes Gammaproteobacteria (41% e 10% em LFR e ETEGR, respectivamente), Betaproteobacteria (10% e 31% em LFR e ETEGR, respectivamente) e Alphaproteobacteria (6% e 4%, em LFR e ETEGR, respectivamente). Os gêneros encontrados foram *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Pantoeae*, *Methylobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Paracoccus*, *Massilia* e *Leptothrix*. Os gêneros *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Chromobacterium* foram comuns às duas bibliotecas e *Pantoeae* e *Leptothrix* foram exclusivos da biblioteca ETEGR. *Burkholderia* é um gênero conhecido por desempenhar um importante papel na

biorremediação e degradação de compostos, como clorobenzoato (Yoshida, *et. al.*, 2009). Outro gênero com aplicação biotecnológica é *Leptothrix*, que possui a capacidade de oxidação do ferro e do manganês. A formação de bainha é outra característica dos membros desse gênero. A bainha, um microtubo no qual as células são encapsuladas em uma linha, imobiliza enzimas oxidantes de metais e acumula óxido de manganês, que agem como catalisadores e adsorventes de íons metálicos na água (Takeda, *et. al.*, 2010).

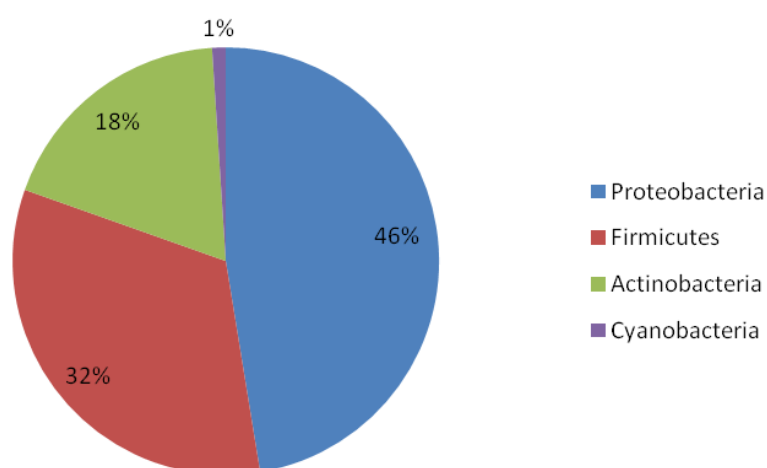


Figura 4: Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S do rejeito Lama Fina (LFR).

O filo Firmicutes foi representado por 8 e 4 OTUs em LFR e ETEGR, respectivamente. Dentre eles foram encontrados o gênero *Bacillus*, o mais abundante, que predominou em 29% dos clones de ambas as bibliotecas, o gênero *Staphylococcus* e bactérias não cultiváveis das famílias Staphylococcaceae (OLFR30 e OETEGR15) e Carnobacteriaceae (OETEGR10), que apareceram em baixa frequência. Estas OTUs podem representar novas taxa.

As 7 OTUs afiliadas a Actinobacteria foram representadas por 12 sequências, dentre as quais foram encontrados os gêneros *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Rothia*, *Kocuria* e *Actinomyces*. *Micrococcus* e *Actinomyces* foram comuns às duas bibliotecas, enquanto os outros gêneros estavam presentes somente em LFR. O filo Cyanobacteria foi representado pelo gênero *Chroococcus*, com apenas uma sequência. Estudos realizados com *Micrococcus* revelaram que este gênero está envolvido na detoxificação e biodegradação de muitos poluentes ambientais como alguns tipos de herbicidas e óleos (Zhuang, *et. al.*, 2003).

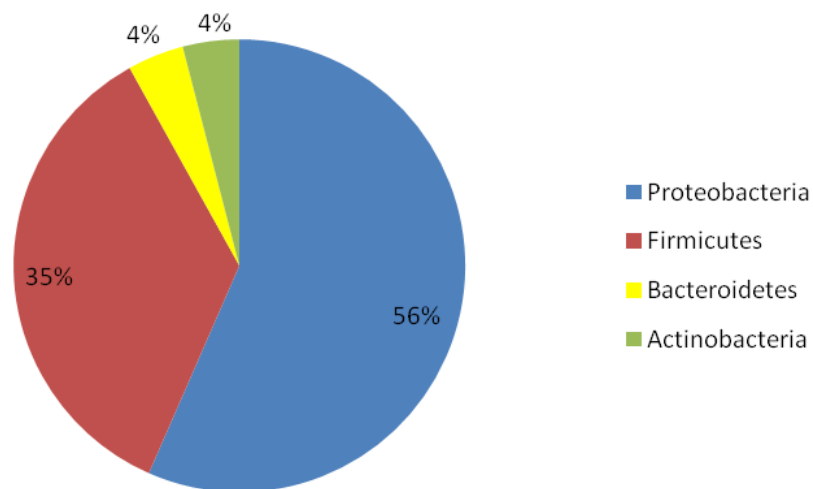


Figura 5: Distribuição filogenética das sequências de rDNA 16S do rejeito Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização (ETEGR).

4.6 – Estimativa da diversidade bacteriana dos rejeitos e das culturas enriquecidas

As curvas de rarefação foram obtidas plotando o número de OTUs em relação ao número de clones sequenciados e podem ser observadas na Figura 6. Uma diminuição na detecção de OTUs foi observada nas curvas LFC e ETEGR, indicando que a maior parte da diversidade pode ter sido alcançada nessas bibliotecas. Esse resultado foi ainda confirmado pelo cálculo da cobertura da biblioteca que foi de 83% para LFC e 89% para ETEGR.

A maior diversidade nas bibliotecas de clones das culturas foi encontrada em ETEGC que apresentou o maior número de OTUs (30) e também o maior índice de diversidade de Shannon (2,2). O índice de diversidade de Simpson, os valores ACE e Chao1 também confirmaram ETEGC como a cultura enriquecida mais diversa (Tabela 3). Em contraste, a maior diversidade foi detectada na biblioteca de clones do rejeito de LFR, com pouca ou nenhuma OTU comum as outras bibliotecas. Atualmente, pouco se sabe a respeito de comunidades bacterianas que habitam resíduos siderúrgicos. Freitas *et. al.* (2008) realizou a primeira avaliação filogenética de bactérias nesse tipo de

ambiente, e diferentemente deste trabalho, encontrou uma maioria de representantes não cultiváveis e além disso, observou uma diversidade bacteriana maior.

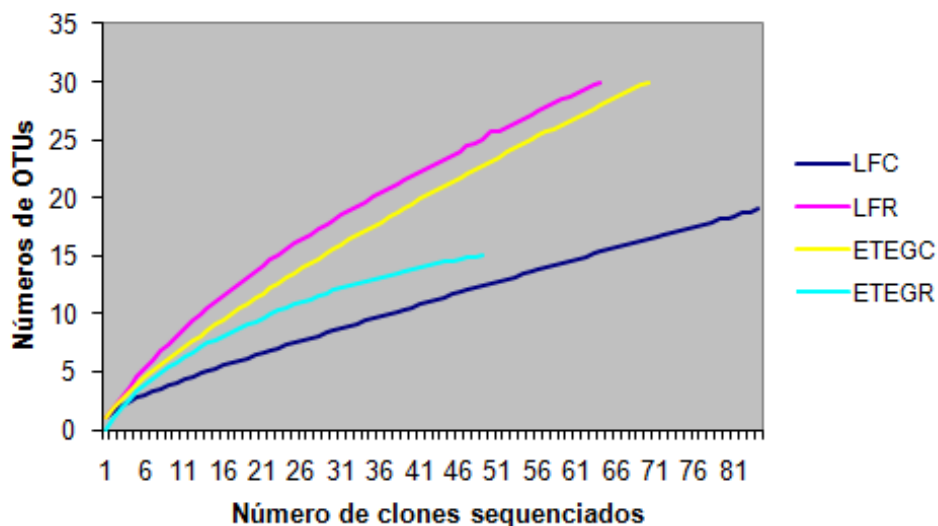


Figura 6: Curva de rarefação representando a cobertura observada das bibliotecas de clones.

4.7 – Comparação das bibliotecas de clones dos rejeitos e das culturas enriquecidas

As bibliotecas de clones construídas tanto das culturas quanto dos rejeitos foram constituídas por diferentes OTUs. O filo predominante foi Proteobacteria, que também foi encontrado em maior abundância por Freitas *et. al.* (2008). Nas culturas enriquecidas, a ocorrência de Proteobacteria foi ainda maior, com proporção acima de 90%, o que pode ser explicado pelo fato deste filo incluir muitas bactérias com diversos estilos de vida e capacidades tróficas (Kersters, *et. al.*, 2003), capazes de sobreviver em condições extremas. Estudos realizados por Zaika *et. al.* (2005) mostraram que o gênero *Shigella* é resistente ao ácido e a sais, sendo capaz de sobreviver em ambientes com pH 2.

Todos os outros filios foram detectados em menor proporção nas bibliotecas de clones das culturas enriquecidas quando comparados com as bibliotecas de seus respectivos rejeitos. Firmicutes, que estava presente em todas as bibliotecas de clones, reduziu de 32% (LFR) para 5%

(LFC) e de 36% (ETEGR) para 5% (ETEGC). Actinobacteria representava 18% dos clones em LFR, reduziu para 1% em LFC e em ETEGC não foi detectado. Na biblioteca de clones de ETEGR, Bacteroidetes representou 4% dos clones e em ETEGC este número diminuiu para 1%. Deinococcus-Thermus foi um filo encontrado exclusivamente em ETEGC.

As árvores filogenéticas das bactérias encontradas nas bibliotecas de clones das culturas e dos rejeitos podem ser observadas nas figuras 7, 8, 9 e 10.



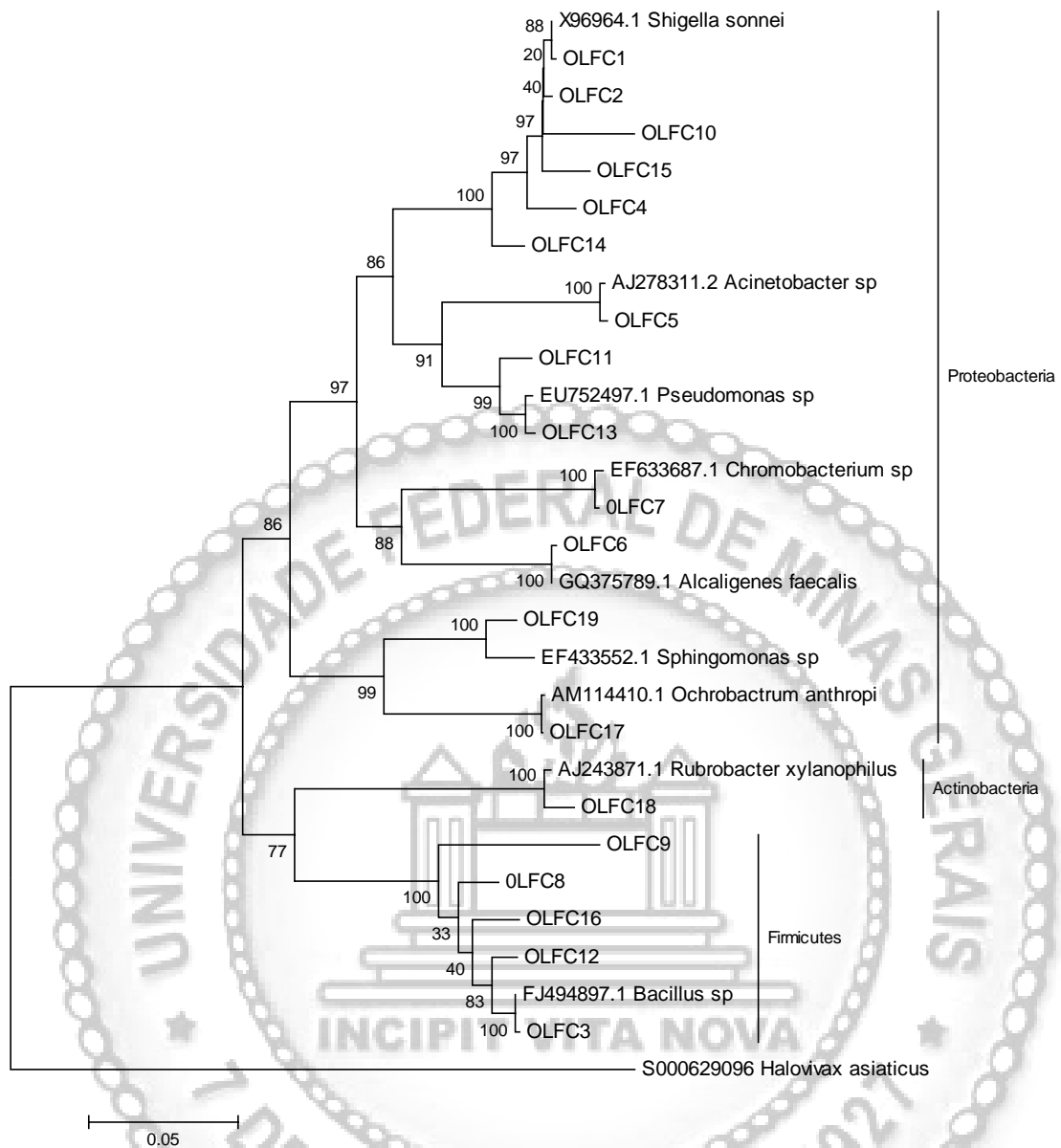


Figura 7: Árvore filogenética mostrando as 19 OTUs obtidas de LFC. A topologia da árvore foi gerada pelo método *Neighbour-Joining* (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%.

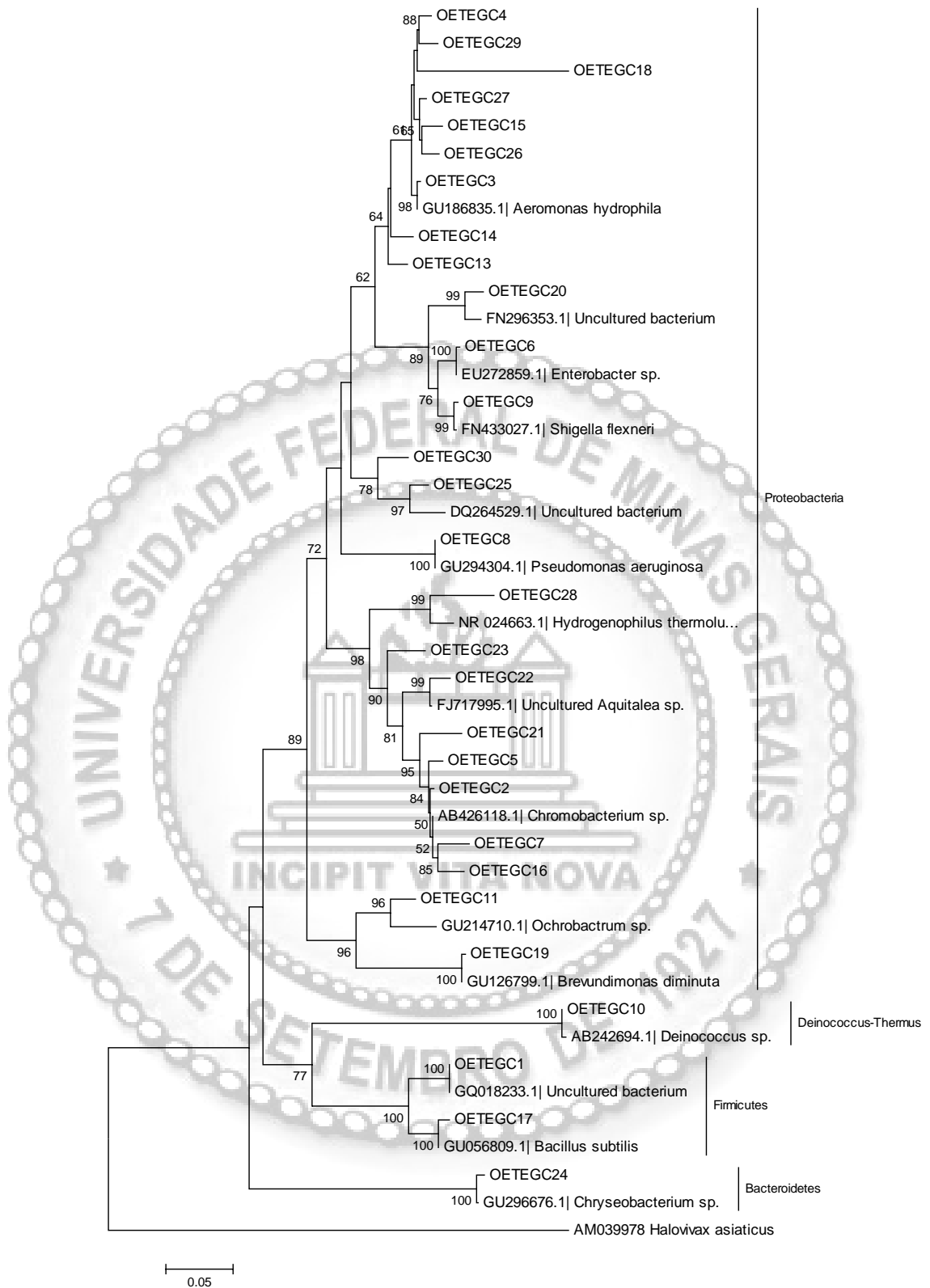


Figura 8: Árvore filogenética mostrando as 30 OTUs obtidas de ETEGC. A topologia da árvore foi gerada pelo método *Neighbour-Joining* (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%.

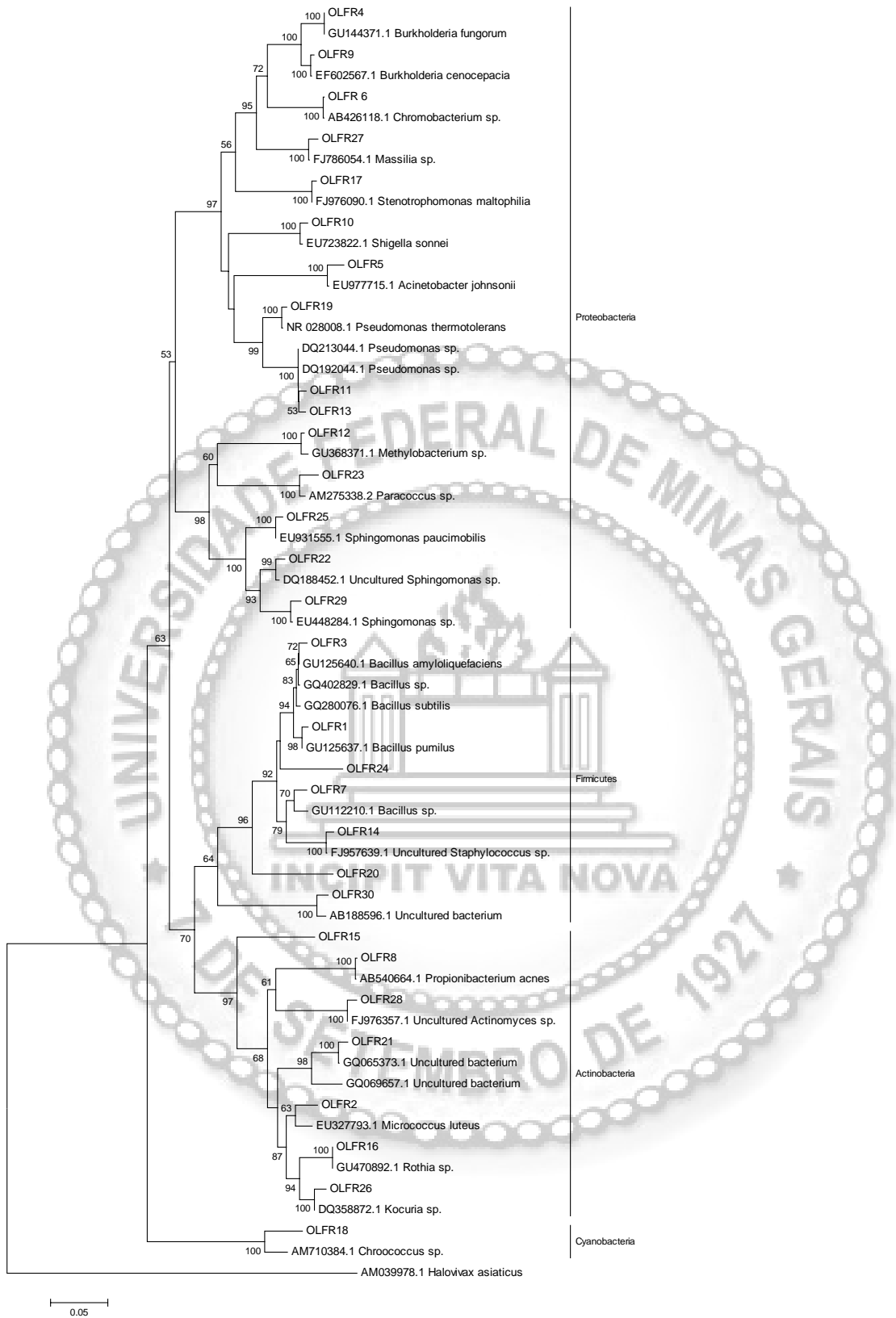


Figura 9: Árvore filogenética mostrando as 30 OTUs obtidas de LFR. A topologia da árvore foi gerada pelo método *Neighbour-Joining* (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%.

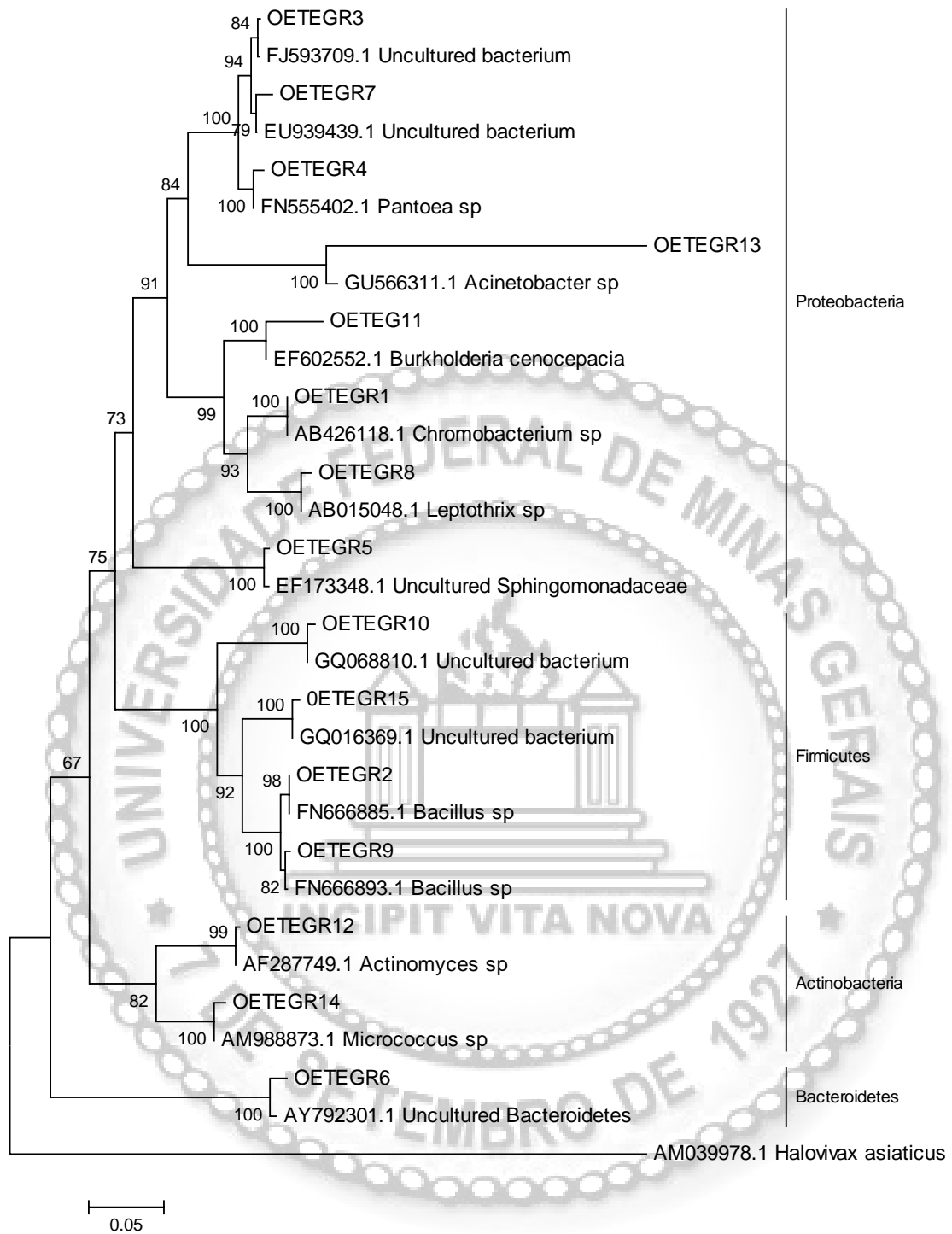


Figura 10: Árvore filogenética mostrando as 15 OTUs obtidas de ETEGR. A topologia da árvore foi gerada pelo método *Neighbour-Joining* (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%.

5. Biolixiviação

A análise química dos rejeitos foi realizada após 30 dias de incubação das amostras com as culturas enriquecidas. Os resultados mostraram uma redução significativa do zinco presente nos rejeitos (Figura 11), sugerindo a ação lixiviadora das bactérias obtidas no consórcio. ETEG, o rejeito mais rico em zinco, 25 - 50%, após o tratamento teve esse número reduzido para 7,5%. Enquanto LF, que continha 2,3% de zinco, apresentou apenas 0,9% deste metal ao final do ensaio de biolixiviação.

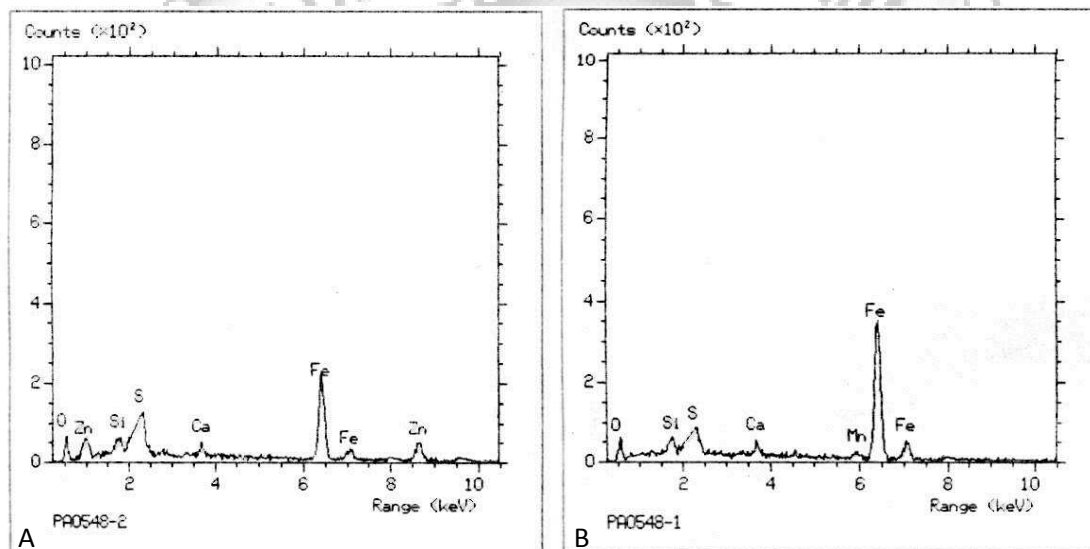


Figura 11: Espectroscopia de fluorescência de raio X das amostras tratadas com o consórcio bacteriano. (A) Estação de Tratamento de Efluentes da Galvanização; (B) Lama Fina.

6. Conclusão

A análise filogenética do gene de rRNA 16S permitiu caracterizar as comunidades bacterianas presentes nos rejeitos de LF e ETEG. Comunidades bacterianas distintas foram detectadas nos rejeitos e suas respectivas culturas enriquecidas, refletindo, provavelmente, as diferenças na composição química e nas condições ambientais das amostras analisadas. Os dados preliminares da biolixiviação sugerem que os consórcios bacterianos obtidos apresentam potencial biotecnológico para lixiviar o zinco presente nesses rejeitos. Considerando que o conhecimento da composição taxonômica de comunidades ambientais é um indicador importante para sua função e ecologia, estes resultados poderão ser úteis para estudos mais completos, incluindo os aspectos ecológicos e econômicos dos processos industriais.



7. Referências Bibliográficas

BABEL, S.; DACERA, D. M. Heavy metal removal from contaminated sludge for land application: A review. *Waste Management*. 26, 988-1004, 2006

BOSIO, V.; VIERA, M.; DONATI, E. Integrated bacterial process for the treatment of a spent nickel-catalyst. *Journal of Hazardous Materials*. 2007

CARLOS, M. C.; LEMES, J. L. S.; RIZZO, A. Remediação de rejeitos industriais empregando microorganismos. *CETEM*, 2007

CHUNBO HAO; HONGXUN ZHANG; RICHARD HAAS; ZHIHUI BAI; BAOGUO ZHANG. A novel community of acidophiles in an acid mine drainage sediment. *World J Microbiol Biotechnol* 23, 15-21, 2007

COUILLARD, D.; MERCIER, G. An economic evaluation of biological removal of heavy metals from wastewater sludge. *Water Environmental Research*. 66, 32-38, 1994.

FOSMIRE, G. J. Zinc Toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 225-227, 1990.

DAHLLOF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin Biotechnol.*, 13, 213-217, 2002

DELONG, E. F. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci* 89, 5685-5689, 1992

FRANÇA, R. G.; FIGUEIREDO, R. F.; FILHO, B. C. Remoção de metais de lodo de esgoto por biolixiviação. *Engenharia Civil-UM*. 19, 2004

FRANCISCO, W. E.; BEVILAQUA, D.; GARCIA, O. Estudo da dissolução oxidativa microbiológica de uma complexa amostra mineral contendo pirita (FeS_2), pirrotita (Fe_{1-x}S) e molibdenita (MoS_2). *Química Nova*. 30, 1095-1099, 2007

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119, 2004.

GHAURI, M. A.; NAKO OKIBE; D. BARRIE JOHNSON. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations. *Hydrometallurgy*, 85, 72-80, 2007

GOEBEL, B. M.; STACKEBRANDT, E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1614-1621, 1994

GURTLER, V.; V. A. STANISICH. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142, 3-16, 1996

HARRISON, J. J.; CERI, H., TURNER, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature*. December, 928-938, 2007

HONG CHEN; YANG, B.; CHEN, X. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China. *Microbiological Research*. September, 2007

KERSTERS K, DE VOS P, GILLIS M, SWINGS J, VANDAMME P, STACKEBRANDT E. Introduction to the *Proteobacteria*. In M. Dworkin et al. (ed.), *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd ed., release 3.12, 28 March 2003 Online Springer-Verlag, New York, N.Y (2003)

KREBS, W.; BROMBACHER, C.; BOSSHARD, P.P.; BACHOFEN, R.; BRANDL, H. Microbial recovery of metals from solids, *FEMS Microbiol*. 20, 605-617, 1997

KUMAR, R. N.; NAGENDRAN, R. Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Chemosphere*. 66, 1775-1781, 2007

KUMAR, R. N.; NAGEDRAN, R. Fractionation behavior of heavy metal in soil during bioleaching with *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Journal of Hazardous Materials*. 169, 1119-1126, 2009

MAKITA, M.; ESPERON, M.; PEREYRA, B.; LOPEZ, A.; ORRANTIA, E. Reduction of arsenic content in a complex galena concentrate by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Biotechnology*, 2004

MARHUAL, N. P., PRADHAN, N., KAR, R. N., SUKLA, L. B., MISHRA, B. K. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Bioresource Technology*. 99, 8331-8336, 2008

MOUSAVI, S. M.; YAGHMAEI, S.; VOSSOUGH, M.; ROOSTAAZAD, R.; JAFARI, A.; EBRAHIMI, M.; CHABOK, O. H.; TURUNEN, I. The effects of Fe (II) and Fe (III) concentration and initial pH on microbial leaching of a low-grade sphalerite ore in a column reactor. *Bioresource Technology*. 99, 2840-2845, 2008

NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONE-SOUZA E. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet. Mol. Res*. 2, 92-101, 2003

- OLSON, G. J.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63, 249-257, 2003
- OZDEMIR, G.; OZTURK, T.; CEYHAN, N.; ISLER, R.; COSAR, T. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technology*, 90, 71–74, 2003
- PATHAK, A., DASTIDAR, M.G., SREEKRISHNAM, T.R. Bioleaching of heavy metals from swege sludge: A review. *Journal of Environmental Management* 90, 2343–2353, 2009
- QUATRINI, R.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S. Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32,606-614, 2005
- RADHIKA, V.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. *Water Research* 40, 3628-3636, 2006.
- RAMOS, F. M. S.; TAVARES, C. R. G., SILVA, F. M. Redução de toxicidade de lodo de curtume por biolixiviação. Anais da 58ª Reunião Anual de SBPC, julho, 2006
- REHMAN, W.; ZEB, A.; NOOR, N.; NAWAZ, M. Heavy metal pollution assessment in various industries of Pakistan. *Environ Geol.* 55, 353-358, 2008
- SCHMEISSER, C.; HELEN STEELE; WOLFGAN R. STREIT. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 955-962, 2007
- SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. *Gene.* 179, 9-19, 1996
- SOLISIO, C.; LODI, A.; VEGLIO, F. Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Waste Management.* 22, 667-675, 2002
- SOUZA, M. L., NEWCOMBE, D., ALVEY, S., CROWLEY, D. E., HAY, A., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. Molecular basis of a consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 178-184, 1998
- TAKEDA, M.; KONDO, K.; YAMADA, M.; KOIZUM, J.; MASHIMA, T.; MATSUGAM, A.; KATAHIRA, M. Solubilization and structural determination of a glycoconjugate which is assembled into the sheath of *Leptothrix cholodnii*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 46, 206–211, 2010

TEIXEIRA, C. M., RAMIRES, I., JÚNIOR, O. C., GUASTALDI, A. C. Aplicação de técnicas eletroquímicas no estudo da dissolução oxidativa da covelita (CUS) por *Thiobacillus ferrooxidans*. *Química Nova*. 25, 20-26, 2005

VIGANO, J. B.; WILBERG, K. Q., KAUTZMANN, R. M., LENZ, D. M. Recuperação de zinco do pó de exaustão de indústria siderúrgica em meio alcalino. *Matéria*, 9, 437-444, 2004

WATKIN, E. L. J.; KEELING, S. E.; PERROT, F. A.; SHIERS, D. W.; PALMER, M. L.; WATLING, H. R. Metals tolerance in moderately thermophilic isolates from a spent copper sulfide heap, closed related to *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 461-465, 2009

XIA L., DAI, S., YIN, C., HU, Y., LIU, J., QIU, G. Comparison of bioleaching behaviors of different compositional sphalerite using *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 845-851, 2009

XIA LE-XIAN, LIU JIAN-SHE, XIAO LI, ZENG JIA, LI BAN-MEI, GENG MEI-MEI, QIU GUAN-ZHOU Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 18, 190-195, 2008

XIA L.; DAI, S.; CHU YIN; HU, Y.; LIU, J.; QIU, G. Comparison of bioleaching behaviors of different compositional sphalerite using *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 36, 845-851, 2009

XIANG, L.; CHAN, L. C., WONG, J. W. C. Removal of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge by isolated indigenous iron-oxidizing bacteria. *Chemosphere*. 41, 283-287, 2000

YOSHIDA, OGAWA, FUJII, N. T., TSUSHIMA, S. Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoate degrading activity by the bacterial consortium of Burkholderia sp. NK8 and Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Journal of Applied Microbiology*. 1364-5072, 2009

ZAICA, L.; PHILLIPS, J. G. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of *Shigella flexneri* strain 5348 under aerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 101, 179-187, 2005

ZENG, J.; JIANG, H.; LIU, Y.; LIU, J.; QIU, G. Expression, purification and characterization of a high potential iron-sulfur protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol Lett*. November, 2007

ZHIGUO HE, XIAO, S., XIE, X. Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of dongxiang copper mine and Yinshan lead-zinc mine. *Extremophiles*. October, 2007

ZHUANG, W; TAY J.; MASZENAN, A.; KRUMHOLZ, L.; TAY, S. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* 36, 251–7, 2003

