

# Série Tecnologia Ambiental

**Biorremediação de solos  
multicontaminados e de áreas  
impactadas pela mineração:  
Acessando a diversidade  
microbiana através do  
sequenciamento de nova geração**

Sandy Sampaio Videira

Cláudia Duarte da Cunha

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Biorremediação de solos multicontaminados e de áreas impactadas pela mineração: Acessando a diversidade microbiana através do sequenciamento de nova geração**

## **PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA**

**Michel Miguel Elias Temer Lulia**

Presidente

## **MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES**

**Gilberto Kassab**

Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

**Elton Santa Fé Zacarias**

Secretário Executivo

**Gustavo Zarif Frayha**

Diretor de Gestão das Unidades de Pesquisa e Organizações Sociais

**Isabela Sbampato Batista Reis de Paula**

Coordenadora-Geral das Unidades de Pesquisa e Organizações Sociais

## **CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL**

**Fernando Antonio Freitas Lins**

Diretor

**Durval Costa Reis**

Coordenador de Administração - COADM

**Robson de Araújo D'Ávila**

Coordenador de Planejamento, Gestão e Inovação - COPGI

**Claudio Luiz Schneider**

Coordenador de Processamento e Tecnologias Minerais - COPTM

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Coordenadora de Processos Metalúrgicos e Ambientais - COPMA

**Francisco Wilson Hollanda Vidal**

Coordenador do Núcleo Regional do Espírito Santo - CONES

**José Antônio Pires de Mello**

Coordenador de Análises Minerais - COAMI

# **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ISSN 0103-7374

ISBN 978-85-8261-094-7

**STA - 105**

## **Biorremediação de solos multicontaminados e de áreas impactadas pela mineração: Acessando a diversidade microbiana através do sequenciamento de nova geração**

**Sandy Sampaio Videira**

Eng. Agrônoma – D.Sc. em Agronomia – Ciência do Solo, Bolsista PCI do CETEM/MCTIC

**Cláudia Duarte da Cunha**

Eng. Química – D.Sc. em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos, Tecnologista sênior do CETEM/MCTIC

**CETEM/MCTIC**

2018

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Luis Gonzaga Santos Sobral**

Editor

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Subeditora

### **CONSELHO EDITORIAL**

Marisa Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio M. Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Sílvia Gonçalves Egler (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos Augusto da Costa (UERJ), Fátima Maria Zanon Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánches (EPUSP), Virginia Sampaio Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minerometalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

**Valéria Cristina de Souza**

Coordenação Editorial

Editores Eletrônica

**Sandy Sampaio Videira**

Revisão

**Ana Maria Silva Vieira de Sá**

CRB7 3982

Catálogo na Fonte

---

Videira, Sandy Sampaio

Biorremediação de solos multicontaminados e de áreas impactadas pela mineração: Acessando a diversidade microbiana através do sequenciamento de nova geração / Sandy Sampaio Videira, Cláudia D. da Cunha \_\_Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2018.

57p.: il. (Série Tecnologia Ambiental, 105)

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos. 3. Drenagem ácida de mina  
I. Centro de Tecnologia Mineral. II. Cunha, Cláudia Duarte. III. Título.  
IV. Série.

CDD – 628.1683

---

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>1   INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2   REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1   Aplicação Ambiental</b>	<b>17</b>
<b>3   CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>



## RESUMO

Como resultado da capacidade imprevisível de se adaptar a diferentes condições ambientais, os micro-organismos habitam em diferentes tipos de nichos biológicos na Terra. Devido ao papel fundamental desses organismos em muitos processos biogeoquímicos, as tendências da microbiologia moderna enfatizam a necessidade de conhecer e compreender a estrutura e a função das comunidades microbianas complexas. Isto é particularmente importante se a estratégia se relaciona com comunidades microbianas que produzem tecnologias limpas, como, por exemplo, a remediação de ambientes contaminados. Até recentemente, a detecção e identificação de micro-organismos que habitavam ambientes em condições adversas baseava-se apenas em métodos dependentes de cultivo. Apesar de muitas vantagens, esses métodos fornecem informações limitadas, uma vez que identificam apenas organismos viáveis capazes de crescer em condições padrão de laboratório. No entanto, para que seja possível compreender e aplicar os processos microbiológicos, para fins ambientais e industriais, é necessário conhecer a composição real das comunidades microbianas e suas atividades. Mais recentemente, técnicas moleculares de alto desempenho, como o sequenciamento de nova geração, tem representado uma alternativa favorável aos métodos tradicionais de cultivo, permitindo uma avaliação mais completa da biodiversidade e a identificação de organismos-chave e rotas metabólicas essenciais envolvidas na remediação de contaminantes pelos micro-organismos. Vale ressaltar, ainda, que os dados moleculares, juntamente com as características ambientais locais, podem servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias-guiadas de cultivo que tenham por finalidade identificar micro-organismos promissores que até então não haviam sido cultivados em laboratório. Diante do exposto, esta revisão apresenta uma compilação de trabalhos publicados em revistas científicas que utilizam o sequenciamento de nova geração, técnica moderna de biologia molecular, para avaliar a diversidade microbiana, bem como sua dinâmica, em solos multi-contaminados e em áreas degradadas contendo drenagem ácida de mina.

**Palavras-chave:** biorremediação; metal; hidrocarbonetos; drenagem ácida de mina; metagenômica.

## **ABSTRACT**

As a result of the unpredictable ability to adapt to different environmental conditions, microorganisms inhabit different types of biological niches on Earth. Due to the fundamental role of these organisms in many biogeochemical processes, the trends of modern microbiology emphasize the need to know and understand the structure and function of complex microbial communities. This is particularly important if the strategy relates to microbial communities that produce clean technologies, such as the remediation of contaminated environments. Until recently, the detection and identification of microorganisms that inhabited harsh environments was based only on culture-dependent methods. Despite many advantages, these methods provide limited information as they identify only viable organisms capable of growing under standard laboratory conditions. However, in order to understand and apply microbiological processes for environmental and industrial purposes, it is necessary to know the actual composition of microbial communities and their activities. More recently, high-performance molecular techniques such as new generation sequencing have represented a favorable alternative to traditional methods of cultivation, allowing for a more complete assessment of biodiversity and identification of key organisms and essential metabolic pathways involved in contaminant remediation microorganisms. It is also worth noting that molecular data together with local environmental characteristics can serve as a basis for the development of new crop-guided strategies aimed at obtaining promising microorganisms that had not previously been cultivated in laboratory conditions. In the light of the above, this review presents a compilation of papers published in scientific journals that use the new generation sequencing, a modern molecular biology technique, to evaluate microbial diversity, as well as its dynamics, in multi-contaminated soils and in degraded areas containing acid mine drainage.

**Keywords:** bioremediation; metal; Hydrocarbons; acid mine drainage; metagenomics.

## 1 | INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas terrestres são conhecidas por serem inacreditavelmente diversas, abrigoando milhares de espécies de procariotos e eucariotos, bem como suas associações. O estudo do nicho destes micro-organismos tem revelado que os mesmos estão envolvidos, direta ou indiretamente, com a grande maioria dos processos ambientais da biosfera, especialmente na área da geoquímica. Dentre as atividades nesta área, podemos destacar a formação e a degradação mineral, a ciclagem de material orgânico e inorgânico, fracionamento químico e isotópico e gênese e degradação de combustíveis fósseis. A degradação mineral microbiana inclui fenômenos como, por exemplo, a intemperização, biolixiviação, a formação de solos e sedimentos, bem como suas transformações. Com relação aos combustíveis fósseis, os micro-organismos se relacionam com a produção de metano, carvão, turfa e petróleo. Além da atuação em processos naturais, algumas atividades podem ser comercialmente exploradas em processos como a extração de metais a partir de minas e rejeitos, gênese de biogás, recuperação terciária de petróleo e biorremediação ambiental (UROZ et al., 2009, GADD et al., 2010; SINGH et al., 2012).

Ao longo de décadas, estes micro-organismos vem sendo estudados, principalmente, através de métodos tradicionais de cultivo em laboratório. Esse tipo de abordagem tem sido essencial para as análises de caracterização bioquímica e fisiológica de culturas puras, bem como para o desenvolvimento e otimização de processos biotecnológicos que utilizam culturas celulares. Por outro lado, esses dados fornecem pouca informação sobre o potencial metabólico da comunidade de micro-organismos e, conseqüentemente, sobre

a taxonomia dos reais responsáveis pelos processos biológicos *in situ* (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2016; SUN et al., 2018). Neste sentido, estudos que utilizam uma abordagem independente de cultivo tem ganhado espaço na área da microbiologia e revolucionado drasticamente o campo da ecologia microbiana. Os primeiros relatos já identificaram, por exemplo, que o número de colônias bacterianas obtidas a partir de meios de cultivo é significativamente menor do que o número de células que realmente estão presentes nos ambientes e que os micro-organismos mais facilmente cultivados em laboratório não representam a microbiota dominante dos ambientes (STEFANI et al., 2015; WU et al., 2016, 2017, SUN et al., 2018).

Somente uma pequena parte dos micro-organismos presentes em amostras ambientais pode ser cultivada e mantida axenicamente ou em comunidades definidas sob condições de laboratório. Esse fenômeno, chamado Grande Anomalia da Contagem em Placa (*Great Plate Count Anomaly*) (Staley 1985) resultou no desenvolvimento de diferentes técnicas de cultivo usando tecnologias avançadas como microfluidos (BOITARD et al., 2015), chips de cultivo (BOUGUELIA et al., 2013), manipulação de células simples (PARKER et al., 2011) e cultivo de alta-performance denominado culturômica (LAGIER et al., 2012). Apesar dessas técnicas terem se expandido imensamente, a grande anomalia da contagem em placa persiste pela combinação de inúmeros fatores, conforme descrito por Dini-Andreote e van Elsas (2013). Esta constatação traz à tona a necessidade de novos métodos de investigação da diversidade microbiana.

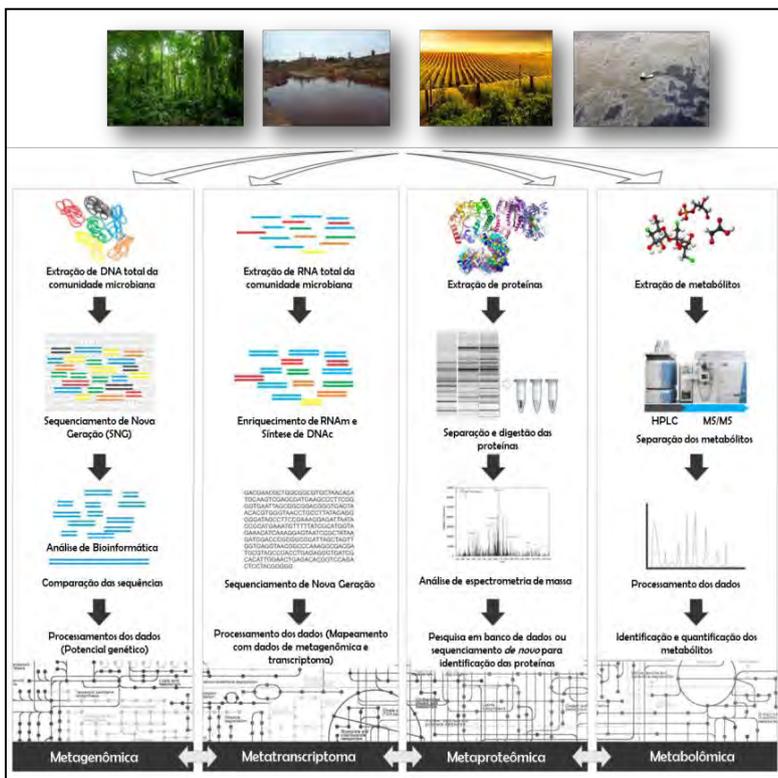
Para enumeração e análise da diversidade microbiana, bem como o potencial das comunidades, as abordagens subsequentes ao cultivo em laboratório se baseavam em técnicas moleculares que usavam marcadores genéticos de DNA para inferir acerca da diversidade. Durante o aprimoramento destas técnicas, muitos conceitos e metodologias, que limitavam o conhecimento das comunidades microbianas, foram parcialmente superados, possibilitando a melhor compreensão e uma visão sistêmica da diversidade microbiana e de sua distribuição (GREEN e BOHANNAN, 2006). Neste contexto, grandes projetos foram iniciados usando esse tipo de abordagem, incluindo o *The Earth Microbiome* (GILBERT et al., 2010, que pretendia sequenciar genomas e metagenomas de um grande número de biomas. Além dessa iniciativa, outras propostas sugeriram, como o Projeto Microbioma Brasileiro - que visa coletar e comparar, de forma sistemática, informações sobre a diversidade microbiana em diversos ambientes (PYLRO et al., 2014).

As abordagens moleculares ou independentes de cultivo são baseadas na detecção e análise de ácidos nucleicos (*i.e.*, DNA ou RNA) extraídos diretamente de amostras ambientais. Este tipo de estudo é baseado em marcadores filogenéticos para identificação de espécies microbianas (gene 16S rRNA para bactérias e arqueias e 18S rRNA ou ITS para fungos) e genes funcionais como, por exemplo, os genes envolvidos na degradação de substâncias recalcitrantes e nos ciclos biogeoquímicos de C, N, P, K e S (LAURIE e LLOYD-JONES, 2000; YANG et al., 2015). Os dados gerados por estas análises geram informações mais reais sobre a estrutura, abundância, composição e o potencial das comunidades (ANDREOTE et al., 2009). Adicionalmente, neste tipo de abordagem tem sido

possível identificar tanto os membros mais abundantes como aqueles presentes em baixo número (biosfera “rara”), que tem se mostrado de grande relevância ambiental, uma vez que respondem rapidamente a perturbações ambientais (WANG et al., 2017).

A utilização massiva das informações geradas por estas técnicas, juntamente com o avanço de ferramentas para análise dos dados (bioinformática), tem sido tão expressiva nos últimos anos que deu origem a um novo campo de estudo denominado Ômicas; que tem por finalidade ampliar a exploração de sistemas complexos usando uma abordagem holística e não reducionista à pesquisa biológica (WHITE et al., 2017). De maneira geral, esta abordagem combina informações sobre o potencial genômico de diversos ambientes e as transformações que ocorrem em resposta a mudanças ambientais, uma vez que a simples presença do gene não implica na sua expressão e, menos ainda, na tradução e atividade da proteína relacionada. Este conjunto de análise de comunidades microbianas inclui o estudo do Metagenoma (DNA), Metatranscriptoma (mRNA), Metaproteoma (proteínas) e Metaboloma (metabólitos) (Figura 1). O termo metagenoma se refere à coleção de genomas dos micro-organismos presentes em determinado ambiente, representando o potencial taxonômico e funcional do ecossistema. Metatranscriptoma representa os genes funcionais que são transcritos (potencialmente ativos) num dado tempo de amostragem, representando a expressão funcional e taxonômica, bem como a regulação ao nível transcricional do ecossistema. Devido à complexa regulação da expressão gênica a nível transcricional e/ou traducional, a metaproteômica representa uma imagem mais clara dos genes que foram

expressos no momento da amostragem. Já a metabolômica, se refere a todos os metabólitos (açúcares, lipídios etc.) produzidos por uma comunidade microbiana, representando os produtos das vias metabólicas dentro de um ecossistema (WHITE et al., 2017).



Fonte: adaptado de Rodríguez et al. (2015).

**Figura 1.** Ilustração das principais etapas nas abordagens de metagenômica, metatranscriptômica, metaproteômica e metabolômica.

Estes tipos de análise apareceram no mercado por volta de 2005 e eram utilizadas, principalmente, na área da saúde. No entanto, com a otimização dos protocolos para extração de ácidos nucleicos e das plataformas de trabalho, o que acarretou numa consequente redução dos custos, sua utilização foi ampliada para as diferentes áreas de pesquisa que envolvem sistemas biológicos complexos. Mais recentemente, o aumento exponencial do volume de dados gerados pelas multi-ômicas está diretamente relacionado ao desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de alto-desempenho ou de nova geração (SNG) (Box 1); que permite uma análise mais detalhada da diversidade, abundância e funcionalidade de toda a comunidade microbiana, bem como sua dinâmica durante e após modificações das condições ambientais naturais. Nesta tecnologia milhões de sequências de DNA podem ser analisadas paralelamente, aumentando o rendimento, rapidez e precisão das análises.

Diante do exposto, torna-se claro que estas novas abordagens oferecem a possibilidade de explorar a diversidade genética e fisiológica de um ecossistema, gerando informações sobre **Quem** são os micro-organismos presentes nas comunidades, **O que** eles estão fazendo e **Como** interagem para manter o equilíbrio ou a transformação ambiental. Atualmente, essas técnicas inovadoras constituem a chave para estudar os micro-organismos e suas atuações nos mais diversos processos biológicos, melhorando a compreensão sobre o funcionamento dos ecossistemas, e disponibilizando informações relevantes para otimização de processos biotecnológicos que podem ser aplicados com fins industriais e ambientais.

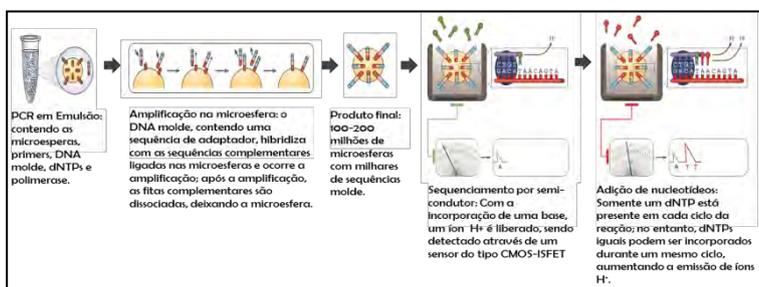
### BOX 1 -Sequenciamento de nova geração (SNG)

*De maneira geral, as plataformas que realizam o SNG tem a capacidade de “ler” até bilhões de fragmentos de DNA ao mesmo tempo, permitindo a geração mais rápida e completa de perfis genômicos de amostras ambientais com um custo relativamente acessível. O lançamento da primeira plataforma de sequenciamento de alto desempenho ocorreu em meados dos anos 2000, proporcionando uma queda de 50.000 vezes no custo do sequenciamento do genoma desde o Projeto Genoma Humano. Este fato fez com que esse tipo de tecnologia fosse renomeado, passando a ser chamada de (SNG). Ao longo da última década, as tecnologias SNG continuaram a evoluir - aumentando de 100-1000 vezes sua capacidade de análise (KIRCHER e KELSO, 2010) - e incorporando inovações para enfrentar as complexidades dos genomas e sistemas biológicos complexos (GOODWIN et al., 2016).*

*Dentre as plataformas utilizadas atualmente para SNG está a Ion Torrent (Life Technologies), que se diferencia das demais por não utilizar bases marcadas por fluoróforos e câmeras de detecção a laser para identificar as bases que são incorporadas ao longo da reação de polimerização; reduzindo, dessa forma, a complexidade do equipamento e o custo da reação de sequenciamento. Além disso, a plataforma oferece diferentes tipos de chips e instrumentos que permitem maior ajuste às necessidades dos pesquisadores. A capacidade dos chips para leitura das amostras varia de 50 MG a 15 Gb, com tempos de execução de 2 a 7 horas, tornando-a mais rápida do que a maioria das outras plataformas disponíveis.*

*De maneira geral, nesta tecnologia, os fragmentos de DNA (sequências gênicas ou fragmentos genômicos) são ligados a adaptadores específicos e posteriormente submetidos a PCR em emulsão. Nesta reação, os fragmentos de DNA se ligam a*

*microesferas através de adaptadores complementares, e em conjunto com os demais reagentes necessários para uma reação de PCR, onde são geradas milhares de cópias de cada fragmento de DNA presente na amostra. Após este processo de enriquecimento, as microesferas, os reagentes e soluções de sequenciamento são depositados em um chip de silício que contém milhões de poços com diâmetro suficiente para alojar uma única microesfera. As reações de polimerização são realizadas em ciclos, aos quais são incorporados um tipo de nucleotídeo de cada vez. A medida que cada nucleotídeo é incorporado, é gerado, naturalmente, um íon  $H^+$  como subproduto. A liberação deste próton resulta na mudança do pH da solução que é detectada por um semiconductor do tipo CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) e um transistor do tipo ISFET (ion-sensitive field-effect transistor), e convertida em um sinal elétrico (Figura B1). Após a introdução de uma base nucleotídica, as bases não incorporadas são lavadas e uma nova base é introduzida (ROTHBERG et al., 2011; GOODWIN et al., 2016). Estes ciclos se repetem até o sequenciamento completo dos fragmentos de DNA das amostras.*



Fonte: Adaptado de Goodwin et al., 2016.

**Figura B1.** Etapas gerais do sequenciamento de nova geração usando a plataforma Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) (Life Technologies).

## 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 | Aplicação Ambiental

Os primeiros estudos de metagenômica foram focados em ambientes de baixa diversidade, como o intestino humano, a drenagem ácida de mina e amostras de água do mar, principalmente devido à indisponibilidade de tecnologias eficientes de sequenciamento de DNA e ferramentas robustas de bioinformática para análise dos dados (HIRAOKA et al., 2016). Posteriormente, com o desenvolvimento do SNG houve maior facilidade de acesso a este tipo de tecnologia e os mais variados ecossistemas têm sido estudados, incluindo ambientes contaminados com compostos orgânicos e ambientes extremos com alta acidez, baixo nível de oxigênio e alta concentração de metais. Como os dados gerados pelo SNG revelam a diversidade e o potencial da comunidade microbiana, esse tipo de estudo tem sido aplicado com fins biotecnológicos, principalmente na área de produção de tecnologias limpas, como, por exemplo, na biorremediação de ambientes contaminados por diversos poluentes, incluindo os orgânicos (como hidrocarbonetos e pesticidas) e/ou inorgânicos (como metais, tais como Mn, Cr, Cd, Zn, Pb, As etc.). Em função do grande número de aplicações ambientais para o SNG, neste documento serão abordadas somente aplicações de metagenômica para identificação de diversidade e funcionalidade microbiana em solos multi-contaminados e em drenagem ácida de mina.

### 2.1.1 | Solos multi-contaminados

Devido às atividades antropogênicas, especialmente aquelas relacionadas à indústria petrolífera, grandes áreas em todo o mundo têm sido expostas a poluentes orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e metálicos, como Cu, Zn, Pb, As e Ni. Ambos os tipos de contaminantes tem gerado um grande interesse nas últimas décadas devido as suas propriedades mutagênicas e cancerígenas e, além disso, são recalcitrantes e permanecem longos períodos no ambiente (HENTATI et al., 2013; KIM et al., 2015).

Em função dos efeitos nocivos provocados pelos contaminantes em questão, muitas tecnologias têm sido desenvolvidas e aplicadas a fim de minimizá-los. A grande maioria dos métodos de remediação tradicionais (físico-químicos) é extremamente dispendiosa, principalmente devido ao custo de escavação e transporte de grandes quantidades de materiais contaminados para tratamento *ex situ* (VARJANI e SRIVASTAVA, 2015; VARJANI et al., 2017). O aumento dos custos e a eficiência limitada destes tratamentos estimularam o desenvolvimento de tecnologias alternativas para aplicação *in situ* baseada, particularmente, na capacidade de remediação biológica do próprio ambiente (biorremediação) (BELL et al., 2014; VARJANI et al., 2017).

A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (micro-organismos ou plantas), que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, estes contaminantes em substâncias inertes ou compostos menos nocivos (WOLICKA et al., 2009). No âmbito microbiológico, estes processos podem ser

realizados naturalmente por micro-organismos endógenos (atenuação natural), por manejo do ambiente para estimulação de micro-organismos endógenos (bioestimulação) e/ou pela adição de micro-organismos exógenos (bioaumento) (VARJANI e UPASANI, 2016).

Estas técnicas têm sido desenvolvidas desde 1940, mas só ganharam popularidade em 1980 devido ao derramamento de petróleo da Exxon Valdez (BRAGG et al., 1994). Mais recentemente esta tecnologia vem sendo utilizada em vários países e, em certos casos, apresenta menor custo, maior eficiência na remoção dos contaminantes quando comparada às técnicas físicas e químicas, além de ser considerada uma técnica ambientalmente amigável (LU et al., 2014). Em função dos resultados promissores, já tem sido utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas com óleo (QIN et al., 2013; FUENTES et al., 2014; HELMY et al., 2015).

Na aplicação das diversas tecnologias de biorremediação torna-se evidente que uma das primeiras etapas para definir a melhor estratégia a ser aplicada é o conhecimento sobre a diversidade e o potencial da microbiota do local a ser recuperado. Por muitos anos os estudos de ecologia microbiana eram baseados simplesmente em métodos clássicos de isolamento e cultivo em laboratório; nos quais se determinavam a taxonomia e a habilidade de degradação dos poluentes pelos micro-organismos. Estes ensaios têm a capacidade de inferir sobre o potencial metabólico da comunidade microbiana com base na taxonomia e ensaios controlados dos micro-organismos de forma isolada. No entanto, os solos são ambientes extremamente complexos, onde ocorrem diferentes formas de interação

geomicrobiológica. Por isso, os estudos independentes de cultivo que revelam, de forma mais ampla, a estrutura e funcionalidade das comunidades, bem como sua dinâmica, têm ganhado espaço na área de biorremediação.

Mais recentemente, os trabalhos têm revelado que a diversidade microbiana dos ambientes contaminados, avaliada pelos métodos cultiváveis, é extremamente subestimada (MENDES et al., 2013; STEFANI et al., 2015), e ignoram informações sobre a dinâmica da população durante o processo, bem como a identidade e atividade de microorganismos-chave para os processos de remediação, que nem sempre são cultiváveis (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2016). Diante destas evidências, as ferramentas moleculares, especialmente a metagenômica, têm sido aplicada e ampliado, significativamente, o conhecimento da ecologia microbiana em ambientes contaminados, servindo como base para otimização de estratégias de biorremediação.

Inicialmente, os estudos eram focados, basicamente, na determinação da diversidade microbiana dos solos contaminados e os resultados revelavam grandes mudanças da comunidade, principalmente a diminuição significativa da diversidade. Por muitos anos, este fato foi utilizado como principal fator responsável pela baixa eficiência de degradação dos poluentes (RON e ROSENBERG, 2014); no entanto, mais recentemente, com o grande volume de dados relacionados à taxonomia das comunidades e à composição de genes presentes, tem-se verificado que a diminuição da diversidade microbiana pode não afetar a eficiência de degradação dos elementos tóxicos.

Jung et al. (2016), através de ensaios em microcosmos, identificaram a redução ou alteração da diversidade bacteriana pela contaminação com hidrocarbonetos (óleo diesel) e, assim como outros autores, atribuíram este fato à toxicidade do diesel. Entretanto, quando os autores avaliaram o efeito da perda de diversidade no potencial da comunidade para degradar o diesel, através da detecção de genes relacionados à oxidação de alcanos, observaram que a redução da diversidade não modificou a abundância dos genes funcionais, que foi 13 vezes maior nas comunidades onde havia menor diversidade. Esses resultados mostraram correlação positiva com os dados encontrados nos testes de degradação do diesel, que foi mais eficiente nas comunidades de menor diversidade bacteriana. Neste mesmo trabalho, os autores mostram que, com relação às mudanças na comunidade, os grupos Proteobacteria e Actinobacteria foram os mais abundantes. Levando em conta sua prevalência e capacidade de degradação, a redução da diversidade microbiana, causada pela adição de hidrocarboneto, que é tóxico para a maioria dos micro-organismos, pode ter proporcionado condições mais favoráveis para aumento de Proteobacteria e Actinobacteria, refletindo, positivamente, na degradação dos poluentes. Esses grupos bacterianos são comumente encontrados em ambientes contaminados e tem demonstrado alto potencial de degradação de substâncias recalcitrantes (ALVAREZ et al., 2017). De maneira geral, os autores concluem que a mudança na abundância dos organismos pode produzir condições ótimas para grupos microbianos com funções ecológicas específicas (JUNG et al., 2016).

Morais et al. (2016) avaliando o efeito da contaminação de petróleo na mudança da comunidade microbiana (arqueia, bactéria e fungo) de solos da Ilha de Trindade, usando SNG, também identificaram uma redução significativa na diversidade dos micro-organismos após adição de óleo, sendo a comunidade de fungos a mais sensível, com redução de quase 40% do total das espécies observadas. As comparações taxonômicas mostraram que, com adição do óleo cru, houve aumento significativo na abundância do filo Actinobacteria, principalmente do gênero *Nocardia*, que representava menos de 0,01% do total de sequências nas amostras controle e aumentou para 9,4% das sequências nas amostras contendo óleo cru. Mudanças menos expressivas também foram identificadas em diversas classes de Proteobacteria e Archaea, principalmente *Nitrososphaerales*. Esses resultados corroboram outros dados da literatura, e reforçam a premissa de que Actinobacteria é uma opção promissora para degradação de hidrocarbonetos recalcitrantes, uma vez que produzem enzimas extracelulares que degradam uma grande variedade de hidrocarbonetos complexos. Além disso, muitas espécies de Actinobacteria são capazes de produzir biossurfactantes que aumentam a solubilidade e biodisponibilidades de hidrocarbonetos (SILVA et al., 2015; MORAIS et al., 2016). Estes resultados têm sido tão expressivos que diversas estratégias de uso de Actinobacteria têm sido aplicadas como, por exemplo, a bioestimulação e o bioaumento, com e sem o uso de culturas mistas (ALVAREZ et al., 2017). Estas estratégias tem sido eficientes para biorremediação de diversos ambientes contaminados, principalmente para os multicontaminados com compostos orgânicos e inorgânicos. Estes ambientes são difíceis de

remediar uma vez que os metais pesados, por exemplo, podem inibir a biodegradação dos compostos orgânicos. No entanto, trabalhos recentes têm destacado estirpes de Actinobacteria capazes de bioacumular metais e degradar pesticidas, simultaneamente (ALVAREZ et al., 2017; APARICIO et al., 2017).

Actinobacteria, juntamente com Firmicutes e Bacteroidetes, também foram identificados por Luisa et al. (2015), quando avaliaram a diversidade microbiana e a biodegradação em amostras de solo contendo uma mistura de diesel e biodiesel (9:1) durante 28 dias em microcosmos. A abundância de cada grupo variou de acordo com a técnica aplicada; na atenuação natural, por exemplo, Actinobacteria foi a mais abundante, seguida por Bacteroidetes e Firmicutes. Quanto aos testes de biodegradação, os autores verificaram que o tratamento de bioaumento com bactérias autóctones, ou seja, obtidas do próprio local contaminado, mostrou maior redução de TPH (25%) quando comparado tanto com a atenuação natural quanto com a bioestimulação e bioaumento com bactérias exógenas, oriundas de outros ambientes. Estes resultados encontram-se em consonância com outros da literatura, que mostram que os indivíduos autóctones são mais adaptados àquela condição e, por isso, apresentam melhor eficiência metabólica e competitividade na degradação de poluentes. Vale ressaltar que os micro-organismos nos solos raramente ocorrem como organismos individuais; em vez disso, eles vivem em comunidades complexas com diferentes níveis de interações, o que pode influenciar diretamente a eficiência de degradação de poluentes, incluindo os hidrocarbonetos (ZAFRA et al., 2016). Além disso, por se tratar de um sistema complexo com muitas interações, o sucesso da biorremediação

não depende somente das características metabólicas e atividade dos micro-organismos; também devem ser consideradas as características de cada solo, tais como umidade, temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, nutrientes e concentração de hidrocarbonetos e metais pesados, por exemplo (SUJA et al., 2014; VARJANI e UPASANI, 2017).

Além da estrutura, composição e dinâmica das comunidades microbianas, as abordagens metagenômicas de ambientes poluídos têm levado à descoberta de um número crescente de novas famílias gênicas e à existência de vias metabólicas desconhecidas de degradação em comunidades microbianas, principalmente relacionadas com bactérias ainda não cultivadas (BOUHAJJA et al., 2016; WANG et al., 2017). Embora o avanço nesta área seja evidente e indiscutível, e apesar do custo decrescente do sequenciamento de nova geração e do aumento da sofisticação de métodos computacionais para análise de dados, a metagenômica ambiental continua dominada por estudos descritivos "instantâneos" (com base em amostras de um único ponto e local) que fornecem informações sobre a composição da comunidade e a atividade potencial, mas não sobre a estabilidade da comunidade, resiliência e resistência à mudança (PROSSER et al., 2015). Além da necessidade de expandir as amostragens para estudo da dinâmica de populações, a metagenômica por si descreve o potencial funcional das comunidades na presença de poluentes; por isso, estes estudos devem ser utilizados em conjunto com metatranscriptômica (análise do grupo de mRNA de uma comunidade por sequenciamento de cDNA) (PROSSER, 2015), metaproteômica (Análise do grupo de proteínas de uma comunidade) (PAN e BANFIELD, 2014) e

metabolômica (análise do grupo de metabólitos em uma comunidade) (LONGNECKER et al., 2015), a fim de ter uma visão global da dinâmica e funcionalidade microbiana em ambientes poluídos e, conseqüentemente, servir de base para o desenvolvimento e otimização de estratégias de biorremediação.

### 2.1.2 | Drenagem ácida de mina

A indústria de mineração beneficia e processa milhões de toneladas de minérios todos os anos, e deste total, mais de 90% é considerado resíduo; que são dispostos em forma de pilhas (rocha residual) ou barragens (DUNBAR, 2017, FALAGÁN et al., 2017). As características destes resíduos variam em função da composição química do material de origem, do tipo de mineração e da forma como o mineral foi processado. De maneira geral, estes materiais tem pouco valor econômico quando comparados com as rochas brutas; no entanto, podem conter metais de transição como ferro, cobre, arsênio, níquel e zinco, em teores relativamente elevados e, ocasionalmente, metais preciosos como ouro e prata, que não tenham sido separados na etapa de flotação (AHMADDI et al., 2015). Além disso, quando estes rejeitos são expostos ao oxigênio e a água, é desencadeada a dissolução oxidativa dos minerais, gerando a drenagem ácida de mina (DAM), que é um grave problema ambiental com distribuição global (CHEN et al., 2016).

A DAM é resultante da oxidação de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) e outros sulfetos minerais que ocorre quando, no processamento mineral, estes minerais são expostos ao ar e/ou a água. A formação de DAM ocorre naturalmente, mas a atividade

microbiana aumenta sua taxa de formação e parece ser responsável pela maior parte da drenagem gerada. Este sistema se caracteriza pela elevada acidez ( $\text{pH} < 3,5$ ), altas concentrações de ânions sulfato ( $\sim 2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e cátions metálicos como Mn, Cr, Cd, Pb, As etc. (CHEN et al., 2016). Esse percolado, DAM, é capaz de contaminar solos, águas superficiais e subterrâneas, permanecendo por um longo período nesses ecossistemas. Diante deste fato, o principal desafio tem sido buscar uma forma de impedir a acidificação dos rejeitos de minas ao longo da operação e recuperar os rejeitos já acidificados, em minas abandonadas (KALINA et al. 2011).

A remediação desses ambientes inclui diferentes estratégias físico-químicas e biológicas. A neutralização química da acidez das águas residuais é, sem dúvida, a mais utilizada; no entanto, o calcário utilizado neste processo pode formar uma camada impermeável de hidróxido metálico que diminui a eficiência de precipitação. Já a utilização de processo biológico no tratamento de DAM tem sido considerada uma estratégia promissora, visto que (i) apresenta menor custo e maior facilidade de implantação quando comparada as tecnologias convencionais, (ii) os contaminantes são geralmente degradados por completo, não sendo transferido para outros meios, além de (iii) permitir a precipitação e, conseqüente, recuperação diferencial de metais (MUYZER et al., 2008).

Apesar da acidez extrema, calor e altas concentrações de sulfato e metais tóxicos, os sistemas contendo DAM abrigam micro-organismos metabolicamente ativos, que são muito bem adaptados e desempenham papéis essenciais nestes ecossistemas (UTGIKAR et al., 2002). Estes organismos formam uma biosfera quimiolitotrófica sustentada por doadores

de elétrons derivados de sulfetos,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  e  $\text{N}_2$  do ar, e sua diversidade varia de acordo com pH, temperatura, constituição do minério e concentrações de metais (BAKER e BANFIELD, 2003). Em função de seu metabolismo cosmopolita e, conseqüentemente, à sua capacidade de sobrevivência em ambientes extremos, esses micro-organismos apresentam grande potencial para a biomineração e a remediação biológica de DAM. Em geral, enquanto a biomineração se beneficia com a atuação de micro-organismos que oxidam ferro e enxofre, as atividades dos redutores de sulfato são vitais em sistemas de tratamento biológico de efluentes (DAM). A biomineração foi bem estabelecida e é amplamente aplicada mundialmente, o que não acontece na remediação biológica de DAM (HEDRICH e JOHNSON, 2014). Embora muitas tentativas tenham sido desenvolvidas para DAM, e existam alguns processos com resultados satisfatórios (JOHNSON e HALBERG, 2005), é necessário um conhecimento mais amplo da estrutura e dinâmica da comunidade microbiana para que seja possível produzir opções biotecnológicas mais viáveis, tanto do ponto de vista ambiental como econômico.

Vale ressaltar, ainda, que os sistemas biológicos são complexos e sua funcionalidade está diretamente relacionada ao consórcio microbiano, ou seja, conjunto de diferentes grupos de micro-organismos. Este fato torna mais difícil a identificação de organismos-chave que executam funções específicas como, por exemplo, a degradação de compostos recalcitrantes ou a transformação de metais (ZAFRA et al., 2017). Na DAM, o consórcio microbiano, para uma função específica, pode incluir várias espécies e/ou diferentes estirpes de uma única espécie, com diferenças nos potenciais metabólicos, provavelmente devido aos múltiplos micro-nichos

formados neste tipo de ecossistema; mas, os estudos envolvendo micro-habitats em DAM ainda são escassos (MESA et al., 2017; TENG et al., 2017).

A riqueza de espécies relativamente baixa, a fonte de recursos limitados e a estreita relação entre os processos biológicos e geoquímicos tornam o sistema contendo DAM um modelo promissor para estudos de ecologia microbiana, especialmente com base nas análises moleculares (independentes de cultivo). O primeiro estudo usando abordagens moleculares associado à DAM foi feito por Tyson et al. (2004) com biofilme em diferentes regiões de Richmond Mine em Iron Mountain, Califórnia. Nesse trabalho, os autores identificaram a dominância de poucas espécies e genes de resistência a metais e vias metabólicas relacionadas a ambientes adversos. Além disso, reconstruíram o genoma de um membro ainda não cultivado de *Nitrospirae* a partir do metagenoma do biofilme de DAM. A reconstrução do genoma revelou um único *operon* para fixação de nitrogênio. Baseados nesta informação, Tyson et al. (2005) desenvolveram um meio de cultivo livre de nitrogênio e utilizaram condições de cultivo similares às ambientais, com altas concentrações de metais pesados, pH 0,8 e 37°C. Desta forma, eles obtiveram sucesso na obtenção de culturas puras de um membro do grupo III de *Leptospirillum*, que posteriormente foi descrito como uma nova espécie, *L. ferrodiazotrophum*.

Posteriormente, com o avanço das técnicas moleculares, um grande volume de informações vem sendo agregado ao nosso conhecimento, incluindo a detecção de raras e novas espécies, novas famílias gênicas e vias metabólicas, além dos fatores ambientais que, direta ou indiretamente, determinam os padrões das comunidades microbianas em sistemas complexos

como minas de níquel, pirita, cobre, magnetita, hematita, zinco e calcopirita (Méndez-Garcia et al., 2014; Chen et al., 2016; Gupta et al., 2017; Mesa et al. 2017).

Recentemente, Mesa et al. (2017), usando técnicas de sequenciamento de nova geração para análise da diversidade microbiana em micro-habitats de uma mina abandonada de mercúrio em Los Rueldos (Espanha), identificaram a presença dominante de *Leptospirillum* sp no domínio Bacteria e da classe *Thermoplasmata* em Archaeae. Com base na composição da comunidade microbiana total, os autores fizeram uma análise de predição funcional da comunidade em Los Rueldos, inferida pelas capacidades metabólicas previamente descritas dos micro-organismos detectados. A partir da análise destes dados, Mesa et al. (2017) propuseram um modelo que integra a diversidade e a função prevista nos micro-habitats de Los Rueldos (mineral, água e biofilme). De maneira geral, os autores descrevem que *Leptospirillum* spp., Acidithiobacillales e Betaproteobacteria são os prováveis responsáveis pela oxidação do ferro e enxofre dos minerais (S e ST), água (WOUT, WEN e WIN) e amostras de biofilme (BS, B1A, B1B, B2 e BF). A distribuição do oxidante de ferro neutrofílico, *Gallionella*, foi restrita a estalactite (ST). Os fixadores de carbono foram previsivelmente fotossintéticos em lagoas de água fora da galeria e foram principalmente representados por cianobactérias. Sugere-se que espécies/estirpes de *Leptospirillum* spp. sejam as responsáveis pela fixação inorgânica de carbono e nitrogênio em todos os micro-habitats dentro da galeria. A decomposição de matéria orgânica na drenagem acumulada fora da galeria (WEN) apoiaria a vida de membros da comunidade heterotrófica (Fungos, Protozoários, Proteobactérias e Arqueia) neste compartimento. A matriz

polimérica extracelular dos biofilmes constituirá a principal fonte de carbono dentro da galeria, apoiando o estilo de vida heterotrófico dos grupos microbianos mais abundantes presentes na caverna (Ciliados, Proteobacterias e Archaeae). Os ciliados presentes no biofilme podem ter um impacto na estrutura populacional dos membros bacterianos da comunidade e a presença de diferentes gêneros em distintos estratos do biofilme provavelmente se relaciona com a composição diferencial da comunidade bacteriana, sugerindo adaptação a variáveis ambientais distintas.

Como a DAM é considerada um ambiente extremo, os relatos da literatura mostram que a comunidade microbiana é tipicamente composta por poucas espécies dominantes e uma grande diversidade de espécies raras (SOGIN et al. 2006, LILJEQVIST et al., 2015). Estudos mais recentes, baseados em sequenciamento de DNA, ratificam a existência de espécies raras em vários ambientes de DAM. Liljeqvist et al. (2015), por exemplo, analisaram o DNA total associado à mina Kristineberg, no norte da Suécia, com o objetivo de identificar os micro-organismos e evidenciar, com base em análises metagenômicas, como os acidófilos eram capazes de crescer em baixas temperaturas. Nas amostras de biofilme e plânctons eles identificaram que o ambiente era dominado por poucas espécies, e o micro-organismo mais abundante apresentou similaridade com o acidófilo psicrotolerante, *Acidithiobacillus ferrivorans*. Com relação às sequências metagenômicas funcionais, houve maior similaridade com sequências de *Acidithiobacillus-like*, *Acidobacteria-like* e *Gallionellaceae-like* relacionadas a proteínas de choque-frio, vias para produção de solutos e proteínas anti-congelamento. Além disso, também identificaram micro-organismos capazes de fixar nitrogênio e

carbono, com estilo de vida autotrófico dirigido pela oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  e compostos de enxofre inorgânico presentes nas águas da mina.

A DAM é um ecossistema oligotrófico, ou seja, com baixa disponibilidade de elementos essenciais para o metabolismo dos organismos, como carbono orgânico e o nitrogênio, e embora a adição exógena destes recursos seja possível, a existência de micro-organismos capazes de fixar estes elementos, concomitantemente à oxidação de ferro e enxofre, assegura o fornecimento constante dos mesmos no sistema (HUA et al. 2014; CHEN et al. 2015; HAVIG et al. 2017), indicando um papel vital destes organismos para o crescimento e manutenção da comunidade. De fato, os dados revelam a predominância de famílias gênicas envolvidas na fixação de carbono e metabolismo de nitrogênio (como RuBisCO, prkB, e nifHDK) e na oxidação de ferro e enxofre (como citocromos e Sox); mas, além disso, também tem sido identificado uma grande quantidade de genes relacionados com a resistência a estresses em ambientes extremos como baixo pH (sqhC, kdpABC, clpX e clpP), contra estresse oxidativo (ahpC, sodA e dnaX) e resistência a metais (czcA, czcB e czcC) (CHEN et al, 2015; HUA et al, 2015; LILJEQVIST et al., 2015). Além da presença destes genes nos micro-organismos supracitados, alguns também têm sido identificados em organismos menos abundantes ou da “biosfera rara”, como o grupo de organismos não-cultiváveis ARMAN (do inglês Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nano-organisms) (BAKER et al. 2010).

ARMAN foi inicialmente detectado em Iron Mountain (Califórnia) em 2004 e, subsequentemente, identificado em diversas análises metagenômicas em sistemas de DAM (MÉNDEZ-GARCIA et al., 2015; HUA et al., 2015; GOLYSHINA

et al. 2017; MESA et al. 2017; GHUNEIM et al., 2018). HUA et al. (2015), por exemplo, aplicaram a estratégia “divide and conquer”, que divide um conjunto de dados metagenômicos massivos em subconjuntos, e conseguiram montar um “rascunho” de 11 genomas. A maioria dos genomas foi representado por espécies raras e/ou não-cultivadas (abundância relativa < 1%), incluindo *Acidithiobacillus ferrooxidans*-like FKB1, *Acidithiobacillus thiooxidans*-like FKB2, e ARMAN-like FKA8~FKA10. O conjunto de dados de metagenoma associado ao grupo ARMAN-like revelou a ausência de genes essenciais para o metabolismo deste grupo e a presença de genes específicos; com isso os autores ratificam a ideia de que este grupo desempenha papel importante na funcionalidade do sistema DAM (Hua et al., 2015). Recentemente, a ausência destes genes essenciais em ARMAN-like também foi verificada por Golyshina et al. (2017). Com base em métodos de cultivo e análise metagenômica, Golyshina et al. (2017) identificaram um co-cultivo natural da Arqueia *Cuniculiplasma divulgatum* e um organismo relacionado com ARMAN-2 (Mia14), até então não cultivado, em amostras de biofilme da antiga mina de cobre de Parys Mountain (Ilha de Anglesey, Reino Unido). Os resultados mostraram que o genoma de Mia14 - ARMAN-2 - é altamente deficiente de sequências gênicas relacionadas a vias metabólicas essenciais, indicando a dependência de *C. divulgatum*, com ampla troca genética com seu hospedeiro *in situ*. Como já relatado em diversos artigos, é evidente a atuação de consórcio microbiano em sistemas de DAM e estes dados fornecem mais subsídios para investimentos em ensaios

de co-cultivo de organismos presentes em DAM, a fim de conhecer mais profundamente as interações e a funcionalidade nestes sistemas complexos.

Os biofilmes são uma boa representação da importância destes consórcios microbianos no estabelecimento e manutenção das comunidades microbianas nestes ambientes adversos. Em um estudo recente, Drewniak et al. (2016) combinaram análises fisiológicas, metagenômica e de microscopia eletrônica para estudar a sorção e transformação de metais por biofilmes de ocorrência natural em duas minas de ouro e urânio - Zloty Stok goldmine (ZS) e Kowary uranium mine (KOW), na Polônia. Essas análises fisiológicas foram complementadas pelas análises metagenômicas para descrever os micro-organismos presentes e os prováveis mecanismos envolvidos na remoção dos metais. As análises de MEV e EDS mostraram acumulação de metais na superfície dos biofilmes e que nenhum biofilme microbiano foi completamente saturado com metais presentes nas águas das minas. Nas águas de ambas as minas foram detectadas concentrações de metais, na maioria dos casos, abaixo de  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Por outro lado, concentrações extremamente altas de metais foram detectadas em ambos os biofilmes, como por exemplo, ferro (~6%), alumínio (~12%), manganês (0,1-77%), urânio (152-195  $\text{mg.kg}^{-1}$ ), chumbo (49-252  $\text{mg.kg}^{-1}$ ), zinco (415-461  $\text{mg.kg}^{-1}$ ). Estes resultados indicam que os biofilmes apresentam um grande potencial para absorção de quantidades significativas de metais e atua como um biofiltro para sistemas de DAM. As análises metagenômicas revelaram que Methylococcaceae e Methylophilaceae foram as famílias mais abundantes em ambas as comunidades. A parte central (interior) de ambos os biofilmes foi colonizada principalmente por bactérias filamentosas, como *Leptothrix*

*Thiothrix* e *Beggiatoa*. O perfil funcional dos genes responsáveis pela formação de biofilme e produção de EPS mostrou que a maioria dos representantes dos biofilmes de KOW e ZS estão envolvidos no processo de sorção (imobilização), sendo *Methylococcus* o gênero mais representativo em ambas as comunidades. Além disso, genes de resistência a metais pesados (HMR) também foram identificados em quantidades significativas nos biofilmes analisados.

Os autores identificaram que a matriz dos biofilmes era composta por partículas coloidais, compostos orgânicos e íons metálicos, originários do processo de lixiviação das rochas, e se ligaram às substâncias poliméricas extracelulares (EPS) excretadas pelos micro-organismos, que podem ser consideradas como uma barreira física para o aprisionamento dos metais e como uma estrutura para a precipitação mineral. A importância da EPS na formação de biofilmes e propriedades de bio-sorção já tem sido descrita por diversos autores, mas, de modo geral, os resultados são referentes a biofilmes formados a partir de uma única estirpe cultivada em condições laboratoriais (CAO et al. 2011; TOURNEY e NGWENYA, 2014). No trabalho de Drewniak et al. (2016), a hipótese de que a sorção desempenha um papel fundamental na remoção de metais das águas das minas foi confirmada através de uma série de experimentos. As análises de EDS e MEV mostraram que a sorção de metal ocorreu em toda a superfície dos biofilmes o que é consistente com estudos anteriores que mostram a distribuição superficial de metais como evidência indireta de sorção não-metabólica. Processos como adsorção física, troca iônica e forte ligação com grupos carboxílicos, sulfato, fosfato ou amino são considerados os principais

mecanismos de sorção de metais independentes do metabolismo (KUYUCAK e VOLESKY, 1988). Os resultados deste trabalho fornecem dados importantes sobre a atividade das bactérias desde a formação de biofilmes até o processo de purificação das águas das minas contaminadas com metais; servindo como base, juntamente com outros dados da literatura, para o desenvolvimento de novos processos para mitigação dos efeitos adversos de DAM e outros ambientes contaminados com metais.

Como podemos observar, uma grande quantidade de pesquisas tem focado na remediação microbiana de ambientes contaminados por metais em bacias de rejeitos de minas e DAM e diferentes estratégias têm sido descritas. Mais recentemente, a compilação de dados obtidos através de técnicas dependentes e independentes de cultivo tem mostrado que as bactérias redutoras de sulfato (BRS) apresentam grande potencial para o processo de remediação destes ambientes. Nestes processos, o sulfato é reduzido a sulfeto de hidrogênio, e íons metálicos dissolvidos são precipitados como sulfetos metálicos e a concentração dos metais pesados em solução diminui (LEE et al. 2014; BARBOSA et al. 2014); ao mesmo tempo, os íons hidrogênio são consumidos e o pH aumenta. A mudança nos parâmetros de DAM causada pelas BRS é benéfica não somente para a formação de um ciclo virtuoso, mas favorece a restauração do ambiente (MENDEZ et al., 2007). Desta forma, o uso de BRS na remediação de rejeitos tem sido amplamente estudado e pode ser considerado um processo biotecnológico atrativo para biorremediação de DAM (AYANGBENRO et al., 2018).

Devido à existência inerente de bactérias acidófilas autotróficas que oxidam o ferro e o enxofre nos rejeitos de minas, o processo de remediação com BRS é também um processo de competição entre BRS e bactérias acidófilas. A deterioração ambiental é favorecida quando as bactérias acidófilas se tornam dominantes nos rejeitos; em contrapartida, as condições ambientais são minimizadas quando BRS se tornam dominantes. A pesquisa atual de remediação por BRS centra-se principalmente na pesquisa da capacidade de remediação das BRS; mas negligencia-se a existência e a competição de bactérias acidófilas. Assim, os estudos que avaliam a competição microbiana e o ajuste da comunidade microbiana são essenciais e necessários para a aplicação prática de remediação por BRS.

Jing et al. (2017), com base na composição da comunidade microbiana de DAM, descrita na literatura, e na capacidade metabólica de seus componentes, simularam um ambiente mineral contendo pirita, bactérias redutoras de sulfato (BRS) e ferro (BRF) - responsáveis pela neutralização do meio ácido e *Acidithiobacillus ferrooxidans* – principal responsável pela acidificação e liberação de metais no meio. Além disso, foi adicionado extrato de levedura e diferentes concentrações de lactato de sódio ao meio de cultivo. Os resultados mostraram que a adição de lactato de sódio (>1,0 g/l) e extrato de levedura refletiu no aumento da população de BRS (↑13%) e na diminuição de BRF (↓18%) e *A. ferrooxidans* (↓10%). Ao longo de 28 dias, no tratamento contendo BRS, BRF, *A. ferrooxidans* e alta concentração de lactato (>1,0 g/l), observou-se aumento exponencial do pH, diminuição do potencial redox e oxidação não significativa de ferro. Os autores concluíram que o ajuste

da comunidade microbiana e dos nutrientes adequados podem minimizar o processo de oxidação da pirita e, conseqüentemente, reduzir a produção de DAM.

Zhang et al. (2017) também mostram um experimento de competição envolvendo bactérias acidófilas e redutoras de sulfato em meio suplementado com extrato de levedura, triptona, lactato e glucose. Além das propriedades físico-químicas do meio, a estrutura da comunidade microbiana e a biomassa formada foram determinadas por sequenciamento e qPCR. Os resultados mostraram que extrato de levedura (na concentração >1,6g/L), seguido por triptona, favoreceram a população de BRS e inibiram as bactérias acidófilas. Os resultados da difração de raios X (XRD) indicaram que o sulfeto ferroso foi gerado em todos os tratamentos suplementados com matéria orgânica, sendo o extrato de levedura aquele que mostrou maior rendimento. Quanto às análises metagenômicas, foi observado que os diferentes nutrientes tiveram grande efeito na mudança da composição das comunidades microbianas; sendo o maior efeito referente a aplicação de extrato de levedura. Este composto promoveu o crescimento do filo Firmicutes, incluindo os gêneros *Desulfosporosinus* e *Desulfotomaculum*. Por outro lado, a adição de glucose promoveu o grupo das Proteobacterias, especialmente bactérias acidófilas como *Acidithiobacillus*, não sendo indicada para a imobilização de metais pesados e, portanto, da remediação. Nos experimentos de remediação biológica, os autores identificaram que nos tratamentos contendo extrato de levedura houve aumento de *Desulfotomaculum*, aumento de pH, diminuição do potencial de oxi-redução e das concentrações de S, Fe, Cu, Zn e Pb. A análise conjunta dos resultados mostra que, nas condições

testadas, o extrato de levedura, seguido por tripton, foram os substratos orgânicos mais indicados para ajuste das populações presentes na comunidade microbiana e melhora das propriedades físicas e químicas da DAM tanto em experimentos de laboratório como em condições naturais.

Nas últimas décadas, além da busca por estratégias para diminuir a produção e os efeitos da DAM, tem-se procurado, também, promover a recuperação de metais presentes nestes rejeitos; o que reduz a carga de elementos tóxicos no ambiente (metais) e gera nova fonte de matéria prima. De maneira geral os trabalhos são baseados em ensaios experimentais que utilizam estirpes de bactérias comumente isoladas de ambientes contendo DAM ou ambientes com características semelhantes; no entanto, a ampliação do conhecimento das comunidades microbianas e seus potenciais metabólicos, associados às demandas crescentes por metais e o esgotamento progressivo dos depósitos minerais, tem estimulado inovações na área de recuperação de metais, assistida por micro-organismos a partir dos resíduos, e revelado novas vias metabólicas para esta finalidade.

Grande parte dos estudos tem sido direcionada às análises de genes microbianos relacionados a funções específicas como, por exemplo, a resistência a metais. Recentemente, Li et al. (2015) utilizaram análise metagenômica para acessar a diversidade de genes de resistência a cobre em amostras de rejeitos de uma mina abandonada de Pb-Zn em Mount Isa (Queensland, Austrália). As amostras eram ricas em pirita, Cu, Pb, Zn e As, e os resultados mostraram que estes metais residuais foram considerados fatores determinantes para a mudança na estrutura da comunidade microbiana; além disso, a análise metagenômica das amostras do resíduo revelou

abundância dos genes *cop*, *czc* (codificam para resistência de múltiplos metais) e *ars* (codifica para resistência a arsênio) 2,8, 2,5 e 1,7 vezes maior, respectivamente, do que aquelas encontradas na amostra controle (sem resíduo da mina Mount Isa). Quanto à classificação, os genes *copA*-like identificados nas amostras de DAM foram mais relacionados a genomas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Rubrobacter radiotolerans* e *Thioalkalivibrio sulfidophilus*.

Posteriormente, Li et al. (2017) analisaram a diversidade de genes funcionais associados ao metabolismo de arsênio (*aioA*, *arrA*, *arsC* e *arsM*) a partir de amostras de rejeitos de uma mina abandonada de Pb-Zn. As análises de similaridade das sequências do gene *arsC* foram estreitamente relacionadas com *Rubrobacter* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Deinococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Burkholderia* sp. e *Novosphingobium* sp.. Os grupos supracitados também apresentaram resultado positivo para o gene *arsM*, com exceção do gênero *Deinococcus*. A sequência do gene *arrA* apresentou maior similaridade com sequências da espécie *Thioalkalivibrio sulfidophilus*; enquanto as do gene *aioA* foram relacionadas com os gêneros menos abundantes incluindo *Cupriavidus*, *Rhizobium* e *Polymorphum*. Baseados na detecção dos genes funcionais e nas características de cada gênero identificado neste trabalho os autores propuseram uma via que descreve o ciclo do As no rejeito. Embora os genes *arsC* e *arsM* tenham sido distribuídos entre os organismos dominantes nos rejeitos, *Thioalkalivibrio* sp. merece destaque, pois contém não só *arsC* e *arsM*, mas também *arrA*. Estes resultados destacam a diversidade inesperada dos genes do metabolismo de As nos rejeitos, especialmente considerando a diversidade de espécies extremamente baixa. Os autores

sugerem que o ciclo de As mediado pelos micro-organismos tem potencial de uso para orientar a manipulação biogeoquímica de As nos rejeitos.

Como é possível observar nos trabalhos supracitados a presença de genes relacionados à resistência de metais pesados, e conseqüentemente sua atuação nos mecanismos de transformação destes elementos, tem sido detectada em uma variedade de bactérias presentes em DAM, ratificando a hipótese de consórcio bacteriano em diferentes processos que ocorrem em DAM. Le pape et al. (2017), com base nestas premissas, demonstraram que um efluente de DAM rico em As pode ser descontaminado por um consórcio de bactérias redutoras de sulfato indígenas. Neste trabalho águas da mina de Carnoulès (Gard, França) foram incubadas com um consórcio enriquecido de BRS sob condições anóxicas e as concentrações de As, Zn e Fe, pH e atividade microbiana foram monitoradas durante 94 dias. Foi observada a remoção total de As e Zn na solução (1,06 e 0,23 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Enquanto zinco foi precipitado como nanopartículas de ZnS, arsênio precipitou como As(III) (14-23%) e am-AsIII2S3 (33-37%) e AsIIIS (0-34%). Os autores sugerem que a formação de AsIIIS resulta da redução de AsIII2S3 por H<sub>2</sub>S biogênico, aumentando a eficiência da remoção de As. De acordo com os autores o processo de imobilização descrito neste trabalho pode ser considerado promissor para mitigar os efeitos adversos de As; além disso, pode servir de base para novas estratégias de remediação biológica de ambientes contaminados com As.

Como evidenciado nos trabalhos supracitados, a aplicação de análises metagenômicas nos sistemas contendo DAM é mais expressiva em países da Europa, EUA, Chile, entre outros.

No Brasil, o número de trabalhos com esta abordagem ainda é bastante incipiente. Em 2016, Leite utilizou sequenciamentos shotgun e amplicon (16S rDNA) para explorar a diversidade metabólica e funcional dos procariotos presentes em uma barragem de rejeitos e uma drenagem ácida (DAM) da mina de Sossego em Carajás, Pará. Com relação à comunidade microbiana da água da barragem, o grupo taxonômico predominante foi Actinobacteria, seguido de Betaproteobacteria e Bacteroidetes. Já em drenagem ácida de mina e no sedimento da barragem foram encontradas importantes famílias de bactérias redutoras de sulfato como Peptococcaceae, Thermodesulfovibrionaceae, Desulfobacteriaceae, Desulfobulbaceae e Nitrospinaceae. A atividade destas bactérias está diretamente relacionada ao aumento da alcalinidade e a formação de sulfetos, que são aspectos de grande interesse nos processos de remediação biológica.

De maneira geral, a análise funcional das amostras de Carajás evidenciou vias metabólicas relacionadas à fixação de carbono, metabolismo de nitrogênio, oxidação de ferro ferroso e metabolismo de enxofre. Além disso, foram identificados diversos mecanismos adaptativos ligados à resistência a metais pesados, tolerância a solventes orgânicos, adaptação ao baixo pH e à oligotrofia. No presente estudo Leite (2016) estabeleceu um novo fluxo de trabalho para análise de bibliotecas metagenômicas do tipo shotgun, que foi aplicado na construção de um catálogo inédito do potencial biotecnológico dos micro-organismos associados a minas brasileiras de cobre, incluindo genes e rotas metabólicas de interesse industrial e ambiental.

O uso de abordagens moleculares em estudos de comunidades microbianas de DAM tem gerado resultados surpreendentes sobre a ocorrência, diversidade, interação, capacidade metabólica e funcionalidade de organismos promissores que não seriam acessados por métodos de cultivos tradicionais. O uso conjunto destes dados é de extrema importância para o melhor entendimento dos processos microbianos que ocorrem na DAM, podendo ser estratégico para o manejo adequado destes ambientes a fim de minimizar seus efeitos adversos. Além disso, a reconstrução dos genomas individuais e o acesso ao seu potencial metabólico podem gerar produtos biotecnológicos de grande interesse para aplicação comercial.

### 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A introdução e o avanço das plataformas de SNG têm revolucionado as pesquisas em amostras de DNA ambiental nos mais variados ecossistemas, incluindo os naturais e contaminados. A grande maioria dos estudos visa analisar, de forma mais realista, a estrutura genômica e o potencial metabólico das comunidades microbianas. Desta forma, é possível identificar os principais micro-organismos, dominantes e raros, que ocorrem nos ambientes, bem como os processos biológicos que são desencadeados durante alterações ambientais.

De maneira geral, os resultados de metagenômica têm mostrado que a introdução de substâncias e/ou elementos tóxicos nos ambientes naturais provocam a redução da diversidade microbiana, mas não necessariamente altera a capacidade da comunidade nas atividades de degradação e/ou transformação de poluentes. Estas mudanças da comunidade podem ser explicadas pela diminuição abrupta da abundância, ou até extinção, da maioria das espécies - que são sensíveis ao efeito tóxico dos poluentes; por outro lado, tem se observado nestes ambientes a predominância de novos grupos (menos abundantes) que possuem vias metabólicas específicas relacionadas à tolerância às condições adversas e transformação dos poluentes. Estes grupos microbianos apresentam características promissoras para os processos de biorremediação, mas a grande maioria compreende organismos ainda não cultiváveis em laboratório.

Diante destes novos fatos revelados pelas análises metagenômicas, uma nova atribuição tem sido dada a estas abordagens: guiar o desenvolvimento de novas estratégias de

cultivo e reduzir o espaço de tempo inerente às tentativas e erros de técnicas tradicionais de cultivo. Recentemente, Gutleben et al. (2018) apresentam uma revisão sobre uma nova era de uso das informações das Ômicas para auxiliar as tecnologias de cultivo microbiano. Os autores resumem os estudos pioneiros que usaram informações provenientes das multi-ômicas para seleção de formulações e enriquecimentos seletivos na obtenção de novos isolados microbianos específicos. Pela integração dos exemplos apresentados os autores propõem um fluxograma para facilitar futuras estratégias de cultivo que se inspiram na complexidade microbiana do ambiente.

Diante do exposto torna-se evidente que as informações geradas pelas abordagens independentes de cultivo, principalmente pelo uso de SNG, podem ser utilizadas para diversas finalidades, incluindo inferências ecológicas e funcionais sobre os micro-organismos presentes nos ambientes e a prospecção de produtos biotecnológicos que possam ser empregados para fins ambientais e industriais. Se os microbiomas forem mais bem descritos e entendidos, tais informações estarão disponíveis para o desenvolvimento de novas tecnologias, especialmente aquelas que se concentrarão em uma melhor exploração das características microbianas locais. Mais precisamente, além de obter novos isolados microbianos, pode ser possível alterar a estrutura da comunidade, seja pela estimulação de organismos endógenos, pela inoculação de organismos exógenos ou pelo controle de condições ambientais, de modo a beneficiar grupos específicos que atuam de forma significativa nos ambientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, A.; KHEZRI, M.; ABDOLLAHZADEH, A.A.; ASKARI, M. Bioleaching of copper, nickel and cobalt from the low grade sulfidic tailing of Golgohar iron mine. *Hydrometallurgy* 154:1-8, 2015.

ALVAREZ, A.; SAEZ, J.M.; DAVILA COSTA, J.S.; COLIN, V.L.; FUENTES, M.S.; CUOZZO, A.S.; BENIMELI, C.S.; POLTI, M.A.; AMOROSO, M.J. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* 166:41-62, 2017.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:417-432, 2009.

AYANGBENRO, A.S.; OLANREWaju, O.S.; BABALOLA, O.O. Sulfate-Reducing Bacteria as an Effective Tool for Sustainable Acid Mine Bioremediation. *Frontiers in Microbiology* 9:1986, 2018.

BAKER, B.J.; COMOLLI, L.R.; DICK, G.J.; HAUSER, L.J.; HYATT, D.; DILL, B.D.; LAND, M.L.; VERBERKMOES, N.C.; HETTICH, R.L.; BANFIELD, J.F. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(19):8806-11, 2010.

BAKER, B.J.; BANFIELD, J.F. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology* 44: 139-152, 2003.

BARBOSA, L.P.; COSTA, P.F.; BERTOLINO, S.M.; SILVA, J.C.; GUERRA-SÁ, R.; LEÃO, V.A.; TEIXEIRA, M.C. Nickel, manganese and copper removal by a mixed consortium of sulfate reducing bacteria at a high COD/sulfate ratio. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 30:2171-2180, 2014.

BELL, T.H.; JOLY, S.; PITRE, F.E.; YERGEAU, E. Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends in Biotechnology* 32(5):271-80, 2014.

BOITARD, L.; COTTINET, D.; BREMOND, N.; BAUDRY, J.; BIBETTE, J. Growing microbes in millifluidic droplets. *Engineering in Life Sciences* 15:318-326, 2015.

BOUGUELIA, S.; ROUPIOZ, Y.; SLIMANI, S.; MONDANI, L.; CASABONA, M.G.; DURMORT, C.; VERNET, T.; CALEMCZUK, R.; LIVACHE, T. On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria. *Lab on a Chip* 13(20):4024-32, 2013.

BOUHAJJA, E.; AGATHOS, S.; GEORGE F.I. Metagenomics: Probing Pollutant Fate in Natural and Engineered Ecosystems. *Biotechnology Advances* 34(8):1413-1426, 2016.

BRAGG, J.R.; ROGER, C.P.; HARNER, E.J.; ATLAS, R.M. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature* 368: 413-418, 1994.

CAO, B.; AHMED, B.; KENNEDY, D.W.; WANG, Z.M.; SHI, L.; MARSHALL, M.J. et al. Contribution of Extracellular Polymeric Substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 Biofilms to U(VI) Immobilization. *Environmental Science & Technology*. 45:5483-5490, 2011.

CHEN, L.-X.; HU, M.; HUANG, L.-N.; HUA, Z.-S.; KUANG, J.-L.; LI, S.-J. et al. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *ISME Journal* 9:1579-1592, 2015.

CHEN, L.X.; HUANG, L.N.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; KUANG, J.L.; HUA Z.S.; LIU, J.; SHU, W.S. Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems. *Current Opinion in Biotechnology* 38:150-8, 2016.

DINI-ANDREOTE, F.; Van ELSAS, J.D. Back to the basics: the need for ecophysiological insights to enhance our understanding of microbial behavior in the rhizosphere. *Plant and Soil* 373: 1-15, 2013.

DREWNIAK, L.; KRAWCZYK, P.S.; MIELNICKI, S.; ADAMSKA, D.; SOBCZAK, A.; LIPINSKI, L.; BUREC-DREWNIAK, W.; SKŁODOWSKA, A. Physiological and metagenomic analyses of microbial mats involved in self-purification of mine waters contaminated with heavy metals. *Frontiers in Microbiology* 7: 1252, 2016.

DUNBAR W.S. Biotechnology and the mine of tomorrow. *Trends in Biotechnology* 35:79–89, 2017.

FALAGÁN, C.; YUSTA, I.; SÁNCHEZ-ESPAÑA, J.; JOHNSON D. B. Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. *Minerals Engineering* 106:79–85, 2017.

FUENTES, S.; MÉNDEZ, V.; AGUILA, P.; SEEGER M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(11):4781-94, 2014.

GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 159:609-43, 2010.

GHUNEIM, L-A.J.; JONES, D.L.; GOLYSHIN, P.N.; GOLYSHINA, O.V. Nano-Sized and Filterable Bacteria and Archaea: Biodiversity and Function. *Frontiers in Microbiology* 9:1971, 2018.

GILBERT J.A.; MEYER, F.; JANSSON, J.; GORDON, J.; PACE N.; TIEDJE, J.; LEY, R.; FIERER, N.; FIELD, D.; KYRPIDES, N.; GLÖCKNER, F.O.; KLENK, H.P.; WOMMACK, K.E.; GLASS, E.; DOCHERTY, K.; GALLERY, R.; STEVENS, R.; KNIGHT, R. The Earth Microbiome Project: Meeting report of the "1 EMP meeting on sample selection and acquisition" at Argonne National Laboratory October 6. *Standards in Genomic Sciences* 3(3):249-53, 2010.

GOLYSHINA, O. V., TOSHCHAKOV, S. V., MAKAROVA, K. S., GAVRILOV, S. N., KORZHENKOV, A. A., LA CONO, V., et al. "ARMAN" Archaea depend on association with euryarchaeal host in culture and in situ. *Nature Communications* 8:60, 2017.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J.D.; MCCOMBIE, W.R.; Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 17(6):333-51, 2016.

GREEN, J.; Bohannan, B.J. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 21(9):501-7, 2006.

GUPTA, A.; DUTTA, A.; SARKAR, J.; PAUL, D.; PANIGRAHI, M.K.; SAR, P. Metagenomic exploration of microbial community in mine tailings of Malanjkhand copper project, India. *Genomics Data* 12:11-13, 2017.

GUTLEBEN, J.; CHAIB DE MARES, M.; VAN ELSAS, J.D.; SMIDT, H.; OVERMANN, J.; SIPKEMA, D. The multi-omics promise in context: From sequence to microbial isolate. *Critical Reviews in Microbiology* 44(2):212-229, 2018.

HAVIG, J.R.; GRETTEBERGER, C.; HAMILTON, T.L. Geochemistry and microbial community composition across a range of acid mine drainage impact and implications for the Neoproterozoic-Paleoproterozoic transition. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 122:1404–1422, 2017.

HEDRICH, S.; JOHNSON, D. Remediation and Selective Recovery of Metals from Acidic Mine Waters Using Novel Modular Bioreactors. *Environmental science & technology* 48(20):12206-12212, 2014.

HELMY, Q.; LAKSMONO, R.; KARDENA, E. Bioremediation of Aged Petroleum Oil Contaminated Soil: From Laboratory Scale to Full Scale Application. *Procedia Chemistry* 14:326-333, 2015.

HENTATI, O.; LACHHAB, R.; AYADI, M.; KSIBI, M. Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment* 185(4), 2989–2998, 2013.

HIRAOKA, S.; YANG, C.; IWASAKI, W. Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: current status and beyond. *Microbes and Environments* 31(3):204-212, 2016.

HUA, Z.-S.; HAN, Y.-J.; CHEN, L.-X.; LIU, J.; HU, M.; LI, S.-J.; et al. Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics. *ISME Journal* 9:1280–1294, 2015.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3(2):reviews0003.1–0003.8, 2002.

JING, Q.; ZHANG, M.; LIU, X.; LI, Y.; WANG, Z.; WEN, J. Bench-scale microbial remediation of the model acid mine drainage: Effects of nutrients and microbes on the source bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 128:117-121, 2017.

JOHNSON, D.B.; HALLBERG, K.B. Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment* 338(1–2):3-14, 2005.

JOHNSON, D.B. Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiology Ecology* 81(1):2-12, 2012.

JUNG, J.; PHILIPPOT, L.; PARK, W. Metagenomic and Functional Analyses of the Consequences of Reduction of Bacterial Diversity on Soil Functions and Bioremediation in Diesel-Contaminated Microcosms. *Scientific Reports* 6: 23012, 2016.

KALINA, M.; WHEELERA, W.N. Ecological perspectives in restoring mine waste management areas. *Procedia Environmental Sciences* 9:90-95, 2011.

KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology Letters* 10:137-142, 1988.

LAGIER, J.C.; ARMOUGOM, F.; MILLION, M.; HUGON, P.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; BITTAR, F.; FOURNOUS, G.; GIMENEZ, G.; MARANINCHI, M.; TRAPE, J.F.; KOONIN, E.V.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection* 18(12):1185-93, 2012.

LAURIE, A.D.; LLOYD-JONES, G. Quantification of phnAc and nahAc in contaminated new zealand soils by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):1814-7, 2000.

LE PAPE, P.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; PARMENTIER, M.; JOULIAN, C.; GASSAUD, C.; FERNANDEZ-ROJO, L.; GUIGNER, J.M.; IKOGOU, M.; STETTEN, L.; OLIVI, L.; CASIOT, C.; MORIN, G. Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium. *Journal of Hazardous Materials* 321:764-772, 2017.

LEE, D.J.; LIU, X.; WENG, H.L. Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm. *Bioresource technology* 156:14-19, 2014.

LI, X.; BOND L.P.; HUANG, L. Diversity of as metabolism functional genes in Pb-Zn mine tailings. *Pedosphere* 27(3):630-637, 2017.

LILJEQVIST, M.; OSSANDON, F.J.; GONZÁLEZ, C.; RAJAN, S.; STELL, A.; VALDES, J.; DOPSON, M. Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. *FEMS Microbiology Ecology* 91(4), 2015.

LONGNECKER, K.; FUTRELLE, J.; COBURN, E.; KIDO SOULE, M.C.; KUJAWINSKI, E.B. Environmental metabolomics: databases and tools for data analysis. *Marine Chemistry* 177: 366–373, 2015.

LU, L.; Yazdi, H.; Jin, S.; Zuo, Y.; Fallgren, P.H.; Ren Z.J. Enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil using pilot-scale bioelectrochemical systems. *Journal of Hazardous Materials* 274:8-15, 2014.

MERCADO, L.; TRAMONTINI, L.; BUCKER, F.; QUADROS, P.; KATERYNA Z, J.D.; ANDREAZZA, R.; FRAZON, A.P.G.; BENTO, F.M. Culture-Independent Analysis of Bacterial Diversity during Bioremediation of Soil Contaminated with a Diesel-Biodiesel Blend (B10)S. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6: 1-11, 2015.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology* 37:634-663, 2013.

MENDEZ, M.O.; GLENN, E.P.; MAIER, R.M. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *Journal of Environmental Quality* 36:245–253, 2007.

MÉNDEZ-GARCÍA, C.; Peláez AI, Mesa V, Sánchez J, Golyshina OV, Ferrer M Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front. Microbiol.* 6, 475 (2015).

MESA, V.; GALLEGU, J.L.R.; GONZÁLEZ-GIL, R.; LAUGA, B.; SÁNCHEZ, J.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A.I. Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Diversity across Distinct Microhabitats in an Acid Mine Drainage. *Frontiers in Microbiology* 12(8):1756, 2017.

MORAIS, D.; PYLRO, V.; CLARK, I.M.; HIRSCH, P.R.; TÓTOLA, M.R. Responses of microbial community from tropical pristine coastal soil to crude oil contamination. *PeerJ* 4:e1733, 2016.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. The ecology and biotechnology of sulphate reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6(6): 441-54, 2008.

PAN, C.; BANFIELD, F.J. Quantitative Metaproteomics: Functional Insights into Microbial Communities. *Methods in molecular biology* 1096, 231-40, 2014.

PARKER S.G.; GOODING J.J. Single-cell Isolation Devices: Understanding the Behaviour of Cells. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales* 148(455-456):70-81, 2015.

PROSSER, J.I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 13:439-46, 2015.

PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.; ORTEGA, J.M.; DO AMARAL, A.M.; TÓTOLA, M.R.; HIRSCH, P.R.; ROSADO, A.S.; GÓES-NETO, A.; DA COSTA DA SILVA, A.L.; ROSA, C.A.; MORAIS, D.K.; ANDREOTE, F.D.; DUARTE, G.F.; DE MELO, I.S.; SELDIN, L.; LAMBAIS, M.R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R.S.; KRUGER, R.H.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, V. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. *Microbial Ecology* 67(2):237-41, 2013.

QIN, G.; GONG, D.; FAN, M-Y. Bioremediation of petroleum contaminated soil by biostimulation amended with biochar. *International Biodeterioration and Biodegradation* 85:150-155, 2013.

RODRIGUEZ, E.; GARCIA-ENCINA, P.A.; STAMS, A.J.M.; MAPHOSA, F.; SOUSA, D.Z. Meta-omics approaches to understand and improve wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14: 385-406, 2015.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology* 27:191-194, 2014.

ROTHBERG, J.M.; HINZ W.; [...]; BUSTILLO J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475:348-352, 2011.

SILVA, V.M.A.; BRITO, F.A.E.; RAMOS, K.A.; SILVA, R.M.; MARTINS, C.M.; MARTINS, S.C.S. Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid. *Enciclopédia Biosfera* 11:2026-2036, 2015.

SINGH, B.; BHATTACHARYA, A.; CHANNASHETTAR, V.A.; JEYASEELAN, C.P.; GUPTA, S.; SARMA, P.M.; MANDAL, A.K.; LAL, B. Biodegradation of oil spill by petroleum refineries using consortia of novel bacterial strains. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89:257-262, 2012.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12115-20, 2006.

STALEY, J.T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 39:321-46, 1985.

STEFANI, F.O.P.; BELL, T.H.; MARCHAND, C.; DE LA PROVIDENCIA, I.E.; EL YASSIMI, A.; ST-ARNAUD, M. et al. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS ONE* 10(6): e0128272, 2015.

SUJA, F.; RAHIM, F.; TAHA, M. R.; HAMBALI, N.; RIZAL RAZALI, M.; KHALID, A.; HAMZAH, A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation* 90:115-122, 2014.

SUN, J-Q.; XU, L.; LIU, X-Y.; ZHAO, G-F.; CAI, H.; NIE, Y.; WU X-L. Functional genetic diversity and culturability of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Frontiers in Microbiology* 9:1332, 2018

TENG, W K.; JIALIANG & LUO, ZHENHAO & SHU, WENSHENG. Microbial diversity and community assembly across environmental gradients in acid mine drainage. *Minerals* 7:106, 2017.

TOURNEY, J.; NGWENYA, B.T. The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology. *Chemical Geology* 386:115–132, 2014.

TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428(6978):37-43, 2004.

TYSON, G.W.; LO, I.; BAKER, B.J.; ALLEN, E.E.; HUGENHOLTZ, P.; BANFIELD, J.F. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10):6319-24, 2005.

URICH, T.; LANZÉN, A.; STOKKE, R.; PEDERSEN, R.B.; BAYER, C.; THORSETH, I.H.; SCHLEPER, C.; STEEN, I.H.; ØVREAS, L. Microbial community structure and functioning in marine sediments associated with diffuse hydrothermal venting assessed by integrated meta-omics. *Environmental Microbiology* 16(9):2699-710, 2014.

UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAULT, M.P.; FREY-KLETT, P. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* 17(8):378-87, 2009.

UTGIKAR, V.P.; HARMON, S.M.; CHAUDHARY, N.; TABAK, H.H.; GOVIND, R.; HAINES, J.R. Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology* 17(1):40-8, 2002.

VARJANI, S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* 223:277-286, 2017.

VARJANI, S.J.; UPASANI V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology* 221:510-516, 2016.

VARJANI, S.J.; SRIVASTAVA, V.K. Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Resources Journal* 3:244-249, 2015.

WANG, Y.; HATT, J.K.; TSEMENTZI, D.; RODRIGUEZ-R, L.M.; RUIZ-PÉREZ, C.A.; WEIGAND, M.R.; KIZER, H.; MARESCA, G.; KRISHNAN, R.; PORETSKY, R.; SPAIN, J.C.; KONSTANTINIDIS, K.T. Quantifying the importance of the rare biosphere for microbial community response to organic pollutants in a freshwater ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 8:e03321-16, 2017.

WHITE, R.A.; BORKUM, M.I.; RIVAS-UBACH, A.; BILBAO, A.; WENDLER, J.P.; COLBY, S.M.; et al. From data to knowledge: the future of multi-omics data analysis for the rhizosphere. *Rhizosphere* 3:222-229, 2017.

WOLICKA, D.; SUSZEK, A.; BORKOWSKI, A.; BIELECKA, A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology* 100(13):3221-3227, 2009.

WU, M.L.; DICK, W.A.; LI, W.; WANG, X.C.; YANG, Q.; WANG, T.T.; et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 107:158-164, 2016.

WU, M.L.; YE, X. Q.; CHEN, K.L.; LI, W.; YUAN, J.; JIANG, X. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environmental Pollution* 223:657-664, 2017.

ZAFRA G.; ABSALÓN, Á.E.; ANDUCHO-REYES, M.Á.; FERNANDEZ, F.J.; CORTÉS-ESPINOSA, D.V. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere* 172: 120-126, 2017.

ZAFRA, G.; VALDIVIESO, W. Use of Molecular Tools to Monitor Microbial Communities During The Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Journal of Industrial Pollution Control* 32:534-543, 2016.

ZHANG, M.; LIU, X.; LI, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; WEN, J. Microbial community and metabolic pathway succession driven by changed nutrient inputs in tailings: effects of different nutrients on tailing remediation. *Scientific Reports* 7(1):474, 2017.

## SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2017, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, mais de 320 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <http://www.cetem.gov.br/series>.

### Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

STA-104 – **Estudo da viabilidade técnica da utilização de resíduos de rochas em massas cerâmicas.** Maria Angélica Kramer Sant’ana, Mônica Castoldi Borlini Gadioli, 2018.

STA-103 – **Síntese de nanopartículas de óxido de ferro.** Ellen Cristine Giese, 2018.

STA-102 – **Desaguamento de rejeitos minerais para aplicação de métodos de disposição alternativos às barragens de rejeitos convencionais.** Sílvia Cristina Alves França e Bruna Câmara Trampus, 2018.

## **INFORMAÇÕES GERAIS**

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral  
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária  
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ  
Geral: (21) 3865-7222  
Biblioteca: (21) 3865-7218  
E-mail: [biblioteca@cetem.gov.br](mailto:biblioteca@cetem.gov.br)  
Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

## **NOVAS PUBLICAÇÕES**

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.



## Missão Institucional

Desenvolver tecnologias inovadoras e sustentáveis, e mobilizar competências visando superar desafios nacionais do setor mineral.

## O CETEM

O Centro de Tecnologia Mineral - CETEM é um instituto de pesquisas, vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações - MCTIC, dedicado ao desenvolvimento, à adaptação e à difusão de tecnologias nas áreas minerometalúrgica, de materiais e de meio ambiente.

Criado em 1978, o Centro está localizado no campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, na Cidade Universitária, no Rio de Janeiro e ocupa 20.000m<sup>2</sup> de área construída, que inclui 25 laboratórios, 4 plantas-piloto, biblioteca especializada e outras facilidades.

Durante seus 40 anos de atividade, o CETEM desenvolveu mais de 800 projetos tecnológicos e prestou centenas de serviços para empresas atuantes nos setores minerometalúrgico, químico e de materiais.